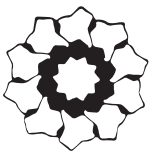
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА



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

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ НАСЕЛЕНИЯ

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ,

посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. БЛОХИНОЙ

(28 мая 2014 г., г. Нижний Новгород)

г. Нижний Новгород
2014

УДК 616.9:614.4.002
ББК 55

Б63 **ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ НАСЕЛЕНИЯ** // Материалы Всероссийской научно-практической конференции (28 мая 2014 г.) Под ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова – Н. Новгород: Типография «….», 2014. 276 с.

Редакционная коллегия:

д.м.н., профессор Е.И. Ефимов
д.б.н., профессор Г.И. Григорьева,
к.м.н. Н.Н. Глухов
к.б.н. Д.В. Кряжев

Представлены материалы традиционной научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», организуемой ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора. Участие в формировании материалов сборника приняли ведущие ученые и специалисты научных и практических учреждений Роспотребнадзора, Центров по профилактике и борьбе со СПИД и других организаций из разных регионов страны.

В материалах сборника отражены результаты научных исследований по вопросам эпидемиологии актуальных инфекций, в том числе с применением ГИС-технологий, молекулярной эпидемиологии; достижения в области диагностики, молекулярно-генетических и молекулярно-биологических исследований патогенов бактериальной и вирусной природы; в изучении иммунных механизмов защиты, создании и совершенствовании профилактических и диагностических препаратов, средств обеспечения биологической безопасности; общей и популяционной экологии микроорганизмов различных биосистем, различные аспекты биотехнологии иммунобиологических препаратов.

Материалы конференции будут полезны как научным, так и практическим работникам службы Роспотребнадзора и других ведомств, участвующих в создании противоэпидемической зашиты населения, а также эпидемиологам, микробиологам, вирусологам, иммунологам, биотехнологам, работающим в разных областях науки и практического здравоохранения.

ISBN

© ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 2014

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время борьба с инфекционными заболеваниями по-прежнему входит в число приоритетных задач росссийского здравоохранения. Санитарно-эпидемиологическая обстановка в стране остаётся неустойчивой по ряду нозологий, перечень которых во многом схож, но в то же время и специфичен для разных регионов России. Как следствие, эти задачи постоянно находят свое отражение в документах правительства и ведомств, таких как Приоритетный национальный проект в сфере здравоохранения «Здоровье», в который входят разделы, предусматривающие профилактику и лечение ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, туберкулеза и ряда других инфекционных заболеваний.

Все вышеизложенное послужило основанием для формирования Федеральной службой по надзору в сфере зашиты прав потребителей и благополучия человека Концепции научного обеспечения деятельности органов и организаций Роспотрсбнадзора до 2015 года. В Концепции пределены основные направления научных исследований организаций науки Роспотребнадзора, среди которых:

совершенствование научных основ эпидемиологического надзора, создание научно-обоснованных систем паспортизации территорий, внедрение ГИС-технологий;

разработка и внедрение в практику современных алгоритмов мониторинга, методов и средств лабораторной диагностики и профилактики инфекционных болезней;

совершенствование методов анализа и прогнозирования санитарно-эпидемиологической ситуации;

совершенствование системы мероприятий, направленных на обеспечение химической, биологической и радиационной безопасности, в том числе, при возникновении чрезвычайных ситуаций;

совершенствование методов профилактики нарушения здоровья, в том числе посредством формирования здорового образа жизни и другие.

Во исполнение плана реализации данной концепции были разработаны целевые научно-исследовательские программы противоэпидемической направленности, из которых на сегодняшний день выполняется программа «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011–2015 гг.), в рамках которой проводятся исследования научно-исследовательскими институтами Роспотребнадзора, в том числе Нижегородским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной.

Предусмотренные указанной выше Программой научные исследования направлены, в первую очередь, на повышение уровня научного обеспечения противоэпидемических мероприятий в системе органов и организаций Роспотребнадзора, результатом которого является укрепление санитарно-эпидемиологического благополучия населения и, в конечном итоге, – совершенствование системы биологической безопасности страны.

В настоящем издании представлены материалы Научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения», организованной ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, посвященной 95-летию создания института, проведенной 28 мая 2014 г. В Нижнем Новгороде. В материалах конференции отражены результаты научных исследований по вопросам эпидемиологии актуальных инфекций, в том числе молекулярной эпидемиологии; достижения в области диагностики, молекулярно-генетических и молекулярно-биологических исследований патогенов бактериальной и вирусной природы; в изучении иммунных механизмов защиты, создании и совершенствовании профилактических и диагностических препаратов, средств обеспечения биологической безопасности; общей и популяционной экологии микроорганизмов различных биосистем; применения современных геоинформационных технологий (ГИС) в мониторинге инфекционных заболеваний; вопросы ВИЧ-инфекции, биотехнологические аспекты иммунобиологических препаратов.

В формировании материалов сборника приняли участие ведущие ученые и специалисты научных и практических учреждений Роспотребнадзора, здравоохранения, Центров по профилактике и борьбе со СПИД, ряда других организаций из разных регионов страны.

Надеемся, что материалы конференции будут полезны как научным, так и практическим работникам службы Роспотребналзора и других ведомств, участвующих в обеспечении противоэпидемической защиты населения.

ОРГКОМИТЕТ
Всероссийской научно-практической конференции
«Инновационные технологии
в противоэпидемической защите населения»
28 мая 2014 г., г. Нижний Новгород

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ. ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА КОРЬЮ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Тураева Н.В., Цвиркун О.В.,Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т. …….....15

РОЛЬ ЗАВОЗНЫХ СЛУЧАЕВ В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ НА ЭТАПЕ СЕРТИФИКАЦИИ ЭЛИМИНАЦИИ ИНФЕКЦИИ
Бичурина М.А., Железнова Н.В., Тимофеева Е.В.…….....18

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
Удовиченко С.К., Топорков А.В., Топорков В.П. 22

КОНТРОЛЬ ЦИРКУЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ СРЕДИ ДЕТЕЙ ИЗ ОРГАНИЗОВАННЫХ КОЛЛЕКТИВОВ В ПОСТСЕРТИФИКАЦИОННЫЙ ПЕРИОД ЛИКВИДАЦИИ ПОЛИОМИЕЛИТА
Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р., Голицына Л.Н., Канаева О.И., Фомина С.Г. , Новикова Н.А. 25

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ В 2013 ГОДУ
Ковальчук И.В., Соломащенко Н.И., Романенко Е.Н., Зволибовская А.В., Дёмина Г.И. 29

К ВОПРОСУ О ПАТОГЕННОСТИ RICKETTSIA SIBIRICA SUBSP. BJ-90
Рудаков Н.В., Решетникова Т.А., Шпынов С.Н., Пеньевская Н.А., Абрамова Н.В., Кумпан Л.В. 31

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧСКОГО МОНИТОРИНГА ЗА ЛИХОРАДКОЙ ЗАПАДНОГО НИЛА В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНОЙ СИТУАЦИИ НА ПРИМЕРЕ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Матросов А.Н., Захаров К.С., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шилов М.М., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Попов Н.В. 34

СОВРЕМЕННАЯ СИТУАЦИЯ ПО КЛЕЩЕВОМУ ВИРУСНОМУ ЭНЦЕФАЛИТУ И ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗАМ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ РЕГИОНАХ ПРИВОЛЖСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА
Удовиков А.И., Рябова А.В., Тарасов М.А., Толоконникова С.И. 39

К ВОПРОСУ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА БРУЦЕЛЛЕЗОМ
Шакирова Л.И., Ляпустина Л.В. 42

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ПАЦИЕНТАМ С ТЯЖЕЛЫМИ ТРАВМАМИ В УСЛОВИЯХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА
Кузин А.А., Свистунов С.А., Огарков П.И. 45

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИСТАНЦИОННОГО ЗОНДИРОВАНИЯ ЗЕМЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ОЧАГОВ ГЛПС НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазова Л.А., Попов Н.В. 48

ЛЕПТОСПИРОЗЫ В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ
Самарина И.В., Семенко О.В., Лямкин Г. И., Свистунов В.М., Чайка А.Н., Аликова Г.А., Стариков А.М., Саяпин А.Г., Клюшин А.Н., Суворин В.В, Роньшина Н.В., Дубинин А.В. 52

МИКС-ГЕРПЕТИЧЕСКАЯ ИНФЕКЦИЯ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ВЗРОСЛЫХ ПРИ ОРВИ
Порываева А.П., Некрасова Т.С., Таршис М.Е., Смирнов Г.В. 55

ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ В СМОЛЕНСКОЙ ОБЛАСТИ
Попов В.П., Фомченкова О.Н., Ларченкова Н.В. 59

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ГИС-ТЕХНОЛООГИЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Полухина А.Н., Попов В.П. 61

ЭЛЕКТРОННАЯ «БАЗА ДАННЫХ (БД) ПО ЛЕПТОСПИРОЗАМ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ» И ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ЛЕПТОСПИРОЗАМИ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ
Самарина И.В., Чеботарева Е.Н., Семенко О.В., Лямкин Г.И., Манин Е.А. 63

СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ПРИРОДНЫХ И АНТРОПУРГИЧЕСКИХ ЛЗН НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ
Захаров К.С., Поршаков А.М. 66

БОКС БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ – ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ПЕРСОНАЛА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ
Шишкина О.Б., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Дятлов И.А. 69

ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ С ТРАНСМИССИВНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ (ПФО) В 2013 ГОДУ
Ершов В.И. 73

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН В 2013 ГОДУ
Камаева З.Р., Кучимова Н.А., Даянова З.Х., Абдрахманова В.С., Рожкова Е.В., Говорова В.Г. , Сыса А.М., Ибрагимов Ш.И. 75

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ МАНИФЕСТНОГО И ЛАТЕНТНОГО КОМПОНЕНТОВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ГЕПАТИТА С В Г. Н. НОВГОРОДЕ
Михайлова Ю.В., Быстрова Т.Н. 76

ИЗУЧЕНИЕ СМЕРТНОСТИ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ ОТ ИНФЕКЦИОННЫХ И ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
Сергеева А.В., Саперкин Н.В., Чубукова О.А., Ксенофонтова Т.В. 80

РАЗДЕЛ 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МОНИТОРИНГ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

ЗНАЧИМОСТЬ ОБСЛЕДОВАНИЯ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЦИРКУЛЯЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ
Фомина С.Г., Голицына Л.Н., Луковникова Л.Б., Морозова О.В., Сашина Т.А., Зверев В.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. 84

МОЛЕКУЛЯРНОЕ «СЕРОТИПИРОВАНИЕ» ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ В 2013 г.
Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Зверев В.В., Парфенова О.В., Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Григорьева Г.И. 88

ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ВОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ
Татарников С.А., Мазепа А.В. 92

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
Спицын А.Н., Уткин Д.В., Германчук В.Г., Осина Н.А. 94

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ И ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНЫ
Нафеев А.А., Салина Г.В., Мерцалова С.Л. 97

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Захарова Т.Л., Щербакова С.А. 101

РНГА С АНТИГЕННЫМИ ГИСТОПЛАЗМОЗНЫМ И КОКЦИДИОИДОМИКОЗНЫМ ДИАГНОСТИКУМОМ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ
Новицкая И.В., Куделина А.М., Дубина И.А., Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г. 104

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОРАДИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ
Епифанова Н.В., Луковникова Л.Б., Хохлова Н.М., Новикова Н.А., Княгина О.Н., Окунь И.Н. 106

РАЗДЕЛ 3. ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ТУЛЯРЕМИИ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. 110

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПРИЕМА ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ГОЛАРКТИЧЕСКОГО ПОДВИДА FRANCISELLA TULARENSIS С ПОМОЩЬЮ ПЦР
Сеничкина А.М., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А. 114

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ BRUCELLA MELITENSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН В 2012 Г.
Писаренко С.В., Нечаева Ю.Н., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Ульшина Д.В. 117

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS
Рыковская О.А., Чемисова О.С., Смоликова Л.М., Подойницына О.А., Непомнящая Н.Б., Чайка С.О. 119

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЯМОГО БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ BRUCELLA SPP
Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Ковалева Н.И., Воропаев В.В. 123

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ LEGIONELLA PNEUMOPHILA, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. КАЗАНИ В 2013 ГОДУ
Спицын А.Н., Портенко С.А., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Осина Н.А. 127

ИЗУЧЕНИЕ ХОЛЕРОГЕН-АНАТОКСИНА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
Спицын А.Н., Германчук В.Г., Киреев М.Н., Захарова Т.Л., Уткин Д.В., Осина Н.А. 130

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА
Бахарев А.А., Владимиров А.П., Малыгин А.С.,.Михайлова Ю.А, Бородин Е.М., Порываева А.П. 132

РАЗДЕЛ 4. ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВАКЦИН

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БРУЦЕЛЛЕЗА
Курчева С.А., Старцева О.Л. 138

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ «РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ» CD95, DR3 И DR6 ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ АПОПТОЗЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ
Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Филатова Е.Н., Уткин О.В. 140

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR7 НА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ, СТИМУЛИРОВАННЫХ ВАКЦИНАМИ IN VITRO
Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Бабайкина О.Н., Зобова С.В. 144

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л. 147

ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОЙ ФЛОУРЕСЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПРОТИВЭПИТОПОВ ГЛИКОПРОТЕИНА И КАПСУЛЫ Burkholderiapseudomallei
Храпова Н.П., Замарина Т.В, Агеева Н.П., Молчанова Е.В., Прохватилова Е.В., Корсакова И.И., Пименова Е.В., Ким Е.Э. 150

ОПЫТ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В
Матвеичев А.В., Плеханова М.В., Талаев В.Ю., Цыганова М.И., Кузнецов К.В., Коршунова Е.А., Никитина З.И., Мохонова Е.В., Коптелова В.Н., Павлова Н.П. 154

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
Руднева Е.И., Маянский А.Н. 157

РАЗДЕЛ 5. ОБЩАЯ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ БИОСИСТЕМ. ПРОБИОТИКИ И ЗДОРОВЬЕ

ОЦЕНКА СИНДРОМА ИЗБЫТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО РОСТА В ТОНКОЙ КИШКЕ У БОЛЬНЫХ С ХЕЛИКОБАКТЕР-АССОЦИИРОВАННОЙ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ
Перфилова К.М , Денисенко Т.Л., Неумоина Н.В., Неумоина М.В., Шутова И.В., Ефимова Е.И., Ларионова Т.В., Трошина Т.А. 160

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ РОТОГЛОТКИ И КИШЕЧНИКА У ЧАСТО И ЭПИЗОДИЧЕСКИ БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ
Затевалов А.М., Селькова Е.П., Алешкин А.В., Медведева Е.А., Мескина Е.Р., Феклисова Л.В. 163

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ
Белова И.В., Точилина А.Г., Гелашвили Д.Б., Соловьева И.В., Пожидаева А.С., Жирнов В.А., Иванова Т.П. 167

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ HELICOBACTER PYLORI ПРИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ ПАТОЛОГИИ
Исаева Г.Ш., Селькова Е.П., Алёшкин В.А. 172

ДИСБИОЗ СЛИЗИСТОЙ НОСОГЛОТКИ КАК ИНДИКАТОР ФОРМИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ В ОРГАНИЗОВАННОМ КОЛЛЕКТИВЕ
Кичикова В.В., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б. 176

ПАТОГЕННЫЕ И АЛЛЕРГЕННЫЕ ГРИБЫ КАК ФАКТОРЫ РИСКА
Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Лисовская С.А., Паршаков В.Р. 180

СВОЙСТВА СПОРООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ СКОТОМОГИЛЬНИКА В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ
Шишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. 183

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ КОНЦЕПЦИИ «ПРОБИОТИКИ»
Шендеров Б.А. 187

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛАКТОСОДЕРЖАЩИХ ПРОБИОТИКОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА
Леонтьева Н.И., Щербаков И.Т., Грачева Н.М., Хренников Б.Н., Соловьева А.И. 191

АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА В ПОПУЛЯЦИОННОМ БИОТОПЕ ЧЕЛОВЕКА
Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Байракова А.Л., Беликова Е.В., Агапова Ю.В., Алешкин В.А., Афанасьев М.С., Караулов А.В. 196

ЗНАЧЕНИЕ НУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА-kB И МИТОГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ КИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ АДГЕЗИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ С CANDIDA ALBICANS
Лукова О.А., Александрова Н.А., Заславская М.И. 200

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ (ПО РЕЗУЛЬТАТМ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ОБЗОРА)
Саперкин Н.В., Сидорова Н.Н., Алебашина Л.А. 202

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЭНТЕРОКОККОВ И СТАФИЛОКОККОВ НА МЕЖКЛЕТОЧНУЮ АДГЕЗИЮ В СИСТЕМЕ «CANDIDA ALBICANS – БУККАЛЬНЫЕ ЭПИТЕЛИОЦИТЫ»
Александрова Н.А., Махрова Т.В., Заславская М.И. 206

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ UREAPLASMA UREALYTICUM И MYCOPLASMA HOMINIS, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН НИЖНЕГО НОВГОРОДА
Бруснигина Н.Ф., Колесникова Е.А. 208

РАЗДЕЛ 6. БИОТЕХНОЛОГИЯ СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ, ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И СРЕДСТВОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.

РЕАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПОДХОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ДИЗАЙНА ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БИОЧИПОВ
Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Уткин О.В.. 213

МЕМБРАННО-КОНЬЮГАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
Вачаев Б.Ф., Яговкин Э.А., Твердохлебова Т.И., Юрьева И.Л., Алешукина 217

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/H5N1
Василенко Н.Ф., Заревина Л.И., Жарникова И.В., Юркина И.В., Коготкова О.И., Зуенко А.А., Шестопалов А.М., Золотых С.И., Марченко В.А., Игнашкина М.Б. 221

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НОВЫМ СПОСОБОМ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ТЕЛ К НЕЙ
Захарова Т.Л., Михеева Е.А., Осина Н.А., Смирнова Н.И. 224

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА
Новикова Л.И., Волков А.В., Алешкин В.А, Матвеевская Н.С., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Синчугова Т.В. 227

ТЕХНОЛОГИЯ ВЫСУШИВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДНК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ
Степанов А.В., Майоров Н.В., Осина Н.А., Матвеева Ж.В., Никифоров А.К. 231

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ В РНГА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТАРНОГО ХОЛЕРНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМ
Куделина А.М., Кулаков М.Я., Новицкая И.В., Ларионова Л.В., Терентьев А.Н., Кругликов В.Д., Дубина И.А. 235

ФАРМАКОКИНЕТИКА ЛИПОСОМАЛЬНОГО МЕРОПЕНЕМА
Лучинин Д.Н., Ротов К.А., Тихонов С.Н., Снатёнков Е.А. 238

К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА КОМПОЗИЦИОННОГО ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНОГО МИКРОГРАНУЛИРОВАННОГО МАГНОСОРБЕНТА
Старцева О.Л., Курчева С.А., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. 239

ПРИРОДНЫЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ КАК АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ
Киреев М.Н., Овчинникова М.В., Аленкина Т.В., Уткин Д.В., Ерохин П.С., Полунина Т.А., Касьян И.А., Никифоров А.К. 241

КОНТРОЛЬ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Шульгина И.В., Галетова С.С., Лобовикова О.А., Холматов К.И. 243

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ СТЕРИЛИЗУЮЩЕЙ ФИЛЬТРАЦИИ ХОЛЕРОГЕНА-АНАТОКСИНА
Васин Ю.Г., Еремин С.А., Перепелица А.И., Комиссаров А.В., Ульянов А.Ю., Никифоров А.К. 247

РИСК – МЕНЕДЖМЕНТ КАК ЭЛЕМЕНТ УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К. 248

РАЗДЕЛ 7. АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРОФИЛАКТИКИ, ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

ЭПИДЕМИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ПФО: ОСОБЕННОСТИ 2013 ГОДА
Зайцева Н.Н., Альтова Е.Е., Носов Н.Н. 252

ИНТЕГРАЦИЯ ДЕТЕЙ, ЗАТРОНУТЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, В ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО МАССОВОЙ ШКОЛЫ – АКУАЛЬНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
Кузоватова Е.Е., Носов Н.Н., Гладышева О.С. 256

ЖЕНЩИНЫ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК, ВЫЯВЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ
Вехова Е.В., Спирин А.В., Агафонова О.В., Садыкова Г.Б., Широбокова О.И., Мальшина И.В. 260

ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ
Щербаков А.А., Семенов О.П., Кочерова И.В. 264

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КРИПТОКОККОЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН
Шахбазова Е.Н., Жадько Е.Н., Котляр Е.Ю., Захарова О.С., Килина Л.Н., Нагимова Ф.И., Галиуллин Н.И. 267

ДОРОЖНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА МОДЕРНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ПРОФИЛАКТИКИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (СЗЗ) В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ
Сопина Н.В., Рыбалкин С.Б., Олейник С.В., Федосеева Н.С. 271

РАЗДЕЛ 1.
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ. ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА КОРЬЮ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Тураева Н.В., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

natalya-turaeva@yandex.ru

С 2007 года в рамках реализации программы ликвидации кори в России введена дополнительная форма слежения за заболеваемостью корью – поиск возможно пропущенных случаев кори среди пациентов с пятнисто-папулезной сыпью и лихорадкой [1]. Данное мероприятие предусматривает обследование на наличие IgM к вирусу кори пациентов с лихорадкой пятнисто-папулезной сыпью не коревой этиологии («экзантемные» больные). Количество обследованных определяется из расчета 2 на 100 тыс. нас. Ежегодно обследуется 2800 человек [3].

С 2007 года показатель заболеваемости корью складывался из случаев, выявленных при рутинном и активном надзоре. Введение активного надзора за корью в масштабах страны происходило на фоне стабилизации показателя заболеваемости на спорадическом уровне.

На протяжении всего периода проведения активного надзора выполнение плана обследования пациентов с пятнисто-папулезной сыпью и лихорадкой в стране в целом колебалось от 55% (2007 г.) до 122% (2011 г.).

Результаты использования активного надзора за корью в масштабах страны за период с 2007 по 2012 гг. представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты лабораторного обследования пациентов с пятнисто-папулезной сыпью и лихорадкой в 2007–2012 гг.

Годы	**Количество обследованных**	**Из них случаев кори (IgM+)**	
		Абс.	**% (от числа обследованных)**
2007	2936	15	0,5±0,1
2008	2820	5	0,2±0,08
2009	2892	15	0,5±0,1
2010	3312	9	0,3±0,09
2011	3423	57	1,6±0,2
2012	2663	72	2,8±0,3
Всего	18046	173	0,96±0,07

Из таблицы видно, что случаи кори, выявленные активно, ежегодно увеличивали абсолютное число больных корью, зарегистрированных при рутинном надзоре, приближая тем самым к регистрации истинного уровня заболеваемости .

Доля активно выявленных случаев кори колебалась от 0,2% в 2008 году до 2,8% в 2012 от общего числа обследованных. За анализируемый период обследовано 18046 человек, активно выявлено 173 больных корью, что составило 0,96% от числа обследованных. Ежегодное выявление, в среднем, 29 случаев кори позволило подтвердить отсутствие случаев на 84% (70) территорий страны.

Поскольку, активный надзор предусматривал выявление пропущенных случаев кори среди пациентов с различными диагнозами, диапазон первичных диагнозов не ограничивался, главное, чтобы заболевание у обследуемого характеризовалось наличием основных симптомов – пятнисто-папулезной сыпи и лихорадки. Всего за период проведения активного надзора (2007–2012 гг.) было обследовано 18046 пациентов с более чем тридцатью различными нозологиями.

Изучение поименных списков обследованных пациентов с ЭЗ из лабораторий 10 Региональных центров показало, что перечень первичных диагнозов был широким. Наибольшее число обследованных больных приходилось на пациентов с диагнозом краснуха – 4168, их доля от числа всех обследованных составила 23,2%.

Таким образом, сочетание нового способа проведения надзора за корью – активного поиска случаев кори среди больных с экзантемой и лихорадкой и традиционного – рутинного эпидемиологического надзора обеспечивает повышение чувствительности ЭН. Каждый год в ходе проведения такого поиска больных корью среди пациентов с лихорадкой и пятнисто-папулезной сыпью к случаям кори, выявленным при рутинном надзоре, добавлялось некоторое число больных корью, ранее не учитываемых, что, безусловно, приближало к регистрации истинного числа случаев кори в стране. Использование метода активного поиска больных корью позволило получить обоснованное доказательство отсутствия местных случаев кори на большинстве территорий Российской Федерации.

Наличие тенденции к снижению заболеваемости корью в стране в целом, увеличение числа территорий, достигших и поддерживающих 95% охват прививками ЖКВ в декретированных возрастах, отсутствие заболеваемости на большинстве территорий РФ свидетельствовали о возможности достижения устойчивого спорадического уровня заболеваемости. Требовалась разработка дополнительных мероприятий по совершенствованию ЭН за корью в части подтверждения отсутствия случаев заболевания и выявления возможных пропущенных случаев. Таким мероприятием явилось введение активного надзора.

Внедрение в практику здравоохранения в 2012 г. интегрированного эпидемиологического надзора за корью и краснухой явилось одной из причин пересмотра критерия выборки при активном поиске больных корью в сторону

его уменьшения до 1 на 100 тыс. нас., поскольку обследования больных с первичным диагнозом «краснуха», доля которых на протяжении всего периода (2007–2011 гг.) была высока, в рамках АН стало не возможным.

В процессе проведения активного эпидемиологического надзора за корью были определены территории, ежегодно выполняющие план обследования «экзантемных» больных и территории, которые план обследования выполняли не всегда. Нередко причинами этого являлись сложности с доставкой материала в региональные центры и отсутствие достаточного числа лиц с необходимой симптоматикой. В связи с этим было проведено сопоставление территорий с учетом фактического количества обследованных пациентов с лихорадкой и пятнисто-папулезной сыпью. В результате было сформировано две группы территорий: **первая группа** – это территории, которые в силу различных причин не выполняли план обследования. Как правило, число обследованных не превышало половины требуемого количества (Калужская, Смоленская, Ленинградская, Волгоградская, Тюменская, Московская области, республика Дагестан). Территории, где план обследования регулярно выполняли и даже перевыполняли, составили **вторую группу** территорий (Тверская, Воронежская, Ульяновская, Курская, Самарская, Томская, Р. Карачаево-Черкессия, Р. Марий–Эл, ХМАО). На всех территориях сохранялся спорадический уровень заболеваемости, заносы с других территорий нашей страны и импортирование случаев кори не сопровождалось вторичным распространением инфекции. Это давало возможность оценить и сопоставить уровень заболеваемости корью при рутинном и активном надзоре на территориях при разных выборках числа обследованных лиц.

Заболеваемость корью при проведении активного надзора в первой группе территорий составил 0,09 на сто тысяч населения, при рутинном надзоре – 35,2, во второй группе территорий – 0,06 и 1,0 на сто тысяч населения соответственно. При этом долевое соотношение заболевших корью, выявленных при активном и рутинном надзорах, в первой группе территорий, составило 2,5 : 97,5%, а во второй соответственно – 6,0: 94,0%.

Статистические расчеты показали, что разница показателей заболеваемости корью была достоверна, как при выборке обследования 2 на сто тысяч ($t=9,6$), так и при выборке из расчета 1 пациент на 100 тысяч ($t=6,4$),что свидетельствует о получении достоверных результатов при меньшей выборке. При оценке достоверности различий интенсивных показателей заболеваемости корью, выявленной при активном надзоре, в 1 и 2 группе территорий, было установлено, что различие сравниваемых показателей статистически недостоверно ($t= 0,003$) и выборки могут быть взаимозаменяемыми.

Таким образом, наши исследования показали, что выполнение плана обследования «экзантемных» больных на 50%, не приводит к потере данных о заболеваемости, а отсутствие статистически значимых различий интенсивных показателей заболеваемости в группах с различными выборками, подтверждает возможность изменения количественного критерия обследования лиц с пятнисто-папулезной сыпью и лихорадкой на 1 на 100 тысяч населения. Сокращение числа обследуемых при активном эпидемиологическом надзоре тем более

своевременно, поскольку с 2012 года каждый случай краснухи подлежит обязательному индивидуальному учету и лабораторному подтверждению диагноза.

Выводы.

1. Сочетанное использование рутинного и активного надзора в масштабах всей страны повысило эффективность эпидемиологического надзора за корью при выявлении случаев их расследования и лабораторного подтверждения диагноза.

2. Обследование лиц с пятнисто-папулезной сыпью и лихорадкой из расчета 1 на 100 тысяч населения позволяет получить достоверные сведения об отсутствии пропущенных случаев кори, а также рационально использовать ресурсы лабораторной сети.

3. Уменьшение количества обследованных лиц в рамках проведения активного эпидемиологического надзора не приводит к потере информации о заболеваемости корью.

Литература:

1. Герасимова А.Г., Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Чава О.О. Эпидемиологический надзор за корью в период элиминации.// «Эпидемиология и Вакцинопрофилактика». – 2008. – № 4 (41). – с. 8–12.

2. Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Садыкова Д.К. и др. Роль эпидемиологического надзора за корью в период ее ликвидации. // Материалы Третьей международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями». – СПб., – 2003. – С. 3.

3. Тураева Н.В., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Лыткина И.Н., Ежлова Е.Б. Тактикаэпидемиологического надзора за корью в период элиминации // ЖМЭИ. – 2011. – № 3. – с. 10–14.

РОЛЬ ЗАВОЗНЫХ СЛУЧАЕВ В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ КОРЬЮ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ НА ЭТАПЕ СЕРТИФИКАЦИИ ЭЛИМИНАЦИИ ИНФЕКЦИИ

Бичурина М.А. [1], Железнова Н.В. [1], Тимофеева Е.В. [2]

[1] ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург

[2] Управление Роспотребнадзора по Санкт-Петербургу

poliospb@nr3854.spb.edu

В 2002 г. Европейским региональным бюро ВОЗ был разработан Стратегический план элиминации кори, краснухи и врождённой краснухи к 2010 году [6]. В связи с ростом заболеваемости корью и возобновлением циркуляции эндемичных штаммов вируса кори для многих стран Европы [10, 11, 12] решением 60-й сессии Европейского регионального комитета ВОЗ срок

достижения цели элиминации указанных инфекций в Европейском регионе был перенесён на 2015 год. Успехи в борьбе с корью в Российской Федерации, позволили в 2002 году принять Национальную программу ликвидации кори к 2010 г. [3].

В период 2003–2007 гг. в России наблюдалась циркуляция штаммов вируса кори генотипа D6 [13]. Впоследствии циркуляция штаммов данного генотипа была прервана, в период 2008–2010 гг. на территориях Северо-запада РФ, как и в Российской Федерации в целом, заболеваемость корью сохранялась на крайне низком уровне и была обусловлена импортированием вируса кори разных генотипов из эндемичных по данной инфекции регионов земного шара.

В ходе выполнения Национальной программы к 2011 г. на большинстве территорий РФ и на всех территориях Северо-Западного федерального округа (СЗФО) были достигнуты показатели, которые позволили Национальной сертификационной комиссии признать на 01.01.2011, что в целом по России территории свободны от эндемичной кори [1, 4, 7, 8]. Однако, в 2011–2012 годах заболеваемость корью на ряде территорий Центрального, Северокавказского и Южного Федеральных округов выросла.

Имело место повышение заболеваемости корью и в Северо-Западном Федеральном округе за счёт вспышки кори в одной из детских больниц Санкт-Петербурга [2].

Анализ заболеваемости кори проводили на основе сведений, полученных из формы государственной статистической отчётности № 2 и оперативной ежедневной и еженедельной информации.

Проведён анализ карт эпидемиологического расследования всех случаев кори с лабораторно подтверждённым диагнозом. Осуществлён забор материала (сыворотки крови, мазки из носоглотки, моча) от больных с диагнозом «корь» и «корь?». Все сыворотки крови от больных корью были взяты на 4–7 дни от момента появления сыпи и доставлены в вирусологическую лабораторию Санкт-Петербургского регионального центра (СПб РЦ) в течение трёх суток от даты забора крови. Исследование сывороток проводили в ИФА с тест-системами IgM-корь фирмы «Вектор Бест» [5, 9].

В вирусологической лаборатории Национального научно-методического центра (ННМЦ) по надзору за корью и краснухой молекулярно-генетическим методом (ПЦР и секвенирование генома) исследован биологический материал от больных корью с территорий Северо-запада России.

В 2010 году в СЗФО зарегистрировано 3 случая кори в Санкт-Петербурге у лиц, возвратившихся после отдыха в Европе (Греция, Германия). У больных был выделен и идентифицирован штамм вируса кори генотипа D4 «Enfield 2007», широко циркулировавший в Западной Европе. В 2011 году продолжался процесс импортирования кори на территории СЗФО (Санкт-Петербург, Ленинградская и Калининградская области). Из семи зарегистрированных в 2011 г. случаев кори один случай был завозной у жителя Узбекистана, у которого выделен вирус кори генотипа D4 «Иран 2010». Остальные шесть случаев были связаны с импортированием из стран Европы. У двух больных были выделены и идентифицированы штаммы вируса кори генотипа G-3, у остальных обнаружены вирусы кори генотипа D4 «Enfield 2007».

В 2012 г. ситуация по кори в СЗФО резко изменилась. Помимо импортирования вирусов кори на территории СЗФО из разных стран имели место многократные завозы кори с территорий Российской Федерации, прежде всего из республик Северного Кавказа (Чеченская, Дагестан и Карачаево-Черкесская). Завозы кори были зафиксированы в Санкт-Петербурге, Республике Коми, Вологодской и Мурманской областях. Из материала от больных были выделены и идентифицированы штаммы вируса кори генотипа D4 «Иран 2010», широко циркулировавшего в 2012 г. на многих территориях России. Кроме того, в Мурманскую область из Украины был завезён вирус кори генотипа D4 «Enfield 2007».

Большая вспышка кори (94 случая) была зарегистрирована в Санкт-Петербурге в результате заноса инфекции в детскую больницу пациентом, прибывшим из Чеченской Республики. Распространению инфекции способствовали поздняя диагностика и изоляция первого заболевшего корью, который был госпитализирован в отделение, где было сосредоточено большое количество детей, не привитых против кори по возрасту или по состоянию здоровья. Среди заболевших 62% составляли дети, которые в 93% случаев не были привиты или по возрасту, или по медицинским показаниям. Клиническая картина у не привитых характеризовалась типичным течением, в основном, среднетяжёлой формой заболевания, тяжёлые случаи отмечены у 3,5% детей, осложнения в виде пневмонии, острого бронхита, острого отита зарегистрированы у 10,5% пациентов. Среди привитых взрослых у 42% лиц была зафиксирована лёгкая форма течения заболевания без осложнений.

Из биологического материала от источника инфекции, больных, связанных с источником в очаге, и от больных, напрямую не связанных с этим очагом, были выделены и идентифицированы 7 штаммов вируса кори. Все штаммы вируса кори принадлежали к генотипу D4 генетической линии «MVi/Bandarabas.IRN/05.10/2» (D4 «Иран 2010») и представлены тремя генетическими вариантами, циркулировавшими в Санкт-Петербурге в январе-феврале, марте и июне 2012 г. соответственно.

В период вспышки кори в детской больнице Санкт-Петербурга от случаев, эпидемиологически связанных с завозом инфекции из Чеченской Республики, были изолированы штаммы, идентичные штамму «MVi/Bandarabas.IRN/05.10/2». В марте 2012 года был изолирован штамм, отличающийся от ранее выделенных штаммов наличием дополнительной нуклеотидной замены. Идентичные штаммы также были изолированы в аналогичное время в Самаре, Нижнем Новгороде, Ульяновске, Ярославле и Иваново. В июне 2012 года от случаев, эпидемиологически связанных с повторным завозом кори в Санкт-Петербург из Чеченской Республики был изолирован новый генетический вариант вируса, который также был выделен в городах Орел и Саратов.

Штаммы генетической линии «MVi/Bandarabas.IRN/05.10/2», которые были впервые выделены в Иране в 2010 гдду, до ноября 2010 года на территории России не изолировались. Вследствие импортирования штаммов указанной генетической линии в 2010 году в Узбекистан с последующим завозом кори из Узбекистана в Казахстан, Кыргызстан и Российскую Федерацию

во всех перечисленных странах в период 2010–2012 гг. наблюдался подъем заболеваемости корью, обусловленный активной местной циркуляцией этих штаммов.

Вместе с тем вспышка кори в Санкт-Петербурге могла обусловить распространение инфекции, вызванной вирусом кори генетической линии «MVi/Bandarabas.IRN/05.10/2», на территории России. Так, случай кори, зарегистрированный в Хабаровске, был эпидемиологически связан со вспышкой кори в Санкт-Петербурге.

В 2013 г. зарегистрировано 32 случая кори (показатель – 0,24 на 100 тысяч населения). Имели место 3 случая групповых заболеваний в Архангельской области (3 больных в городской больнице для взрослых, 5 больных в религиозной общине и 2 больных с общим местом жительства). Первые случаи заболевания во всех очагах были завозными (Москва, Таиланд и Индия), в дальнейшем имело место распространение инфекции. В всех очагах этиологический агент подтвержден серологическим (ИФА) и молекулярно-генетическим методами. Определен вирус кори генотипа D8. В Санкт-Петербурге было зарегистрировано 15 случаев кори, из них 9 завозных случаев. Больные прибыли из субъектов РФ Южного федерального округа и из зарубежных стран. Случаи кори с неустановленным источником заражения были выявлены у трёх человек. Не зарегистрированы случаи кори у контингентов профессионального риска заболевания корью. Все случаи подтверждены серологическим и молекулярно-генетическим методами, в одном очаге выявлен вирус кори генотипа D4, в остальных случаях – вирус кори генотипа D8. В Республике Коми зарегистрировано 3 случая кори, из них 2 были завозными и один связан с ними, этиологическим агентом явился вирус кори генотипа D8. В Калининградской области было зарегистрировано 2 случая кори, один из них был завозным, второй связан с завозным. Диагноз был подтвержден серологическим методом.

Таким образом, бурные внешние и внутренние миграционные процессы способствовали завозу и распространению кори на ряде территорий СЗФО на этапе сертификации ликвидации инфекции.

Литература:

1. Бичурина М.А., Железнова Н.В., Лялина Л.В. и др. Успехи и проблемы на этапе сертификации территорий СЗФО на отсутствие эндемичной кори // Инфекция и иммунитет. – 2012. – т. 2. – № 1–2. – С. 503–504.

2. Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В. и др. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 г. // Инфектология. – 2013. – т. 5. – № 2. – С. 96–102.

3. Национальная программа ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 г. // Приказ МЗ РФ № 270 от 19.08.2002.

4. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Лазикова Г.Ф. и др. Реализация программы ликвидации кори в Российской Федерации // Журн. микробиол. – 2011. – № 4. – С.51–56.

5. Санитарные правила СП 3.1.2952-11 «Профилактика кори, краснухи и эпидемического паротита».

6. Стратегический план Европейского региона ВОЗ 2005-2010 гг. – ВОЗ, 2005. – 31 с.

7. Тихонова Н.Т, Герасимова А.Г., Ежлова Е.Б. и др. Элиминация кори в Российской Федерации // Материалы международной конференции. Санкт-Петербург, 2010. – С. 80.

8. Тихонова Н.Т., Ежлова Е.Б., Герасимова А.Г и др. Проблемы элиминации кори в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. – 2012. – т. 2. – № 1–2. – С. 522–523.

9. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. – 2nd ed. – Geneva // WHO. – 2006. – P. 22.

10. Measles and rubella surveillance // Bulletin WHO. – February 28, 2008.

11. Measles and rubella surveillance // Bulletin WHO. – April 30, 2008.

12. Morbidity and mortality // Weekly Report. – CDC. – May 24, 2011.

13. Shulga S.V., Rota P.A., Kremer J.R. et al. Genetic variability of wild-type measles viruses, circulating in the Russian Federation during the implementation of the National Measles Elimination Program, 2003–2007 // Clin Microbiol Infect. – 2009. – № 15 (6). – P. 528–537.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ.

Удовиченко С.К., Топорков А.В., Топорков В.П.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

В настоящее время вопрос обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и биологической безопасности населения при организации и проведении крупных политических, культурных, спортивных мероприятий – «массовых мероприятий» является одной из чрезвычайно актуальных проблем здравоохранения. Массовые мероприятия с международным участием (далее – ММ) представляют собой события, которые могут непосредственно поставить под угрозу здоровье населения, повысить уровень тревоги в обществе и явиться причиной нарушения экономических связей на местном, региональном или глобальном уровнях [2].

Потенциальные эпидемиологические риски при проведении ММ включают в себя:

– занос приезжающими участниками и гостями инфекционных болезней, способных вызвать чрезвычайную ситуацию в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения (далее – ЧС),

– активизация инфекционных болезней, эндемичных для места проведения ММ,

– применение патогенных биологических агентов с террористической целью,

– возникновение эпидемических осложнений в результате увеличения нагрузки на коммунальные системы жизнеобеспечения населения, сети общественного питания и медицинские службы.

Существующая в мире система мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при проведении ММ (система управления рисками), включает в себя эпидемиологический надзор и контроль (система мониторинга и анализа), контроль за санитарным состоянием и безопасностью окружающей среды, мероприятия по локализации и ликвидации ЧС санитарно-эпидемиологического характера. Вместе с тем, «белым пятном» в организационно-методическом отношении является оценка потенциальных эпидемиологических рисков для конкретных ММ, учитывающая его специфику, место и время проведения.

Ретроспективный анализ 37 событий (18 спортивных, 13 культурных, 4 религиозных, 2 политических), организованных в мире в период с 1987 по 2012 год демонстрирует реальную опасность осложнения эпидемиологической обстановки. Вспышки инфекционных болезней отмечались в 75% случаях, 46% из которых были завезены приезжающими участниками и гостями.

Актуальность данной проблемы приобретает особое значение в связи с организацией в России таких ММ, как XXVII Всемирная летняя Универсиада 2013 г. в Казани и XXII Олимпийские и XI Паралимпийские игры в 2014 г. в Сочи, Чемпионат мира по водным видам спорта в 2015 г., Чемпионат мира по футболу в 2018 г.

Нами была разработана методика определения потенциальной эпидемической опасности (далее – ПЭО) ММ на основе комплексного анализа эпидемиологического риска по актуальным инфекционным болезням, являющимися внешними и (или) внутренними угрозами биологической безопасности по отношению к месту его проведения. Объективным приемом анализа эпидемиологического риска послужила оценка 4-х его составляющих, предложенных Беляковым В.Д. [1] и Черкасским Б.Л. [4] – территория риска, факторы риска, время риска, контингенты риска с учетом клинико-эпидемиологической характеристики болезней (тяжесть клинического течения, летальность, принадлежность возбудителя к бактериальной, вирусной, риккетсиозной природе, различным группам патогенности, механизм передачи, длительность инкубационного периода, индекс контагиозности, эффективность диагностики, лечения и профилактики).

Комплексная оценка эпидемиологических рисков была выполнена по отношению к инфекционным болезням, способным в соответствии с ММСП (2005 г.) и национальными СП 3.4.2318–08, вызвать ЧС в области общественного здравоохранения, а также новым (ранее неизвестным) нозологическим формам (грипп птиц А (H7N9), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома). При этом были дифференцированы низкий, средний и высокий уровни эпидемиологического риска, а, следовательно, ПЭО [3].

Функциональность разработанной методики продемонстрирована при подготовке и проведении Универсиады-2013 в Казани. Уровень ПЭО был

определен как высокий в отношении холеры и малярии, средний – желтой лихорадки и лихорадки денге, низкий – геморрагических лихорадок Ласса, Эбола и Марбург, гриппа птиц А (H7N9) и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома.

Ранжирование актуальных инфекционных болезней по степени ПЭО для ММ позволило целенаправленно провести мероприятия по предупреждению их заноса и распространения (усиление эпидемиологического надзора, мероприятий по санитарной охране территории, направленных на предотвращение заноса и распространения инфекционных болезней, отработаны алгоритмы проведения противоэпидемических, лечебно-диагностических и профилактических мероприятий в случае выявления больного опасной инфекционной болезнью в условиях ММ, алгоритмы индикации и идентификации возбудителей опасных инфекционных болезней в пробах клинического материала и окружающей среды; проведены инвентаризация, паспортизация эпидемиологически значимых объектов Универсиады (около 500) и их учет в формате ГИС, привлечения модернизированной специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) РосНИПЧИ «Микроб» с целью усиления эпидемиолого-диагностического направления и лабораторной службы).

Комплексная оценка эпидемиологического риска была проведена и в отношении внутренних угроз для санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Установлено, что в период проведения Универсиады-2013 в Казани была высока вероятность активизации ГЛПС, умеренный риск определен в отношении лихорадки Западного Нила и клещевого боррелиоза, низкий – клещевого вирусного энцефалита. На основании проведенной комплексной оценки выполнена дифференциация территорий по степени ПЭО, предложен методический подход к неспецифической профилактике природно-очаговых инфекционных болезней, определены рациональные объемы, характер и сроки проведения профилактических мероприятий.

Таким образом, заблаговременная оценка эпидемиологических рисков при подготовке к ММ позволила определить приоритетные направления, рассчитать силы, средства, организационный ресурс, методологический и технологический арсенал, что в конечном итоге обеспечило сохранение благополучной эпидемиологической обстановки во время проведения Универсиады-2013. Опыт оценки ПЭО ММ может быть применен при подготовке к другим ММ, проведение которых запланировано на территории Российской Федерации.

Литература:

1. Беляков В.Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы // ЖМЭИ. – 1985. – Вып. 5. – С. 53–58.

2. Глобальные массовые мероприятия: их значение и возможности для обеспечения безопасности здоровья в мире. Доклад ВОЗ; 2011. 9 с. [электронный ресурс]. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/25910/1/B130_17-ru.pdf (дата обращения: 10.08.2013 г.).

3. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Куклев Е.В., Кедрова О.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Попов Н.В., Князева Т.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка потенциальной эпидемической опасности международных массовых мероприятий по актуальным инфекционным болезням // Пробл. особо опасных инф. – 2013. – Вып. 3. – С. 29–39.

4. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. – М.: Практическая медицина, 2007. – 480 с.

КОНТРОЛЬ ЦИРКУЛЯЦИИ ПОЛИОВИРУСОВ И НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ СРЕДИ ДЕТЕЙ ИЗ ОРГАНИЗОВАННЫХ КОЛЛЕКТИВОВ В ПОСТСЕРТИФИКАЦИОННЫЙ ПЕРИОД ЛИКВИДАЦИИ ПОЛИОМИЕЛИТА

Романенкова Н.И. [1], Бичурина М.А. [1], Розаева Н.Р. [1], Голицына Л.Н. [2], Канаева О.И. [1], Фомина С.Г. [2], Новикова Н.А. [2]

[1] ФБУН « Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург

[2] ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород

Использование оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ) для массовой вакцинации в целях ликвидации полиомиелита эффективно блокирует трансмиссию в популяции диких полиовирусов, но в редких случаях может приводить к возникновению вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП). Возможность циркуляции и трансмиссии вакцинных полиовирусов особенно высока среди ослабленных детей, которые находятся в стационарах [2,5], а также среди детей, проживающих в детских учреждениях [1,4] закрытого типа. При заносе полиовирусов извне в детские дошкольные учреждения может возникнуть угроза здоровью находящихся там восприимчивых (не привитых или не полностью привитых) детей. Этим обусловлена необходимость контроля циркуляции полиовирусов, а также неполиомиелитных энтеровирусов у детей, посещающих детские учреждения или проживающих в них.

Вирусологическим методом были исследованы пробы фекалий от 164 здоровых детей, проживающих в 3 дошкольных детских учреждениях и от 100 детей, посещающих 8 дошкольных детских учреждений, расположенных на разных территориях Северо-западного Федерального округа (СЗФО). Выделение и идентификацию полиовирусов (ПВ) и неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) проводили с помощью стандартных процедур, рекомендованных ВОЗ [8]. Внутритиповую дифференциацию проводили в Ре-

гиональной референс лаборатории по диагностике полиомиелита (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова, Москва) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [11,12].

Обнаружение РНК энтеровирусов в пробах фекалий осуществляли методом ОТ-ПЦР с помощью диагностической тест-системы «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ЦНИИЭ, Москва). Определение серотипа энтеровируса проводили путём частичного секвенирования области генома VP1[7]. Определение нуклеотидной последовательности проводили в автоматическом режиме на секвенаторе ABIPrism 3100. Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения MEGA 5.0 [10].

Из проб фекалий от детей, проживающих в детских дошкольных учреждениях, было выделено 8 полиовирусов, средняя частота выделения была равна 4,9%. Из проб от детей, посещающих детские дошкольные учреждения, был изолирован один полиовирус. Распределение полиовирусов по серотипам было следующим. Один полиовирус был отнесен к серотипу 1, 5 полиовирусов принадлежали к серотипу 2 и 3 – к серотипу 3. Согласно результатам внутритиповой дифференциации все выделенные полиовирусы оказались вакцинными штаммами Сэбина. Случаев паралитических заболеваний среди детей из учреждений, в которых проведено исследование, не было зафиксировано.

Присутствие полиовирусов в организме детей, проживающих в детских дошкольных учреждениях, явилось результатом заноса этих вирусов в учреждение извне либо ребенком, возвратившимся из стационара и сразу помещенным в свою группу, либо вновь поступившими детьми с неизвестным вакцинальным статусом, сроки изоляции для которых не были выдержаны. У одного ребенка, посещающего детское дошкольное учреждение и получившего 5 доз полиомиелитной вакцины, был выделен полиовирус серотипа 2, который был получен им вследствие контакта в семье с недавно привитым оральной полиомиелитной вакциной ребенком.

Предыдущими исследованиями показана возможность длительной персистенции и циркуляции вакцинных и вакцинно-родственных штаммов полиовирусов среди детского населения с высоким уровнем охвата вакцинацией ОПВ [9]. Описаны случаи распространения в стационарах и детских учреждениях закрытого типа полиовирусов с разной степенью антигенной изменчивости от детей, недавно привитых ОПВ, или от больных вакциноассоциированным паралитическим полиомиелитом среди контактных лиц, которые были не привиты, или не полностью привиты [2,3,4,5].

Возможность возникновения случаев ВАПП у детей из закрытых учреждений [2] еще недавно была весьма высокой. Использование в Российской Федерации с 2006 года для вакцинации детей из закрытых учреждений и всех детей первого года жизни (первая и вторая прививки) только инактивированной полиомиелитной вакцины (ИПВ) позволило снизить риск развития паралитических форм заболевания. Проведенное нами исследование показало, что и в настоящее время детские учреждения закрытого типа, по-

прежнему, следует рассматривать как учреждения группы риска, поскольку дети могут попадать в них различными путями, в разном возрасте и с разным вакцинальным статусом.

Из 164 проб от детей, проживающих в детских учреждениях на трех разных территориях СЗФО, было выделено 6 НПЭВ. В одном учреждении было изолировано 3 штамма Коксаки А24, в двух других учреждениях было выделено по одному штамму Коксаки А10 и 14. Энтеровирус Коксаки А24, принадлежащий к виду С, ранее не выявлялся на территориях СЗФО. Его циркуляция в закрытом детском дошкольном учреждении, скорее всего, связана с помещением в это учреждение ребенка, прибывшего из Средней Азии, который был носителем НПЭВ Коксаки А24 и продолжал выделять этот вирус, находясь в учреждении.

При исследовании 100 проб фекалий от здоровых детей, посещающих дошкольные детские учреждения (ДДУ) на еще одной территории СЗФО, было выделено 22 НПЭВ. Процент выделения энтеровирусов в разных ДДУ варьировал от 11 до 61%. Высокий процент выделения НПЭВ связан с тем, что забор материала для исследования осуществлялся в период формирования групп по возвращении детей после летнего отдыха.

Среди изолированных НПЭВ превалировали энтеровирусы Коксаки В1-6 (77,3%). Энтеровирусы Коксаки В2 циркулировали в одном ДДУ, Коксаки В3 – в трех ДДУ и Коксаки В4 – в двух ДДУ. В одном из детских учреждений была выявлена циркуляция энтеровируса ЭКХО 6. Также были обнаружены единичные штаммы энтеровирусов ЭКХО 25 и 33.

Филогенетический анализ показал, что два штамма Коксаки В3, выделенные от детей из одного и того же детского учреждения, имели 100% гомологию нуклеотидных последовательностей. Наиболее близок к ним был штамм (96,5% гомологии), выделенный из сточной воды в Оренбурге в 2008 году. Штамм Коксаки В3, выделенный от ребенка из другого учреждения, имел 5% отличий по нуклеотидной последовательности от первых двух штаммов, и имел набольшее родство со штаммом, идентифицированным в Дании в 2008 году. Все три штамма принадлежали одной филогенетической линии, представленной современными европейскими штаммами. Два штамма Коксаки В4, выделенные от детей из двух разных ДДУ имели 100% гомологию нуклеотидных последовательностей, но не более 96% гомологии со штаммами, циркулирующими в европейских странах.

В постсертификационный период ликвидации полиомиелита надзор за энтеровирусной инфекцией рассматривается как составляющая часть надзора за полиомиелитом. Согласно литературным данным неполиомиелитные энтеровирусы обусловливают как спорадическую, так и вспышечную заболеваемость. При этом до настоящего времени неясны особенности циркуляции различных серотипов энтеровирусов и механизмы смены доминирующих в циркуляции серотипов энтеровирусов [6].

Значимым источником детекции НПЭВ являются дети из групп риска, а также другие детские контингенты. Обнаружение большого процента НПЭВ у детей, посещающих детские дошкольные учреждения и проживающих в них, указывает на необходимость надзора за этими категориями детей.

Полученные данные о циркуляции полиовирусов и неполиомиелитных энтеровирусов среди детей из организованных коллективов имеют большое значение для успешного завершения Программы глобальной ликвидации полиомиелита. В целях предотвращения возможности заноса, трансмиссии и последующей циркуляции полиовирусов, а также неполиомиелитных энтеровирусов необходимо осуществление высококачественного надзора и строгих профилактических мероприятий, что будет способствовать поддержанию свободного от полиомиелита статуса Российской Федерации.

Литература:

1. Бичурина М.А., Лялина Л.В., Романенкова Н.И., Розаева Н.Р., Кубарь О.И., Канаева О.И., Терентьева Ж.В., Стебелько О.Ю., Шишко Л.А. Совершенствование эпидемиологического и вирусологического надзора за полиомиелитом в постсертификационный период ликвидации инфекции.// Аналитический обзор. СПб., 2013. – 88 с.

2. Иванова О.Е., Романенкова Н.И., Еремеева Т.П., Розаева Н.Р., Бичурина М.А., Чернявская О.П. Риск развития случаев острого вялого паралича и вакциноассоциированного полиомиелита в закрытых детских коллективах – домах ребенка и детских лечебных стационарах.// Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – № 1. – С. 14–18.

3. Онищенко Г.Г., Дроздов С.Г., Лялина Л.В., Бичурина М.А., Грачев В.П., Иванова О.Е., Ясинский А.А., Романенкова Н.И., Жебрун А.Б. Проблемы ликвидации полиомиелита. СПб, 2008. – 304 с.

4. Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р. Характеристика вакцинных полиовирусов, выделенных в закрытых детских коллективах (домах ребенка).// Вопр. Вирусол. – 2010. – № 2.– С. 42–45.

5. Cherkasova E.A. Yakovenko M.L., Rezapkin G.V., Korotkova E.A., Ivanova O.E., Eremeeva T.P., Krasnoproshina L.I., Romanenkova N.I., Rozaeva N.R., Sirota L., Agol V.I., Chumakov K.M. Spread of vaccine-derived poliovirus from a paralytic case in an immunodeficient child: an insight into the natural evolution of oral polio vaccine.// J. Virology. – 2005. –79. – P.1062–1070.

6. Mirand A., Henqell C., Archimbaud C. et. al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study.// Clin. Microbiol. Infect. –2012. – 18. – P. 110–118.

7. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens.// Clin. Microbiol. –2006. – 44. – P. 2698–2704.

8. Polio laboratory manual. WHO/IVB/04.10.World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2004, 157 p.

9. Romanenkova N.I., Guillot S., Rozaeva N,R,, Crainic R,, Bichurina M,A,, Delpeyroux F. Use of a multiple restriction fragment length polymorphism method for detecting vaccine-derived polioviruses in clinical samples.// J. Clin. Microbiol. – 2006. – 44. – P. 4077– 4084.

10. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et.al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. and Evol. 2011. Vo. 28. P. 2731–2739.

11. Van der Avoort H.G., Hull B.P., Hovi T., Pallansch M.A., Kew O.M., Crainic R., Wood D.J., Mulders M.N., van Loon A.M. Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses.// J. Clin. Microbiol. – 1995. – 33. – P. 2562–2566.

12. Yang C.F., De L., Holloway B.P., Pallansch M.A., Kew O.M. Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction.// Virus Res. – 1991. –20. – P. 159–179.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ В 2013 ГОДУ

Ковальчук И.В.[1,3], Соломащенко Н.И.[2], Романенко Е.Н.[2], Зволибовская А.В.[2], Дёмина Г.И.[2]

[1] Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю

[2] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»

[3] ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет»

e-mail:poliost@cgie.stavkray.ru

В связи с широкой циркуляцией энтеровирусов в окружающей среде, ростом спорадической и сезонной заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ), неблагополучной эпидемиологической обстановкой по энтеровирусной (неполио) инфекции в странах Юго-Восточной Азии, регистрации тяжелых случаев заболеваний, преимущественно среди маленьких детей в различных регионах России Роспотребнадзором утверждена ведомственная целевая Программа «Эпидемиологический надзор и профилактика энтеровирусной (неполио) инфекции на 2012–2014 гг.».

Задачами программы определено снижение заболеваемости энтеровирусными инфекциями, предотвращение эпидемических подъемов и формирования локальных очагов, недопущение распространения клинических форм инфекции, приводящих к инвалидизации и летальным исходам.

В 2013 году на территории Российской Федерации отмечался эпидемический подъём заболеваемости ЭВИ с регистрацией множества эпидочагов в детских организованных коллективах.

На территории Ставропольского края также отмечался рост заболеваемости. Было зарегистрировано 67 случаев заболеваний энтеровирусной инфекций (ЭВИ), показатель заболеваемости составил 2,43 на 100 тыс. населения, что в 4,3 раза выше, чем в 2012 году, (показатель 0,56 на 100 тыс. населения, зарегистрировано 15 случаев заболеваний). Среднекраевой показатель ниже среднероссийского уровня в 4,6 раза, однако на 62% выше среднего показателя по СКФО. Территориально ЭВИ регистрировалась в 9 административных территориях края из 32. Заболеваемость городского и сельского населения

практически одинакова. Среди городских жителей зарегистрированы 35 случаев заболеваний, показатель 2,2 на 100 тыс. населения, сельских – 32 случая, показатель – 2,76.

Все 67 случаев заболеваний зарегистрированы у детей до 17 лет, показатель заболеваемости составил 12,1 на 100 тыс. детей до 17 лет, что в 4,4 раза выше уровня 2012 г. (2,8 на 100 тыс., 14 случаев). В возрастной структуре заболеваемости основная доля пришлась на детей до 6 лет – 83,6% от всех случаев, зарегистрировано 56 случаев заболеваний, показатель 24,2 на 100 тысяч детей данной возрастной группы, что в 4,9 раза выше уровня 2012 г.

В клинической структуре ЭВИ преобладали «малые» формы заболевания, которые составили 55 случаев или 82% от всех зарегистрированных и протекали в клинической форме герпетической ангины и острого гастроэнтерита. На долю энтеровирусного менингита пришлось 18%, зарегистрировано 12 случаев заболеваний, показатель 0,43 на 100 тыс. населения, что 5,8 раза больше чем в 2012 году (2 случая, показатель 0,07 на 100 тыс. населения). Летальных исходов не зарегистрировано.

В помесячной динамике заболеваемости отмечалась летне-осенняя сезонность с началом активизации ЭВИ в июле, когда и был зарегистрирован максимальный уровень заболеваемости – 26 случаев или 38,8% от всех случаев. В последующем инфекция регистрировалась до декабря 2013 г. с динамикой снижения.

В основном в Ставропольском крае регистрировалась спорадическая заболеваемость, инфекция распространялась контактно-бытовым и воздушно-капельным путями передачи. В июле группой очаг ЭВИ имел место в детском дошкольном учреждении Буденновского района с 12 пострадавшими детьми в одной группе, инфекция протекала в клинической форме герпетической ангины, источник инфекции – ребенок, посещавший учреждение будучи больным, в результате инфекция распространилась воздушно-капельным путем. Этиологический агент – энтеровирус группы Коксаки А 10.

Все зарегистрированные в крае случаи заболеваний ЭВИ были лабораторно подтверждены методом ПЦР с последующим вирусологическим выделением энтеровирусов на клеточных культурах Hep-2 и RD. По результатам лабораторных исследований заболеваемость в 2013 году определяли 6 видов энтеровирусов: Коксаки А10, Коксаки А4, Коксаки В, ЕСНО 11, ЕСНО 6, энтеровирус 71 типа (выделен у 2-х больных с энтеровирусным менингитом). Для генотипирования и дальнейшего изучения изоляты энтеровирусов направлялись в Референс-центр по мониторингу за энтеровирусными инфекциями при ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора.

По результатам мониторинговых исследований за циркулирующими энтеровирусами во внешней среде (сточная вода) на административных территориях Ставропольского края определена циркуляция энтеровирусов Коксаки В, ЕСНО 11 и 19.

Возможными причинами эпидемического подъема заболеваемости ЭВИ в крае в 2013 году явились активизация циркуляции ЭВИ, в том числе появление

вирусов ранее не циркулирующих на территории, а также периодический циклический подъем инфекции.

Ситуация 2013 года показала важность проведения системного эпидемиологического надзора за энтеровирусной инфекцией для прогнозирования возможных эпидосложнений и проведения адекватного ситуации комплекса профилактических мероприятий.

К ВОПРОСУ О ПАТОГЕННОСТИ RICKETTSIA SIBIRICA SUBSP. BJ-90

Рудаков Н.В. [1,2], Решетникова Т.А. 1, Шпынов С.Н. [1,2], Пеньевская Н.А.,[2], Абрамова Н.В. 1, Кумпан Л.В. [1,2]

[1] ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, Омск

ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

e-mail: rickettsia@mail.ru

Введение

Ключевые слова: Rickettsia sibirica subsp. sibirica, Rickettsia sibirica subsp. BJ-90, клещевые риккетсиозы, патогенность риккетсий.

В соответствии с существующей таксономией выделяют три подвида Rickettsia sibirica – R. sibirica subsp. sibirica, R. sibirica subsp. BJ-90, R. sibirica subsp. mongolotimonae [1].

На территории России выявлено наличие первых двух подвидов. Генотип (подвид) R.sibirica subsp. BJ-90 выявлен на Дальнем Востоке РФ и в Северном Китае в клещах Dermacentor silvarum. Классический генотип R.sibirica subsp. sibirica широко распространен по нашим данным в нозоареале клещевого риккетсиоза (КР). Китайские штаммы R.sibirica subsp. BJ-90 первоначально выделены из клещей Dermacentor sinicus в 1990 году [2] и идентифицированы в 2000 г. [3, 4].

Материалы и методы

Штаммы «Приморье-32/84» и «Приморье 30/81» R.sibirica subsp.BJ-90 выделены в Омском НИИ природно-очаговых инфекций 1984 и 1981 гг., т.е. за шесть и девять лет соответственно до изоляции первых китайских штаммов этой риккетсии [5,6], в последующем идентифицированы молекулярно-биологическими методами [7]. Доказанные случаи КР у людей по данным исследований в Алтайском крае связаны только с R. sibirica subsp. sibirica [8,9]. Все изученные штаммы риккетсий, выделенные от больных КР в Алтайском крае и Новосибирской области («Нецветаев», «Сидро», «Казанцева», «Паршукова»), также относятся к R. sibirica subsp. sibirica. Данные о патогенности R.sibirica subsp. BJ-90 для людей до недавнего времени отсутствовали.

В связи с этим целью данной работы явился анализ накопленных к настоящему времени фактов, характеризующих патогенность R.sibirica subsp. BJ-90.

Использованы полученные нами данные изучения штаммов этого возбудителя, результаты исследования сывороток крови пациентов после присасывания иксодовых клещей в ИФА с антигенами различных видов риккетсий.

Результаты и обсуждение

Патогенность генотипов (видов) риккетсий для морских свинок, как правило, соответствует патогенности для человека. Имеющиеся в нашей коллекции штаммы R.sibirica subsp. BJ-90 «Приморье-32/84» и «Приморье 30/81», выделенные из клещей Dermacentor silvarum из Дальнереченского района Приморского края, являются патогенными для морских свинок. Они вызывали 2-3 дневную лихорадочную реакцию с температурой от 39,8 до 40,9˚С, с выраженным периорхитом у части животных, с характерной для КР патологоанатомической картиной, с сероконверсией в РСК с антигеном R.sibirica до 1:20 +++. При культивировании штамм «Приморье-32/84» на 5-6 дневных куриных эмбрионах при разведении культуры 1:20 дает удовлетворительное накопление риккетсий со 2-го пассажа, специфическая гибель эмбрионов наблюдается на 5-7 сутки после заражения. На культуре клеток Vero накопление риккетсий отмечали с третьего пассажа, с локализацией, как в цитоплазме, так и в ядрах клеток.

По результатам исследований в северных районах Омской области выявлена циркуляция двух антигенных вариантов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ), вызывающих у людей острые лихорадочные заболевания, протекающие с развитием общеинфекционного синдрома различной степени тяжести, как правило, без кожной сыпи, в ряде случаев с возникновением местных кожных реакций [10]. Эти возбудители, антигенно родственные (или идентичные) R.sibirica subsp.BJ-90 и R.sibirica subsp. sibirica соответственно, практически не вызывают перекрестных серологических реакций в ИФА [11].

Показано, что при исследованиях в ИФА с антигенами шести риккетсий (R.sibirica subsp. sibirica; R.sibirica subsp.BJ-90; R.tarasevichiae; R.heilongjiangensis; R.raoultii; R.akari) у больных из Тарского района Омской области наиболее часто выявляют антитела классов IgM и IgG к R.sibirica subsp. BJ-90.

Важно отметить отсутствие перекрестных реакций IgM и IgG к R.sibirica subsp. BJ-90 с растворимым антигеном R.sibirica subsp. sibirica. Аналогичную картину мы наблюдали при исследовании сывороток крови больных с типичной клиникой клещевого риккетсиоза КР из Алтайского края, где доминирующим видом риккетсий является R.sibirica subsp. sibirica [12]. Только в одной из 65 сывороток крови алтайских больных КР выявляли IgM к антигену R.sibirica subsp. BJ-90 параллельно с IgM и IgG к R.sibirica, а IgG к R.sibirica subsp. BJ-90 не были обнаружены ни у одного больного. Это позволяет заключить, что R.sibirica subsp. BJ-90 значительно отличается от R.sibirica subsp. sibirica своими растворимыми антигенами.

Из 28 больных с лабораторно не подтвердившимися диагнозами КЭ и ИКБ у восьми человек выявлены IgM-антитела к R.sibirica subsp. BJ-90. Чаще всего в стационаре ставили диагноз инфекционно-аллергическая реакция на укус клеща (4), два – катаральная ангина, по одному – ОРВИ и сепсис.

Анализ случаев заболеваний 35 пациентов с антителами к риккетсиям показал, что заболевания начинались остро с повышением температуры до 38-39˚С, проявлялись слабостью, головной болью, ознобом, мышечными болями, головокружением. У четверти больных отмечали гиперемию зева, в части случаев лейкоцитоз, палочковидный сдвиг лейкоцитарной формулы влево, лимфоцитопению, моноцитопению. Эритематозные реакции у больных с серологическими маркерами риккетсиозной инфекции выявлены в 34,5%.

Случай заболевания, связанный с R.sibirica subsp. BJ-90, выявлен в 2012 году в местности Mudanjiang провинции Heilongjiang в Китае [13]. У больного по данным реакции непрямой иммунофлюоресценции с антигеном R.sibirica отмечено нарастание титров антител классов IgM и IgG до 1:4096 в стадии реконвалесценции. При ПЦР-секвенировании ДНК из крови до начала антибиотикотерапии секвенсы фрагментов генов цитратсинтазы и OmpA оказались идентичны фрагментам генов R.sibirica subsp. BJ-90 и кластеризовались с другими подвидами R.sibirica. Клинически случай напоминал описанные нами заболевания в Омской области.

Заключение

Таким образом, полученные нами данные о патогенности R.sibirica subsp. BJ-90 для морских свинок и возможной патогенности для людей подтверждены молекулярно-биологическими методами в Китае [13] и в совокупности свидетельствуют о вероятной патогенности R.sibirica subsp. BJ-90 для человека. С учетом низкой перекрестной реактивности R.sibirica subsp. BJ-90 и R.sibirica subsp. sibirica серологическую диагностику этих клещевых риккетсиозов в ИФА в сочетанных очагах на Дальнем Востоке необходимо проводить с антигенами обоих генотипов R.sibirica.

Литература:

1. Fournier P.-E., Dumler S., Greub G., Zhang J., Wu Y. and Raoult D. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of Rickettsia heilongjiangensis sp.nov. J. Clin.Microbiol. 2003; 41 (12): 5456-65.

2. Yu X.J., Jin Y., Fan M.Y., Xu G., Raoult D. Genotypic and antigenic identification of two new strains of spotted fever group rickettsiae isolated from China. J.Clin.Microbiol. 1993; 31: 83-8.

3. Zhang J.Z., Fan M.Y., Yu X.J., Raoult D. Phylogenetic Analysis of the Chinese Rickettsia Isolate BJ-90. Emerg. Infect.Dis. 2000; 6: 432-3.

4. Zhang J.Z., Jin J.L., Fu X.P., Raoult D., Fournier P.-E. Genetic differenciation of Chinese isolates of Rickettsia sibirica by partial ompA gene sequencing and multispacer typing. J.Clin.Microbiol. 2006; 44: 2465-7.

5. Решетникова Т.А., Макарова В.А. Характеристика биологических свойств штаммов риккетсий, выделенных в Забайкалье и Приморье. В кн.: Природно-очаговые инфекции человека: респуб.сб.науч.работ. Омск; 1989; – С. 147–53.

6. Balaeva N.M., Eremeeva M.E., Ignatovich V.F., Rudakov N.V., Reshetnikova T.A., Samojlenko I.E. et. al. Biological and genetic characterization of Rickettsia sibirica strains in the endemic area of the North asian tick typhus. Am.J.Trop.Med. Hyg. 1996; 55 (6): 685-92.

7. Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A, Yastrebov V.K. et al. Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2006; 74 (3): 440-3.

8. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Гранитов В.М., Арсеньева И.В., Тарасевич И.В., Fournier P.-E., Raoult D. Выявление альфа1-протеобактерий в иксодовых клещах и образцах от больных в России. Омский научный вестник. 2006; 3 (37): 32-7.

9. Shpynov S., Fournier P.-E., Rudakov N., Arsenjeva I., Granitov M., Tarasevich I., et al. Tick-borne rickettsiosis in Altay region of Russia. Clin.Microbiol. Infect. 2009; 15, 2: Advances in Rickettsiology: 313-4.

10. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Рудакова С.А., Коломенский А.П. Клинико-эпидемиологический анализ результатов выявления антител к различным видам риккетсий у больных с подозрением на клещевую нейроинфекцию в северных районах Омской области. Сибирский медицинский журнал. 2009; 8. – 48–53.

11. Пеньевская Н.А., Рудакова С.А., Рудаков Н.В.. Коломенский А.П. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, в северных районах Омской области. Пермский медицинский журнал. 2009; – 26 (5): 32-9.

12. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Седых Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010; 1 (50): 17–22.

13. Jia N., Jiang J.-F., Huo Q.-B. et al. Rickettsia sibirica subspecies BJ-90 as a cause of human disease. N.Engl.J.Med. 2014; 369 (12): 1176-8.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧСКОГО МОНИТОРИНГА ЗА ЛИХОРАДКОЙ ЗАПАДНОГО НИЛА В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНОЙ СИТУАЦИИ НА ПРИМЕРЕ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Матросов А.Н., Захаров К.С., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шилов М.М., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Попов Н.В.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

В настоящее время неуклонно расширяется ареал лихорадки Западного Нила (ЛЗН) – особо опасного трансмиссивного зооноза арбовирусной этио-

логии. В 2013 г. в 16 странах мира было зарегистрировано более 3 200 случаев заболеваний, из которых 4,8% больных погибло. На территории Российской Федерации было выявлено 207 больных ЛЗН в 17 субъектах, включая завозные случаи, летальных исходов 3 (1,6%). Наибольшее число больных отмечено в Астраханской (88), Волгоградской (49) и Саратовской областях (31). Штамм вируса Западного Нила (ВЗН), циркулирующий в Саратовской области, относится ко второму типу, как и в Волгоградской области, в то время как в Астраханской области выделяется первый тип.

В соответствие с действующими методическими документами при регистрации 5 и более случаев заболеваний этой лихорадкой эпидемиологическая ситуация оценивается как чрезвычайная в области общественного здравоохранения. В этой обстановке усиливается эпизоотологический мониторинг на территории субъекта Федерации: меняются его цель, задачи и содержание, осуществляется весь комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Основной целью мониторинга является предупреждение заболеваемости населения или снижение ее уровня, для чего необходимо выявление сформировавшихся эпизоотических очагов ЛЗН на участках высокого риска заболеваний населения: в населенных пунктах и их окрестностях. Для этого ставятся следующие задачи:

Проведение наблюдений за фауной, сезонными миграциями и численностью птиц околоводного и антропогенного комплексов – носителей вируса Западного Нила (ВЗН).

Проведение наблюдений за фауной, численностью, выплодом и распределением комаров — переносчиков и хранителей ВЗН.

Осуществление сборов проб биологического материала для лабораторного исследования: птиц, мелких млекопитающих, комаров и клещей на участках высокого риска заболеваний населения.

Разработка эпидемиологического прогноза по ЛЗН: определение времени, территорий и контингентов риска заболеваний ЛЗН.

Разработка эффективных мер неспецифической профилактики заболеваний ЛЗН.

Осуществление контроля эффективности проведенных профилактических мероприятий.

Первые сведения о циркуляции арбовирусов на территории Саратовской области были получены в 90-е годы прошлого века (Ляпин и др., 1996).

Регулярные комплексные исследования начали осуществлять с 2006 г. (Щербакова и др., 2009), а целевые по ЛЗН — с 2010 г. (Красовская и др., 2011; Красовская и др., 2013; Матросов и др., 2013). В результате многолетних изысканий антигены и РНК ВЗН были обнаружены в пробах суспензий органов птиц: большого баклана, серой цапли, сизой чайки, речной крачки, полевого воробья, серой вороны и обыкновенного скворца; кровососущих членистоногих: синантропных комаров Culex pipiens (от имаго и личинок), комаров открытых водоемов – Anopheles maculipennis и Ochlerotatus cataphylla, а также в пробах иксодовых клещей Rhipicephalus rossicus, Rh. schulzei,

Dermacentor marginatus и D. reticulatus. Широкая циркуляция ВЗН в природных условиях была также подтверждена многочисленными фактами выявления его маркеров в популяциях грызунов: домовой и малой лесной мышей, обыкновенной, общественной и рыжей полевок, а также зайца-русака. Эти находки подтвердили предположение о наличии благоприятных условий для заноса ВЗН, расширения его ареала и формирования в Саратовской области природных и антропоургических очагов ЛЗН. В 2010 г. в области был обнаружен первый больной, в 2012 г. было зарегистрировано 11 случаев заболеваний, а в 2013 г. их число составило 31. Около 70% заболевших предположительно были инфицированы по месту жительства в городах Саратов, Энгельс и Балашов в результате укусов синантропными комарами. Во всех остальных случаях констатировали пребывание больных на водоемах в окрестностях городов (прогулки, купание, рыбалка), а также на дачных участках.

На основании полученных результатов эпидемиологического надзора за ЛЗН можно констатировать, что в Саратовской области в настоящее время сформированы и функционируют природные и антропоургические очаги ЛЗН. Это создает реальную угрозу дальнейшего роста уровня заболеваемости этой опасной арбовирусной болезнью. В условиях преобладания степных зональных ландшафтов территориями риска являются все населенные пункты, располагающиеся в поймах больших и малых рек Волжского и Донского бассейнов, бассейна Камыш-Самарских озер. Время риска массового инфицирования населения определяется с учетом сезонной алиментарной активности, выплода и динамики численности комаров. В природных биотопах наиболее вероятно заражение людей с середины июля до середины августа, а в населенных пунктах эти сроки пролонгируются до октября. Нами получены данные о круглогодичном сохранении возбудителя ЛЗН в популяциях синантропных комаров, а также о трансовариальной и трансфазовой его передаче в условиях теплых сырых подвалов городских многоэтажных зданий. В этой связи при разлете инфицированных комаров из подвалов заражение людей может происходить в любой период года. В отношении контингентов риска заболеваний этой лихорадкой пока выявлена лишь одна закономерность: болеют только те, кто подвергался нападениям комаров. Средний возраст заболевших составил 45 лет, а доля лиц мужского пола – 63%, что вполне согласуется с данными по другим регионам.

В создавшейся обстановке эпизоотологический мониторинг существенным образом перестраивается. На основании полученных результатов проведенных исследований в Саратовской области нами разработана прогностическая картосхема, иллюстрирующая вероятность формирования природных очагов ЛЗН. При ее создании были использованы качественные критерии: плотность гидрографической сети, структура фауны и численность птиц и комаров – потенциальных носителей и переносчиков ВЗН, результаты эпизоотологического и эпидемиологического обследования. К территориям с низкой вероятностью формирования устойчивых природных очагов ЛЗН мы отнесли районы лесостепи и степи с неразвитой гидрографической сетью, в связи с чем здесь низка доля пойменных биотопов, привлекающих перелетных

и гнездящихся птиц, нет условий для массового размножения кровососущих членистоногих – клещей и комаров. Территории со средней вероятностью формирования природных очагов – районы лесостепи и степи с более или менее развитой гидрографической сетью, но численность птиц и комаров невысока. Сюда могут заноситься вирусы, но условий для их устойчивой циркуляции нет. К территориям с высокой вероятностью формирования стойких очагов лихорадки относятся районы, располагающиеся в долинах Волги и других рек, изобилующие птицами и комарами, и где есть условия для стойкой циркуляции вируса в природных биотопах. Наконец, на территориях с очень высокой вероятностью формирования устойчивых очагов ЛЗН уже обнаружены маркеры ВЗН в биологическом материале (птицы, клещи, грызуны; сыворотки крови доноров), либо зарегистрированы спорадические случаи заболеваний ЛЗН. Именно в этих районах возможно возникновение эпидемических осложнений. Проведенная дифференциация может служить основой для планирования обследования и профилактических мероприятий.

При выявлении антропоургических очагов ЛЗН в населенных пунктах первоочередное внимание уделяют поиску и обследованию мест концентрации синантропных комаров Culex pipiens. В условиях города обнаруживаются их устойчивые микропопуляции, характеризующиеся круглогодичным размножением в теплых сырых и затопленных подвалах. Одной из основных задач при этом ставится как можно более полное выявление таких мест и проведение здесь санитарно-гигиенических и санитарно-технических мероприятий, направленных на устранение благоприятных для обитания насекомых условий. При этом следует также осуществлять контроль численности синантропных птиц и грызунов – потенциальных носителей вируса Западного Нила. Ремонтные и строительные работы, благоустройство подвальных и чердачных помещений, ликвидация обветшалых строений, оборудование приспособлений, защищающих жилые и хозяйственные объекты от проникновения инвазивных видов птиц, грызунов и кровососущих членистоногих, ликвидация несанкционированных свалок мусора в окрестностях городов и поселков, снижают риски инфицирования населения ЛЗН и другими зоонозами. В выявленных эпидемических очагах обязательно осуществляют инсектицидные и акарицидные обработки. Целесообразно применение безопасных световых, электрических и газовых (только в открытых биотопах) ловушек-уничтожителей насекомых. При химическом методе эффективно использование фосфорорганических и пиретроидных препаратов. Борьбу с грызунами ведут с помощью родентицидных приманок с антикоагулянтами. При защите от синантропных птиц: голубей, воробьев, серых ворон, грачей ограничиваются санитарно-гигиеническими и техническими мероприятиями, направленными на отпугивание пернатых или устранение условий для их гнездования, отдыха и питания.

В качестве мер неспецифической профилактики следует активизировать такие разделы работы, как подготовку специалистов лечебной медицинской сети и ветеринарных работников по вопросам диагностики и лечения ЛЗН. Необходимо усилить информационно-разъяснительную работу с населением

по правилам поведения в природных и антропоургических очагах этой инфекции, знанию основных симптомов заболевания и его профилактики.

При чрезвачайной ситуации по ЛЗН необходимо осуществлять корректировку комплексного плана по ее профилактике в соответствие с конкретной обстановкой в регионе. Это предусматривает проведение круглогодичных наблюдений в населенных пунктах, где по результатам мониторинга отмечают участки высокого риска инфицированности населения этой опасной лихорадкой. Только комплексный, интегрированный подход к осуществлению мероприятий по неспецифической профилактике ЛЗН может в конечном счете привести к снижению заболеваемости населения.

Литература:

1. Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Рябова А.В., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Федерова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кутырев В.В. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 3 (109). – С. 13–17.

2. Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Чекашов В.Н., Щербакова С.А., Билько Е.А., Куклев В.Е., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Кузнецов А.А., Рябова А.В., Князева Т.В., Сеничкина А.М., Казорина Е.В., Попов Н.В., Федерова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кожанова О.И., Кутырев В.В. Формирование очага лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области // Журнал микробиологии и иммунологии. – 2013. – № 5. – С. 36–42.

3. Ляпин М.Н., Ермаков Н.М., Малюкова Т.А., Головко Е.М., Куляш Г.Ю., Андреева Л.Б., Алексеев Е.В., Сиухин Б.И., Щербакова С.А. Прогнозирование и выявление циркуляции арбовирусов в Саратовской области // Вопросы риккетсиол. и вирусол. – Астрахань-Москва, 1996. – С. 88–93.

4. Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шилов М.М., Кузнецов А.А., Захаров К.С., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Толоконникова С.И., Удовиков А.И., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Кресова У.А., Кедрова О.В., Попов Н.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Условия циркуляции вируса и предпосылки формирования природных очагов лихорадки Западного Нила в Саратовской области // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 17–22.

5. Щербакова С.А., Билько Е.А., Найденова Е.В., Красовская Т.Ю., Слудский А.А., Князева Т.В., Матросов А.Н., Чекашов Н.В., Шарова И.Н., Самойлова Л.В., Кутырев В.В. Выявление антигенов арбовирусов в комарах и клещах, обитающих на территории Саратовской области // Медицинская паразитиол. и паразитарн. бол. – 2009. – № 2. – С. 38–41.

СОВРЕМЕННАЯ СИТУАЦИЯ ПО КЛЕЩЕВОМУ ВИРУСНОМУ ЭНЦЕФАЛИТУ И ИКСОДОВЫМ КЛЕЩЕВЫМ БОРРЕЛИОЗАМ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ И ПРИЛЕГАЮЩИХ РЕГИОНАХ ПРИВОЛЖСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

Удовиков А.И., Рябова А.В., Тарасов М.А., Толоконникова С.И.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

В пределах Приволжского федерального округа (ПФО) с Саратовской областью граничат: Пензенская, Ульяновская, Самарская и Оренбургская области. Ситуация по основным клещевым инфекциям – клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ) и иксодовым клещевым боррелиозам (ИКБ) в них неоднозначна.

С помощью ГИС технологий уже давалась оценка интенсивности проявления этих инфекций в Российской Федерации, в том числе и в обозначенных областях (Завальский Л.Ю. С соавт., 2010). По этим данным за период с 2000 по 2006 гг. число заболевших людей ИКБ / КВЭ составило: в Пензенской области – 36/0, Ульяновской – 53/2, Самарской – 34/0, Оренбургской – 32/5. Эти данные кардинально отличаются от северо-восточных регионов ПФО, где показатели заболеваемости на порядок выше. Отмечается, что в последнее время наметилась тенденция роста заболеваемости ИКБ в отличие от ситуации с КВЭ (Нафеев А.А., 2013).

В **Саратовской области** в последние несколько лет проводилась активная работа по выявлению природных очагов ИКБ. В результате слабоактивные природные очаги были выявлены в Аткарском, Екатериновском, Базарно–Карабулакском, Новобурасском, Пугачевском, Хвалынском районах. Единичные экземпляры инфицированных боррелиями клещей выявлены в Балаковском, Турковском районах, зеленой зоне г. Саратова. Низкая активность природных очагов клещевого боррелиоза в области, видимо, в частности обусловлена крайне низкой численностью лесных клещей (Ixodes ricinus), и практическим отсутствием таежных клещей (I. persulkatus), которые являются основными переносчиками болезни Лайма. Численность клещей по мониторинговым точкам области 2013 г. остается на уровне прошлого года и составляет 15,3 экз./фл.-км. По средним многолетним данным численность клещей составила 18 экз./фл.-км. В июне 2011г. впервые на территории области был зарегистрирован 1 случай заболевания боррелиозом.

Саратовская область на данный момент не считается эндемичной по КВЭ. Регистрировались лишь единичные завозные случаи заболевания: по 1 случаю в 2002 и 2003 гг., 2 случая в 2009 г. (инфицирование произошло в Алтайском крае, Бурятии, Кировской и Волгоградской области.)

Однако, в областях, граничащих с Саратовской областью, ситуация по КВЭ и ИКБ ежегодно достаточно напряженная. Для примера приведём данные за последние годы.

Ульяновская область

В 2011 г. при исследовании клещей на антиген вируса клещевого энцефалита выявлено 20 положительных проб. Отмечено больных ИКБ – 36 (2,77/100 тыс. населения), 2 (0,15) – КВЭ.

В 2012 г. всего методом ИФА было исследовано 1529 клещей, снятых с человека на носительство антигена вируса КВЭ, 293 из них дали положительные результаты (19,1%). Отмечен рост в 1,75 раза заболеваемости ИКБ, зарегистрировано 54 случая (4,86).

За летне-осенний период 2013 г. было отловлено 233 экземпляров клещей (5,4 экз./фл.-км). На носительство вируса клещевого энцефалита было исследовано 476 экз. клещей (на 23.10.13), снятых с человека, в 35 обнаружен антиген КВЭ (7,3%); в 10 – боррелии (2,1%). Заболеваемость за год: ИКБ – 46 человек (3,54), КВЭ – 2 человека (0,15).

Пензенская область

В 2011 г. при исследовании клещей на боррелии были получены положительные результаты в 24,9% проб. Увеличилось число больных ИКБ – 102 чел. (7,37), в то время как в 2010 г. болело 57 человек. В 2012 г. положительные результаты на ИКБ выявлены у 165 клещей (22,1%). Заболеваемость ИКБ снизилась на 35,7% (4,76).

В 2013 г. численность клещей: 1,5 экз./фл.-км, (в 2012 г. – 4,0 экз./фл.-км). Исследовано на боррелии за июнь-октябрь 2013 года методом темнопольной микроскопии 193 экз. клещей, из них 145 экз. с маршрутов и 48 клещей, снятых с людей.

Положительные результаты выявлены у 34 клещей (17,6%). За аналогичный период 2012 года исследовано 747 экз., их них положительных 165 – 22,1%.

Методом ПЦР исследовано на КБ 344 пула клещей:

– 26 пулов с клещевых маршрутов, из них 4 положительные (15,4%) (г. Пенза, Пензенский р-н, Городищенский район, Шемышейский р-н);

– 318 клещей, снятых с людей, из них 46 с положительным результатом (14,5%).

Методом ПЦР исследовано 66 пулов клещей на клещевой энцефалит, из них 5 пулов с клещевых маршрутов и 61 клеща, снятых с людей, результат исследования отрицательный.

Заболеваемость ИКБ за 10 месяцев 2013 г. зарегистрирована в 5 районах и г. Пензе. Всего выявлено случаев 27(1,97), за аналогичный период прошлого года 47 случаев(3,41).

Самарская область

В 2011 г. клещей, инфицированных возбудителями клещевого энцефалита обнаружено 4,6% (в 2010 г. – 13,1%), боррелиоза — 11,4% (31,7%), туляремии – 0,5 % (1,1%), Ку-лихорадки — 0,9% (2,3%). Заболеваемость клещевыми инфекциями: клещевым энцефалитом — 2 чел. (0,06), боррелиозом 7 (0,22).

В 2012 г. из 2221 экземпляров исследованных клещей 232 экз. (10,4%) – с положительным результатом на наличие вируса КЭ и 26 экз. из 381 исследованных (6,8%) положительны на КБ. Заболеваемость этими инфекциями осталась на прошлогоднем уровне (2 и 6 случаев соответственно).

За осенний период 2013 г. исследовано 2301 экз. клещей на КВЭ (из них 13% с положительным результатом) и 428 экз. на КБ (4% положительных проб). Летом этого же года по одному случаю КВЭ зарегистрировано в г. Самаре и в Клявлинском районе. По одному случаю КБ зарегистрировано в г. Тольятти и в Волжском районе, а в Челно-Вершинском районе три случая.

Оренбургская область

2011 г.: зараженность клещей боррелиями зарегистрирована у 6,7% (2010 г. – 8,4% клещей). Методом ИФА антиген к вирусу КВЭ был обнаружен у 1,8 % клещей, собранных на флаг, у 9,3% клещей, снятых с людей. Клещевым энцефалитом заболело 10 чел. (0,47), (2010 г. – 4), боррелиозом – 4 (0,19).

2012 г.: в осенний период различными методами исследован 241 клещ на боррелиоз, зараженность клещей боррелиями зарегистрирована у 14 клещей (5,8%, в 2011 г. — у 6,7% клещей).

В весенний период методом ИФА антиген вируса клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) был обнаружен у 9 иксодовых клещей из 1146 собранных на флаг с маршрутов и исследованных в лаборатории (0,8%, в 2011 г. – 1,2%). Также исследован 1051 клещей, снятых снятых с населения, в 37 экз. был обнаружен антиген вируса КВЭ (3,5%). В осенний период было исследовано 1250 иксодовых клещей с маршрутов, в 9 обнаружен антиген вируса КВЭ (0,7%). Также исследовано 1544 клеща, от населения, в 44 был обнаружен антиген вируса КВЭ (2,9%, в 2011 г. – 9,3%). В 2012 г. было выявлено 4 случая заболевания КБ и 3 случая заболевания КВЭ.

В 2013 г. в степной природной зоне в летне-осенний период индекс обилия клещей составил 8 экз. на 1 фл.-км (за аналогичный период 2012 г. – 5 экз. на 1 фл.-км). Среднемноголетний показатель – 5,6 экз./фл.-км).

В лесостепной природной зоне в летне-осенний период индекс обилия клещей составил 5,8 экз./фл.-км, что является выше среднемноголетнего показателя (за аналогичный период 2012 г. – 4,6 экз. /фл.-км). Среднемноголетний показатель – 5,2 экз./фл.-км.

Исследовано на КВЭ 938 экз. клещей с маршрутов (положительных результатов 0,3%), снятых с людей – 861 экз. (2,3%); то же на ИКБ — 36 экз. (11,1%) и 248 экз. (3,6%).

В 2013 г. зарегистрировано 2 случая заболевания КВЭ (0,1) и 3 случая заболевания ИКБ (0,15).

Из всего вышеизложенного следует прежде всего то, что не следует забывать принципы медицинской географии природных очагов инфекционных болезней, которые на современном этапе получили мощную основу в виде ГИС-технологий.

Литература:

1. Завальский Л.Ю., Штанников А.В., Бикетов Д.С. и др. Сравнительный анализ заболеваемости клещевым боррелиозом и клкщевым энцефалитом в регионах Российской Федерации с помощью географических информацион-

ных систем за период 2000–2006 гг. // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2010. – № 6, С. 4–10.

2. Нафеев А.А. Проблемы современного периода в подходах к эпидемиологическому надзору и профилактике природно-очаговых инфекций // Биозащита и биобезопасность, 2013. – Т. IV. – С. 28–34.

К ВОПРОСУ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА БРУЦЕЛЛЕЗОМ

Шакирова Л.И., Ляпустина Л.В.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

snipchi@mail.stv.ru

Продолжающиеся изменения социально-экономического уклада сельскохозяйственного производства в Российской Федерации и, в частности, в Северо-Кавказском федеральном округе связаны с увеличением количества индивидуальных, крестьянских (фермерских) хозяйств, акционерных обществ, развитием малого и среднего бизнеса [1]. Тем самым создаются условия, при которых возрастает риск завоза больного бруцеллезом скота, а также животноводческой продукции в регионы Российской Федерации, свободные от данной инфекции [2].

По данным за 2012 г. основная часть впервые выявленных случаев бруцеллеза у людей регистрировалась в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах, на долю которых приходится до 70% всей заболеваемости по Российской Федерации [2].

Складывающаяся на юге России эпидемическая ситуации по бруцеллезу определяется сохраняющейся неблагоприятной динамикой эпизоотической процесса среди сельскохозяйственных животных – основных источников инфекции для человека. Помимо этого, особенностью данного региона является существование на его территории природного очага бруцеллезной инфекции в северных предгорьях Большого Кавказа, в котором от мышевидных грызунов на протяжении 23 лет выделялись штаммы бруцеллезного микроба вида *B. suis* 5 биовар [3]. Таким образом, можно считать, что Северо-Кавказский предгорный природный очаг бруцеллёза, в котором среди мышевидных грызунов циркулирует возбудитель бруцеллёза 5 биовара вида *B. suis*, имеет определённое как эпизоотологическое, так и эпидемиологическое значение.

Данный факт может играть существенную роль в поддержании эпизоотического процесса среди основных носителей – сельскохозяйственных животных, а также возможном инфицировании людей, что имело место ранее [4, 5].

В этих условиях возрастает роль применения современных подходов мониторинга за миграцией бруцеллезного микроба среди носителей и циркуляцией определенных генотипов бруцелл на территории СКФО и Российской Федерации в целом.

На данный момент одним из ведущих методов характеристики бруцеллезного микроба, является метод MLVA (multiple locus variable number tandem repeats analysis), обладающий высоким уровнем дискриминационного потенциала [6]. Метод широко применялся для решения различных задач: изучения полевых изолятов бруцелл, расследования вспышек бруцеллеза с целью определения источника инфекции или подтверждения рецидива болезни, для верификации источника лабораторного заражения [6].

В связи с изложенным, представляло интерес проведение молекулярно-генетического типирования изолятов бруцелл, циркулирующих в южных регионах Российской Федерации методом MLVA с 14 парами праймеров на известные вариабельные локусы генома бруцелл [7], а также оценка распределения различных генотипов на данных территориях.

В работе использованы 24 клинических изолята возбудителя бруцеллеза, выделенные на территории Республики Калмыкия и Республики Дагестан в 2012–2013 гг. и 24 изолята, выделенные от мышевидных грызунов на территории бывших Чечено-Ингушской АССР, Северо-Осетинской АССР и Кабардино-Балкарской АССР в период с 1959 по 1982 гг.

Изначально все анализируемые штаммы были охарактеризованы в соответствии с традиционной схемой типирования [8]. Культуры были отнесены к видам: *B. melitensis* 1 биовар, *B. melitensis* 3 биовар, *B. abortus* 3 биовар, *B. suis* 5 биовар.

Для стандартизации полученных результатов в работе использовали данные MLVA-профилей референтных штаммов бруцелл с известными генотипами, взятые из электронной базы данных MLVABank 5.0 tutorial version 1.6: *B. melitensis* 16M (биовар 1), *B. melitensis* 63/9 (биовар 2), *B. melitensis* Ether 706 (биовар 3), *B. abortus* 544 (биовар 1), *B. abortus* Tulya (биовар 3), *B. suis* 1330 (биовар 1), *B. suis* Thomsen (биовар 2), *B. suis* 686 (биовар 3), *B. suis* 40 (биовар 4) и *B. suis* 513 (биовар 5).

Проведенный кластерный анализ показал, что штаммы, которые были отнесены к 3 биовару вида *B. melitensis,* группировались в общий кластер, совместно с референтным штаммом *B. melitensis* Ether 706. Штаммы 1 биовара вида *B. melitensis* образовали один кластер совместно с референтным штаммом *B. melitensis* 16M.

Штаммы 3 биовара вида *B. abortus* формировали общий, но удаленный от других, кластер совместно с референтным штаммов *B. abortus* Tulya (3 биовар).

Штаммы 5 биовара вида *B. suis* также формировали общий, но удаленный от остальных кластер совместно с референтным штаммом *B. suis* 513.

Было показано, что идентичными по MLVA-генотипу являются изоляты общего географического происхождения. Так, штаммы *B. melitensis* С-552 и С-553, изолированные в Республики Калмыкия в 2012 г., сформировали отдельную подгруппу в пределах общего кластера, образованного штаммами 3 биовара вида *B. melitensis*.

Штаммы, выделенные в Республике Дагестан в 2012 г. и отнесенные к 3 биовару вида *B. melitensis*, были объединены внутри общего кластера в подгруппы, которые включали культуры, изолированные в одних гео-

графических точках: Хунзахский район, Левашинский район, г. Каспийск, Шамильский район.

Штаммы *B. melitensis* С-545 и С-546, изолированные в г. Каспийске Республики Дагестан, также объединены в одну подгруппу внутри кластера, однако в эту же подгруппу вошел штамм *B. melitensis* С-541, выделенный в п. Манас Карабудахкентского района Республики Дагестан, что может говорить в пользу вероятного единого источника заражения.

Кластеризации штаммов вида *B. suis* в зависимости от места, источника и срока выделения проследить не удалось, так как большинство из них были изолированы от мышевидных грызунов, которым характерны сезонные миграции, и только один штамм был выделен из крови больного.

Апробированная схема MLVA-типирования продемонстрировала высокие дискриминационные возможности. Показано, что совокупность значений длин 14 локусов у бруцелл, является индивидуальным показателем для отдельного штамма или группы штаммов, поэтому с высокой степенью достоверности позволяет определять происхождение штамма и возможный источник инфицирования.

Литература:

1. Пакскина Н.Д. Эпидемиологическая обстановка и основные направления профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Современные требования к организации санитарной охраны территорий Российской Федерации в рамках реализации ММСП (2005 г.). Дез. дело. 2009; 3:23-29.

2. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнёва С.И., Тихенко Н.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в российской федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. Пробл. особо опасных инф. 2013; 1:21-24.

3. Лямкин Г.И. Бруцеллез в регионе Северного Кавказа (Эпидемиология, природная очаговость, лабораторная диагностика): Дисс. Ставрополь; 1995.

4. Таран И.Ф., Цыбин Б.П. О новом биотипе бруцелл вида суис, выделяемого от мышевидных грызунов в районах северных предгорий Большого Кавказа. Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез.докл. 4 краев.науч.-практ.конф.– Ставрополь, 1978.

5. Репина Л.П., Никулина А.И., Косилов И.А. Случай заражения людей бруцеллёзом от кошки. ЖМЭИ.1983; 4: 66–68.

6. Whatmore, A. M. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect. Genet. Evolut. 2009; 9: 1168-1184.

7. Le Fleche R. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a Brucella MLVA typing assay. Bio. Med. Central Microbiol. 2006; 9: 1–14.

8. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллёза людей: Методические указания (МУ 3.1.7.1189-03). 2003; 59.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ИНФЕКЦИЯМИ, СВЯЗАННЫМИ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ ПАЦИЕНТАМ С ТЯЖЕЛЫМИ ТРАВМАМИ В УСЛОВИЯХ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО ХИРУРГИЧЕСКОГО СТАЦИОНАРА

Кузин А.А., Свистунов С.А., Огарков П.И.
ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ
syezd2@mail.ru

Своевременное выявление инфекционных осложнений у раненых и пострадавших с тяжелыми травмами базируется на знании клинико-патофизиологических особенностей проявлений травматической болезни и является одной из задач лечащих врачей. Однако для установления ведущих экзогенных факторов риска, влияющих на их возникновение и развитие в период госпитализации, необходимо еще и выявление причинно-следственных связей, которые могут быть установлены в процессе клинико-эпидемиологической диагностики. Причины и условия распространения инфекционных осложнений среди раненых и пострадавших в специализированных хирургических стационарах могут быть раскрыты только при понимании механизмов развития эпидемического процесса инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, гнойно-септического характера (внутрибольничных гнойно-септических инфекций – ВГСИ). Эпидемиологический надзор за ВГСИ представляет собой специальную контрольно-аналитическую систему, позволяющую в динамике оценивать тенденции и условия развития эпидемического процесса, обосновывать объем, содержание и время проведения лечебно-профилактических мероприятий с учетом особенностей оказания медицинской помощи в конкретном хирургическом стационаре. Несмотря на то, что в настоящее время разработаны основные его компоненты, оно имеет специфические отличия для стационаров, в которых оказывается медицинская помощь раненым и пострадавшим с тяжелыми травмами. Целью эпидемиологического надзора в них является получение объективной информации об эпидемической обстановке, особенностях и закономерностях эпидемиологических и клинических проявлений ВГСИ, связанных с тяжелой травмой, на основе проспективного мониторинга таких пациентов, так как они входят в группу высокого риска возникновения и развития инфекционных осложнений. Решение этих задач необходимо для разработки и обоснования как системных, так и индивидуальных профилактических мер, направленных на улучшение качества медицинского обслуживания раненых и пострадавших с тяжелыми травмами. В связи с этим важно знать эпидемическую ситуацию, выявлять эпидемиологические особенности и закономерности проявлений эпидемического процесса ВГСИ, определять тенденции его развития и прогнозировать развитие тяжелых инфекционных осложнений у раненых и пострадавших в процессе их госпитализации.

В ходе многолетней работы были обоснованы и разработаны основные структурные компоненты эпидемиологического надзора за ВГСИ в специализированном хирургическом стационаре – это информационно-аналитическая, клинико-эпидемиологическая и клинико-организационная подсистемы. Следует отметить, что все они являются системообразующими компонентами, в которых задействованы как госпитальный эпидемиолог, так и лечащие врачи-специалисты (хирурги, анестезиологи и реаниматологи), а также другие специалисты (организаторы, клинические микробиологи, клинические фармакологи и др.).

Инфекционные осложнения у пациентов с тяжелыми травмами следует группировать по доминирующей форме клинических проявлений, в зависимости от условий инфицирования и применяемой медицинской технологии, а также по этиологическому принципу. Местные инфекционные осложнения характеризуются развитием инфекции в месте получения травмы или ранения (околораневая флегмона, абсцесс раневого канала, гнойный затек) и ее возникновением после операции (поверхностная и глубокая формы, инфекция органа или полости). Висцеральные инфекционные осложнения связаны с поражением как одного внутреннего органа (моновисцеральная инфекция, например, инфекция нижних дыхательных путей), так и нескольких или в сочетании с местными инфекционными осложнениям (сочетанная висцеральная инфекция). Генерализованные инфекционные осложнения представлены сепсисом, тяжелым сепсисом и септическим шоком. В рамках эпидемиологического надзора за ВГСИ необходимо выделять эндогенные и экзогенные инфекции для дифференциации причин возникновения осложнений и выявления факторов риска, а также инфекции, связанные с распространением госпитального штамма как показатель эпидемиологического неблагополучия в стационаре. Отдельно следует учитывать инфекции по спектру выделенных из клинического материала возбудителей по их видовой, таксономической (синегнойные, клебсиеллезные, ацинетобактерные, стафилококковые и др.) и молекулярно-генетическим характеристикам, а также инфекционные осложнения, связанные с ассоциациями микроорганизмов.

Информационно-диагностическая подсистема является важнейшим структурным компонентом, от которого зависят качество и эффективность, как эпидемиологического надзора, так и мероприятий по борьбе и профилактике ВГСИ. Необходимо обеспечить непрерывное получение достоверной и исчерпывающей информации об их клинических и эпидемиологических проявлениях. Следует отметить, что эффективный сбор информации возможен только при использовании различных приемов диагностики, в частности, активном выявлении случаев ВГСИ, при взаимодействии с лечащими врачами и адекватном программно-техническом обеспечении. Основными элементами информационно-диагностической системы для специализированного хирургического стационара по лечению тяжелых ранений и травм являются: изучение структуры и анализ параметров деятельности стационара; сбор, обработка и анализ информации о случаях ВГСИ; исследование и динамическая оценка факторов риска возникновения и развития инфекционных

осложнений, связанных с состоянием пациента, лечебно-диагностическим процессом и госпитальной средой; организация проспективного наблюдения и микробиологического мониторинга.

Следует подчеркнуть, что адекватность выявления инфекционных осложнений у раненых и пострадавших с тяжелыми травмами зависит от использования клинико-эпидемиологических критериев их диагностики (адаптированных стандартных определений случаев) в ходе применения активных методов в сочетании с обнаружением косвенных признаков инфекции, а также внедрение в клиническую практику алгоритмов клинико-эпидемиологической диагностики отдельных нозологических форм ВГСИ. Основным критерием их диагностики является появление проявлений инфекционных осложнений не ранее чем через 48 часов после госпитализации с учетом: температурной кривой, признаков системного воспалительного ответа, результатов лабораторных и инструментальных исследований, данных бактериологического исследования клинического материала, свидетельствующих об идентичности выделенных штаммов, обнаруженных в процессе микробиологического мониторинга в стационаре.

Вместе с тем для клинико-эпидемиологической диагностики отдельных нозологических форм, особенно висцеральных инфекционных осложнений, у раненых и пострадавших с тяжелыми травмами требуется уточнение критериев в рамках проведения проспективного наблюдения. Методы клинико-эпидемиологической диагностики ВГСИ на практике могут быть реализованы по нескольким направлениям: ретроспективный и оперативный эпидемиологический анализ; эпидемиологическое обследование с оценкой результатов клинических данных о пациентах с инфекционными осложнениями; проспективное наблюдение. Они позволяют осуществлять прогнозирование эпидемической ситуации по ВБИ, которая осложняется при обнаружении следующих признаков:

– возникновение двух и более связанных случаев ВГСИ, вызванных идентичной госпитальной микрофлорой;

– рост количества случаев висцеральных и, особенно, генерализованных инфекционных осложнений;

– обнаружение полирезистентных штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и бактерий рода *Acinetobacter*, как в монокультуре, так и в составе ассоциаций, их выделение из разного материала, полученного от одного пациента;

– обнаружение госпитальных штаммов микроорганизмов на объектах госпитальной среды, особенно на оборудовании, активно используемом в лечебно-диагностическом процессе, а также на руках медперсонала;

– ухудшение показателей микробиологического контроля проб воздуха функциональных помещений стационара, качества стерилизации и дезинфекции.

Предвестники эпидемиологического неблагополучия свидетельствуют о необходимости введения усиленных противоэпидемических мероприятий, направленных на разрыв путей и механизмов передачи возбудителей, и, прежде всего, на предотвращение дальнейшего распространения госпитальных

штаммов. Эти меры осуществляются госпитальным эпидемиологом совместно с руководителями отделений, где были выявлены эти предвестники, лечащими врачами и средним медицинским персоналом. Вместе с тем в клинической практике важно осуществлять прогнозирование развития тяжелых, прежде всего, генерализованных инфекционных осложнений и на этой основе планировать рациональную тактику лечения раненых и пострадавших с тяжелыми травмами. Результаты клинико-эпидемиологической диагностики необходимо реализовывать при организации лечебно-диагностического процесса и санитарно-противоэпидемического режима. В первую очередь это касается отделений, в которых были выявлены случаи ВГСИ, а также обнаружены предвестники ухудшения эпидемической ситуации.

Общепризнанным фактом является необходимость присутствия в любом стационаре системы эффективных клинико-организационных, лечебно-профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения инфекционных заболеваний. С учетом опыта работы в специализированном хирургическом стационаре могут быть предложены следующие стандарты профилактики ВГСИ, касающиеся улучшения исходов лечения раненых и пострадавших с тяжелыми травмами: наличие в стационаре клинико-организационной структуры, позволяющей эффективно осуществлять эпидемиологический надзор за ВГСИ; проводить активное выявление и регистрацию всех случаев с учетом возможности развития у пациентов с тяжелыми травмами не одного, а нескольких инфекционных осложнений в различные периоды госпитализации, а также раннюю этиологическую диагностику и микробиологический мониторинг инфекционных осложнений.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИСТАНЦИОННОГО ЗОНДИРОВАНИЯ ЗЕМЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ОЧАГОВ ГЛПС НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

Мочалкин П.А. [1], Мочалкин А.П. [1], Степанов Е.Г [2], Фарвазова Л.А [2], Попов Н.В. [3]

[1]ГБУЗ «Республиканский центр дезинфекции» МЗ Республики Башкортостан, г. Уфа;

[2]Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, г. Уфа;

[3]ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

e-mail: marketing@dez-ufa.ru

В настоящее время в Республике Башкортостан оздоровление природных очагов ГЛПС является одной из центральных проблем обеспечения охраны

населения (Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., 2013). Сохранение напряженной эпидемиологической обстановки по ГЛПС связано, в первую очередь, с увеличением интенсивности контактов населения с природно-очаговыми комплексами, формированием природно-антропоургических и антропоургических очагов этой инфекции (Мочалкин П.А., 2010; Попов Н.В. и др., 2013). Вплоть до настоящего времени наиболее высокая эпидемическая активность очагов ГЛПС характерна для лесостепной зоны западных предгорий Южного Урала (правобережье низовий р. Белой), башкирской части Высокого Заволжья (Белебеевская, Стерлибашевско-Федоровская возвышенность, северные отроги Общего Сырта), зоны широколиственно-темнохвойных подтаежных лесов Уфимского плато и темнохвойных-широколиственных лесов в междуречье рр. Таныпа и Буя, рр. Камы и Белой. При этом сохранившиеся в северной части Республики Башкортостан естественные леса сильно нарушены и также имеют характер типичной лесостепи с редкими лесными массивами, том числе вторичными мелколиственными лесами. Причем по мере роста степени урбанизации лесных и лесостепных ландшафтов возрастает плотность населенных пунктов, равно как и численность населения. Эпидемиологически значимыми элементами пространственной структуры отдельных лесостепных урборайнов служат, в первую очередь сопряженные участки городских (сельских) селитебных и природных ландшафтов (Мочалкин П.А., 2010). Особо подчеркнем, что на территории Прибельской увалисто-волнистой равнины, равно как и в северо-восточной лесостепи Предуралья (Месягутовская лесостепь), вследствие интенсивной антропогенной трансформации ландшафтов, сформировались многочисленные квазиприродные сообщества, вкрапленные в агроландшафт. В связи с низкой эпизоотологической и эпидемиологической значимостью сельскохозяйственных ландшафтов в природной очаговости ГЛПС, регистрируется низкий уровень заболеваемости ГЛПС.

Вследствие низкой степени урбанизации горно-лесных и горно-лесостепных районов Южного Урала и степей Зауралья плотность населенных пунктов и численность населения повсеместно низкая. Эпидемиологическая значимость сопряженных участков сельских селитебных и горно-лесных и горно-лесостепных ландшафтов минимальна.

Последнее позволяет использовать основные принципы ландшафтного метода интерпретации данных дистанционного зондирования Земли (ДЗЗ) (визуальное, инструментальное дешифрирование космических снимков с пространственным разрешением 10–20 м на местности) для эпидемиологического районирования эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан (Попов Н.В. и др., 1989; Рис У.Г., 2006; Свейн Ф., Дейвис Ш., 1983).

В процессе ландшафтно-индикационного дешифрирования космических снимков территорий различных административных районов и населенных пунктов Республики Башкортостан выделены основные индикационные дешифровочные признаки территорий, характеризующихся различной степенью потенциальной эпидемической опасности, в том числе: высокой, средней, низкой. При этом показано, что специфические особенности пространствен-

ной структуры урболандшафтов, в первую очередь сопряженность составляющих его компонентов, можно использовать в качестве комплексного индикатора их потенциальной эпидемической опасности.

В частности обосновано, что в лесостепной ландшафтно-географической зоне западных предгорий Южного Урала основным дешифровочным индикаторным признаком территорий с высокой потенциальной эпидемической опасностью по ГЛПС служит площадь сопряженных городских селитебных, садово-парковых и природных ландшафтов. Общая площадь пространственно обособленных участков, характеризующихся широким спектром урболандшафтов (от природных через природно-антропогенные до техногенных) достигает 20-25% от обшей площади урборайона. Высокая комплексность селитебных и природных ландшафтов наиболее характерна для г. Уфы и в прилегающих Уфимском, Благовещенском, Мишкинском административных районах. В 1997 г. уровень заболеваемости в г. Уфе составил 606 на 100 тыс. населения. Инфраструктура г. Уфы характеризуется наличием зеленой зоны, лесных массивов в районах многоэтажной застройки и в поймах рек, зон рекреации, сельхозугодий различного назначения, дачных массивов. Стыки ландшафтов характеризуются, в свою очередь, широким набором открытых и закрытых биотопов (урочищ, фаций) имеющих свои индикационные признаки и эколого-эпидемиологические характеристики. На фоне высокой степени урбанизации первичных природных комплексов здесь зарегистрирована максимальная плотность населенных пунктов достигающая 125 на 1 тыс. км^2 (Уфимский) и городского населения г. Уфа – более 1 450 чел. на 1 км^2. В целом, общая площадь территории, характеризующейся высокой потенциальной эпидемической опасностью, составляет в Республике Башкортостан около 7,0 тыс. км^2, т.е. не более 5,0%. Причем фактическая площадь участков с высоким риском заражения, расположенных непосредственно на стыках природных, природно-антропогенных и селитебных ландшафтов, значительно меньше.

Индикаторными признаками территорий со средней степенью потенциальной эпидемической опасностью (ежегодный высокий уровень спорадической заболеваемости) служат различные варианты сочетанных сельских и городских селитебных, агропромышленных аграрных и равнинных лесных ландшафтов. Вследствие меньшей степени урбанизации первичных ландшафтов, площадь обособленных участков с комплексной пространственной ландшафтной структурой составляет 8-10% от общей площади урборайона. В окрестностях населенных пунктах (поселки городского типа и др.) встречаются пойменные лесные массивы, зоны рекреации. Среди сельхозугодий различного назначения доля площади лесов достигает от 17% (Бураевский) до 78% (Нуримановский). Структура селитебного ландшафта представлена, в основном, небольшими по площади, ландшафтно-техногенными комплексами (одно и двухэтажной постройки). Данная группа территорий представлена, в основном, 11 промышленно-сельскохозяйственными районами, в том числе: Альшеевским, Аскинским, Бирским, Бураевским, Иглинским, Кармаскалинским, Нуримановским, Салаватским, Стерлибашевским, Татышлинским, Туймазинским. Максимальная плотность населенных пунктов достигает 69,7 на 1 тыс. км^2 (Кармаскалинский), населения – 55 чел. на 1 км^2 (Туймазинский). Общая

площадь территории, характеризующейся средней степенью потенциальной эпидемической опасностью составляет около 23,0 тыс. км^2, т.е. 16,0% от всей территории Республики Башкортостан.

Индикационными дешифровочными признаками территорий с низкой потенциальной эпидемической опасностью служат различные сочетания сельских селитебных, аграрных, горно-лесных и горно-лесостепных ландшафтов. В структуре сельского селитебного ландшафта преобладают одноэтажные техногенные комплексы. Данная группа территорий объединяет 40 административных районов, в том числе: Абзелиловский, Архангельский, Аургазинский, Баймакский, Бакалинский, Балтачевский, Белебеевский, Белокатайский, Белорецкий, Бижбулякский, Благоварский, Буздякский, Бурзянский, Гафурийский, Давлекановский, Дуванский, Дюртюлинский, Ермекеевский, Зилаирский, Илишевский, Ишимбайский, Калтасинский, Караидельский, Кигинский, Краснокамский, Кугарчинский, Кушнаренковский, Куюргазинский, Мелеузовский, Мечетлинский, Миякинский, Нуримановский, Стерлитамакский, Учалинский, Федоровский, Хайбуллинский, Чекмагушевский, Чишминский, Шаранский, Янаульский. Плотность населенных пунктов варьирует от 7,6 (Бурзянский) до 68,1 (Аургазинский) на 1 тыс. км^2.; населения – от 3,7 (Бурзянский) до 38 (Дюртюлинский) чел. на 1 км^2. Общая площадь территории, характеризующейся низкой степенью потенциальной эпидемической опасностью составляет около 113 тыс. км^2., т.е. 79% от всей территории Республики Башкортостан.

Обоснование критерием дешифрирования участков с различной степенью потенциальной эпидемической опасности по ГЛПС создает перспективу автоматической фотограмметрической обработки космических снимков различных территорий, а также обосновывать тактику объемы противоэпидемических мероприятий.

Литература:

1. Мочалкин П.А. Очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом города Уфы: опыт оздоровления: Автореф. дисс…канд. мед.наук. Саратов, 2010. 22 с.

2. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б. Эпидемиологический надзор и профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в РФ. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2013. № 4. С. 23–32.

3. Попов Н.В., Денисенко И.И., Бугаков А.А., Тихомиров Э.Л. Использование материалов космических сьемок для оценки эпизоотоло-гических последствий антропогенной трансформации при-родных комплексов Северо-Западного Прикаспия // Матер. Всесоюзн. совещ. по проблеме кадастра и учета животного мира, Уфа, 1989. Ч. 1. С.134-135.

4. Попов Н.В.,Топорков В.П.,Сафронов В.А., Кузнецов А.А.,Рябов С.В., Санджиев Д.Н., Кутырев В.В.Современные направления снижения уровня заболеваемости природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации. Эпидемиол. и инф. болезни. Актуал. вопр. 2013. № 5. С. 15–17.

5. Рис У. Г. Основы дистанционного зондирования: пер. с англ. / У. Г. Рис; пер. М. Б. Кауфман, А. А. Кузьмичева. – М.: Техносфера, 2006.

6. Свейн Ф., Дейвис Ш. Дистанционное зондирование: количественный подход //М., Недра, 1983. – 416 с.

ЛЕПТОСПИРОЗЫ В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Самарина И.В.[1], Семенко О.В.[1], Лямкин Г.И.[1], Свистунов В.М. [2], Чайка А.Н [3], Аликова Г.А. [4], Стариков А.М. [4], Саяпин А.Г. [4], Клюшин А.Н. [4], Суворин В.В. [4],. Роньшина Н.В [5], Дубинин А.В. [5]

[1]ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь;

[2]ФКУЗ «Волгоградский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград;

[3]ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области»;

[4]Комитет ветеринарии Волгоградской области;

[5]ГБУ ВО «Волгоградская областная ветеринарная лаборатория»

snipchi@mail.stv.ru

Проблема лептоспироза актуальна для Волгоградской области. В период с 1997 по 2012 гг. зарегистрировано 209 больных, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения колебался от 1,06 до 0,04 за исключением 2010 г., когда заболеваний не было. Особенности природно-климатических и экономических условий региона обуславливают циркуляцию возбудителей лептоспирозов и возможность заражения ими людей, а наличие большого числа водоёмов обеспечивает условия укоренения лептоспирозной инфекции на территории Волгоградской области. В современный период (с 2005 г. по 2012 г.) динамика и тенденции заболеваемости населения Волгоградской области лептоспирозами характеризуется снижением (рисунок 1).

Рисунок 1. Динамика и тенденции заболеваемости лептоспирозами в Волгоградской области с 2005 г. по 2012 г.

Нами проведено дифференцирование территории Волгоградской области по заболеваемости лептоспирозами с использованием статистической компьютерной программы SPSS 13,0 for Windows (Statistical Packageforthe Social Science). Методика заключается в сравнении средних многолетних показателей заболеваемости на 100 тыс. населения с 1997 г. по 2008 г. на территории Волгоградской области и аналогичными показателями в ее административных районах. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.Сравнение двух средних проводили как с применением t-критерия, так и непараметрического критерия Вилкоксона для двух зависимых выборок в связи с выявлением отличий распределения средней многолетней заболеваемости на 100 тыс. населения от нормального распределения на территории Волгоградской области и ряда её административных субъектов по критерию Колмогорова-Смирнова. В случае получения противоречивых результатов тестов на сравниваемых территориях, учитывали результаты непараметрического теста. Следует отметить совпадение в 81,6% итогов обоих тестов, что подтверждает полученные результаты.

Средний многолетний показатель заболеваемости лептоспирозами на 100 тыс. населения в Волгоградской области с 1997 г. по 2008 г. составил 0,61±0,39, всего за эти годы заболело 200 человек.

В городах Волгограде, Волжском, Урюпинске и на территории 12 административных районов (Алексеевском, Дубовском, Еланском, Жирновском, Иловлинском, Клетском, Котельниковском, Ленинском, Руднянском, Среднеахтубинском, Суровикинском, Урюпинском) различия между двумя средними показателями не имели достоверных различий. На основании изложенного территории этих административных образований Волгоградской области отнесены к территориям с умеренной заболеваемостью людей лептоспирозами (по отношению к средней заболеваемости по области за этот период). Однако в Еланском и Ленинском районах этот показатель по результатам сравнения двух средних с применением t-критерия был достоверно выше областного, а по критерию Вилкоксона – нет. В соответствии с описанной методикой учтены результаты непараметрического теста, однако параметрический критерий на данной территории указывает на достоверность этих различий, что косвенно свидетельствует о необходимости повышенного внимания медицинской, санитарной и ветеринарной служб к ситуации по лептоспирозам в этих районах.

В городах Камышине, Михайловке и Фролово, а также на территории 20 административных районов (Быковский, Городищенском, Даниловском, Калачевском, Камышинском, Котовском, Кумылженском, Михайловском, Нехаевском, Николаевском, Новоаннинском, Новониколаевском, Октябрьском, Ольховском, Палласовском, Светлоярском, Серафимовичском, Старополтавском, Фроловском, Чернышковском) средний многолетний показатель заболеваемости был достоверно ниже средней многолетней заболеваемости на территории областиза изученный период, поэтому эти административные субъекты отнесены к территориям с низкой заболеваемостью лептоспирозами. Результаты исследования визуализированы в карте (рисунок 2).

В этиологии лептоспирозов людей в Волгоградской области за изученный период обращает на себя внимание большое количество смешанных реакций

(микст-инфицирование различными серогруппами лептоспир). Важную роль в инфицировании людей играли серогруппы лептоспир Icterohaemorrhagiae (29,5%), Pomona (13%), Grippotyphosa (6%), Canicola (3%). Серогруппа Sejroe имела меньшее значение (0,5%).

Дети до 14 лет в возрастной структуре больных лептоспирозом составили за этот период 2%, значительная часть больных (83,5%) приходится на трудоспособный возраст – 20–59 лет. Доля мужчин среди заболевших лептоспирозами составила 85%. Сельские жители в Волгоградской области в период с 1997 по 2008 гг. заболевали лептоспирозами чаще городских: средний многолетний показатель заболеваемости на 100 тыс. сельских жителей составил 0,77±0,69; городских – 0,56±0,33.

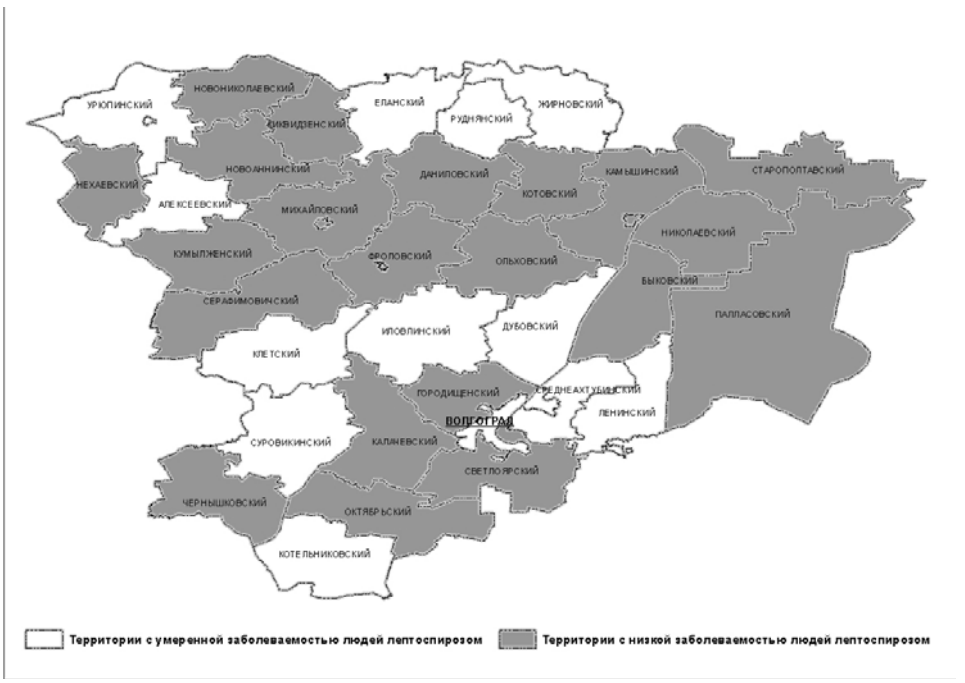


Рисунок 2. Районирование Волгоградской области по уровню заболеваемости населения лептоспирозами.

Водный путь передачи имел основное значение (55%) среди прочих путей передачи инфекции (контактный – 20%, пищевой – 10%). В 15% случаев путь передачи возбудителя не установлен. Источниками инфекции в период с 1997 г. по 2008 г. в 59% случаях были дикие млекопитающие, причем среди них в 95,3% – мелкие мышевидные грызуны; в 19% – сельскохозяйственные и домашние животные, из них свиньи – в 44,4%; КРС – в 29,6%; собаки – в 25,9%. В 22% случаев источник инфекции установлен не был. Анализ источников и путей передачи лептоспирозной инфекции указывает, что в Волгоградской области основной причиной инфицирования населения служат мелкие млекопитающие, живущие в дикой природе, в меньшей степени – сельскохозяйственные и домашние животные. Установлена выраженная

общность этиологической структуры лептоспироза людей и свободноживущих мелких млекопитающих. В 2009–2012 гг. специфические антитела к лептоспирам обнаружены в сыворотке крови у лесных, полевых, домовых мышей, и обыкновенных полевок. Спектр сероваров лептоспир представлен L. Pomona, L. Grippotyphosa, L. Hebdomadis, L. Icterohaemorragiaeи микстов L. Pomona+ L.Tarassovi, L. Grippotyphosa+ L. Hebdomadis.

С 1997 по 2012 гг. в области 10 хозяйств были объявлены неблагополучными по лептоспирозу. Три неблагополучных пункта выявлены в 1997 г., по одному в Иловлинском, Кумылженском и Чернышковском районах. В 1998 г., 2001 г., 2002 г., в 2007 г. и в 2010 г. выявлено по одному неблагополучному пункту – в г. Волгограде, в Алексеевском, Котельниковском, Ловлинском и Камышинском районах соответственно, два в 2003 г. в Котовском районе. Среди сельскохозяйственных животных источником лептоспир серогрупп Icterohaemorragiae, Pomona, Tarassovi и Canicola могут быть свиньи и лошади, Hebdomadis, Tarassovi, Sejroe и Pomona – крупный рогатый скот, Canicola – собаки.

Таким образом, на современном этапе динамика и тенденции заболеваемости населения Волгоградской области лептоспирозами характеризуется снижением. Однако актуальность проблемы лептоспирозов для Волгоградской области на современном этапе фактически подтверждается наличием спорадических случаев заболевания, заболеваемостью сельскохозяйственных и домашних животных и обнаружением инфицированных носителей во внешней среде.

Основными вопросами профилактики лептоспироза в Волгоградской области следует считать мониторинг численности мышевидных грызунов, их инфицированности лептоспирами, обязательное проведение дератизационных работ по результатам мониторинга с целью снижения заболеваемости населения, специфическую профилактику, оздоровление хозяйственных очагов, неукоснительное соблюдение ветеринарного и санитарного законодательства в области профилактики лептоспирозов.

МИКС-ГЕРПЕТИЧЕСКАЯ ИНФЕКЦИЯ У ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ВЗРОСЛЫХ ПРИ ОРВИ

Порываева А.П.[1], Некрасова Т.С.[2], Таршис М.Е.[1], Смирнов Г.В.[1]

[1] ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург;

[2] ОГУЗ «Областной кожно-венерологический диспансер» МЗ Свердловской области

virus@eniivi.ru

Герпетическая инфекция (ГВИ) является одной из самых распространённых среди вирусных /2/. Герпетическая инфекция может протекать изолированно, либо в сочетании с другими инфекционными заболеваниями,

возбудители которых могут иметь бактериальную, вирусную природу или вызываться другими микроорганизмами. Микст-герпетическая инфекция формирует условия для проявления нестандартных, атипичных форм полиорганной патологии /1, 3/. Острые респираторные заболевания в более чем 12% случаев взрослых людей сопровождаются длительным субфебрилитетом, рецидивирующим тонзиллитом и синдромом хронической усталости, что характерно и для ГВИ /4/.

Целью нашей работы являлось изучение роли ГВИ в нестандартном течении ОРВИ у часто и длительно болеющих взрослых людей.

Материалы и методы

По результатам ретроспективного анализа М.Д. формы № 025/у – 04 (амбулаторная карта больного) группу обследованных больных представляли 2372 пациента (мужчины и женщины) в возрасте от 18 до 65 лет с клинической картиной ОРВИ с длительным субфебрилитетом, рецидивирующим тонзиллитом и синдромом хронической усталости.

Наряду с рутинными обследованиями (общий анализ крови, анализ мочи) проводили исследования мазков слизи из носовых ходов в реакции ИФ (иммунофлюоресценции) для выявления антигенов респираторных вирусов, бактериологические исследования слизи из ротоглотки и мазков с миндалин, рентгенографию придаточных пазух и легких.

Оценку серопозитивности к герпетической, цитомегаловирусной, ВЭБ-инфекции, хламидийной и токсоплазменной инфекциям в группе обследуемых пациентов осуществляли на основе выявления антител классов Ig A, Ig M, Ig G в сыворотке крови методом ИФА с использованием тест-систем производства «Вектор – Бест».

Специальные исследования проводили по следующим направлениям:

- определение в крови, моче и слюне методом ПЦР геномов ВПГ-1, ЦМВ, ВЭБ, Chlamydia trachomatis; дополнительно в мазках из ротоглотки определяли Candida albicans;
- иммунологические тесты I-II уровня;

Исследования проводились в период 2008–2013 гг. на базе Екатеринбургского НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора и Областного кожно-венерологического диспансера Министерство здравоохранения Свердловской области.

Результаты и обсуждение

Всего обследовано 2372 пациентов в возрасте от 18 до 65 лет с клинической картиной ОРВИ и ОРЗ, рецидивирующими тонзиллитами и фарингитами, стойким субфебрилитетом, синдромом хронической усталости. При исследовании мазков из носовых ходов в реакции ИФ антигены респираторных вирусов были обнаружены в 1,4% случаев.

Исследования мазков с миндалин на микрофлору у данной группы больных показало, что в 31,2% случаев диагностируются стрептококки разных групп и условно-патогенная микрофлора (Neisseria perflava).

При исследовании мазков из ротоглотки методом ПЦР с наибольшей частотой (43,2%) была обнаружена множественная микст-герпетическая инфекция. В 12,9% случаев одновременно с множественной микст-герпетической инфекцией выявлено наличие Candida albicans, что является косвенным признаком, нарушения микробиоценоза в организме больного и связано со снижением иммунитета.

Диагностические исследования сывороток крови выявили, что уровень серопозитивности пациентов к вирусам группы герпеса составил 80,3%; Chlamydia trachomatis – 38,3%; токсоплазме – 10,1% случаев. Антитела к вирусам простого герпеса I и II типа класса Ig M диагностировали в 2,4%, а Ig G – в 41,4% случаев. К цитомегаловирусной инфекции Ig M определялись в 3,4% и Ig G – в 29,8% случаев. К вирусу Эпштейна-Барра менее чем в 1% определялись Ig M к VCA; в 1,3% случаев – Ig G к EAL/S и в 10,8% – Ig G к NAL/S. К Chlamydia trachomatis и токсоплазме диагностировались только антитела Ig G.

Детекция геномов оппортунистических инфекций методом ПЦР в клинических материалах (кровь, моча, слюна) позволили установить высокую распространенность микст – инфекций, основную массу которых составляли микробно-вирусные ассоциации в различных сочетаниях. Наиболее характерны ассоциации «вирус + хламидии» – до 26,2% случаев. «Вирусо – вирусные» ассоциации диагностировались в 10% случаев, «вирус + токсоплазма» и «вирус + хламидии + токсоплазма» – менее 3%.

В 59,6% случаев у обследованных больных наблюдалась выраженная воспалительная реакция: содержание лейкоцитов – 18,8±0,43 109/л, нейтрофилов – 68,6±3,57%, лимфоцитов – 25,7±0,4% , СОЭ – 28±2,23 мм/ч, уровень кортизола в сыворотке крови соответствовал 708,7±37,8 нмоль/мл. Формирование системного синдрома эндогенной интоксикации подтверждалось увеличением в 4,2 раза содержания в сыворотке крови малонового диальдегида, при норме 2,74±0,02 мкмоль/л.

Воспалительная реакция у 981 (40,6%) больных была умеренно выражена: содержание лейкоцитов – 12,3±0,44 109/л, нейтрофилов – 48,4±3,27%, лимфоцитов – 20,7±0,3% , СОЭ – 13,2±0,32 мм/ч. Однако уровень малонового диальдегида в сыворотках крови больных составлял 12,76±0,04 мкмоль/л (N = 2,74±0,02 мкмоль/л), что свидетельствовало о тяжелой эндогенной интоксикации.

Иммунологические исследования выявили стойкие нарушения иммунорегуляторной функции в виде снижения Т-лимфоцитов, имеющих поверхностные рецепторы CD4+ (22,9±0,3) и CD8+ (25,4±0,24) у 51,2% больных. Фагоцитарная активность мононуклеарных клеток была снижена в 1,4-1,6 раза. О снижении иммунной защиты и усилении продукции токсинов на фоне вирусной инфекции и недостаточности компенсаторной защиты организма свидетельствовало увеличение уровня ЦИК в сыворотке крови до 97,31+ 2,2 ус.ед. (N = 30,51+0,09). Необходимо отметить, у больных с сочетанной «Герпесвирусы + Chlamydia trachomatis» инфекцией нарушения в системе иммунитета были максимально выраженными.

Проведённые в течение шести лет (2008–2013 г.г.) исследования позволяют сделать вывод, что у часто болеющих пациентов клиническая картина ОРВИ с полиморфной симптоматикой обусловлена микст-инфекциями, в том числе герпесвирусной суперинфекцией. У обследованных пациентов в 82,3% случаев герпетическая инфекция не имела четко представленной нозологической формы. Однако проведенные в момент обращения пациентов серологические исследования, при которых были выявлены высокие титры антител Ig G к патогенам, в сочетании с детекцией в средах организма генома возбудителя в ПЦР, подтвердили диагноз текущей инфекции, выявив высокую репликативность возбудителя в 67,1% случаев. Одновременно с этим было показано иммуносупрессивное действие герпесвирусной инфекции, которое способствовало развитию патогенной микрофлоры, (Candida albicans, стрептококков, хламидийной и токсоплазменной инфекций). Индуцированное постоянной антигенной нагрузкой воспаление привело к угнетению и истощению метаболических реакций, которые у пациентов клинически проявлялись как хроническая усталость и длительный субфебрилитет. У 17,7% таких больных была отмечена резистентность к антибактериальной терапии. В 79,7% случаев у обследованных пациентов был диагностирован синдром эндогенной интоксикации.

Заключение

Высокий уровень циркуляции возбудителей герпетической инфекции в человеческой популяции формирует условия для проявления нестандартных, атипичных форм полиорганной патологии. За исключением некоторых более четко представленных нозологических кожно-слизистых форм ГВИ, основная масса клинических проявлений имитирует симптомы ОРВИ с длительным субфебрилитетом и синдромом хронической усталости. Длительная персистенция возбудителей ГВИ обуславливает постоянную антигенную нагрузку, что приводит к угнетению и истощению иммунных реакций организма человека и создаёт условия для формирования и развития микст-инфекций. Индуцированное постоянной микст-антигенной нагрузкой воспаление может в дальнейшем привести к развитию метаболических дисстрессов и формированию хронического системного воспаления.

Таким образом, мы приходим к выводу о необходимости углубленного обследования часто болеющих пациентов с ОРВИ, которые протекают с клиническими симптомами длительного субфебрилитета и синдромом хронической усталости для исключения множественной микст-герпетической инфекции. Проведение комплексной лабораторной диагностики позволить осуществить своевременную этиотропную терапию и снизить риск развития хронических соматических заболеваний у человека.

Литература:

1. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Журавлева Ю.А. и др. Варианты развития хронического системного воспаления // Мед. иммунология – 2009 – Т. 11, № 2–3, – С. 131–140.

2. Исаков В.А., Архипов Е.И., Исаков В.Д. Герпетическая инфекция человека: руководство для врачей. – СПб.: Спецлит, 2006. – 303 с.

3. Кутырев В.В. Система лабораторной диагностики инфекций неизвестной этиологии // Клин. лаб. диагностика – 2005 – № 9, – С. 8–10.

4. Чучалин А.Г. Тяжелые формы гриппа: диагностические и лечебные алгоритмы // Проблемы практической медицины. – 2009. – № 3. – 10–12.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ В СМОЛЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Попов В.П. [1], Фомченкова О.Н. [2], Ларченкова Н.В. [2]

[1] ФКУЗ «Противочумный центр», Москва;

[2] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Смоленской области», Смоленск,

tamarind@bk.ru, olesyafom80@mail.ru

В настоящее время в учреждениях Роспотребнадзора накоплен многолетний фактический материал (в виде полугодовых обзоров) по эпизоотической активности природно-очаговых и особо опасных инфекций. Современные ГИС-технологии позволяют восстановить накопленный за прошедшие 50–60 и более лет архивный материал в виде электронных карт и использовать его в повседневной работе при планировании и проведения профилактических мероприятий.

В настоящей работе использованы сведения ФБУЗ «ЦГиЭ в Смоленской области» по выделению культур возбудителя туляремии из объектов внешней среды и случаев заражения людей туляремией и начиная с 1947 года.

Природные очаги туляремии в Смоленской области относятся к лугополевому типу и имеются во всех 25 районах; заболеваемость людей туляремией регистрируется с 1944 года (Сорина, Алексеева, 1965). Всего из различных объектов (мелкие млекопитающие, иксодовые клещи, вода, подснежные гнезда грызунов) окружающей среды было изолировано около 300 культур возбудителя туляремии, из них 112 культур за последние 20 лет. Основном носителем инфекции является обыкновенная полевка, в эпизоотии вовлекаются обыкновенная бурозубка, полевые, лесные и домовые мыши, рыжая полевка и мышь-малютка. Основным переносчиком инфекции, а также ее длительным хранителем является луговой клещ Dermacentor pictus. В последние годы в области отмечаются локальные эпизоотии и спорадические случаи заражения туляремией.

Технологический процесс создания карт на базе ГИС-технологий состоит из нескольких этапов. Один из них – составление кадастра мест выделения культур возбудителя туляремии и определение их географических координат с привязкой к базовым точкам (населенных пунктам). Для поиска точек были использованы электронные карты Ingit в масштабе 1:200000 (все регионы России, 7 версия), а также карты Google при поиске точек через Интернет.

В дальнейшем из созданного блокнота с помощью электронных таблиц, составленных в Microsoft Excel, координаты точек внесли в программу

MapInfo, 10.5. Таким образом, была получена карта с отображением 150 мест размещения культур. Подобная карта на 360 точек была создана по местам регистрации заболеваемости людей туляремией в области (Рис.).

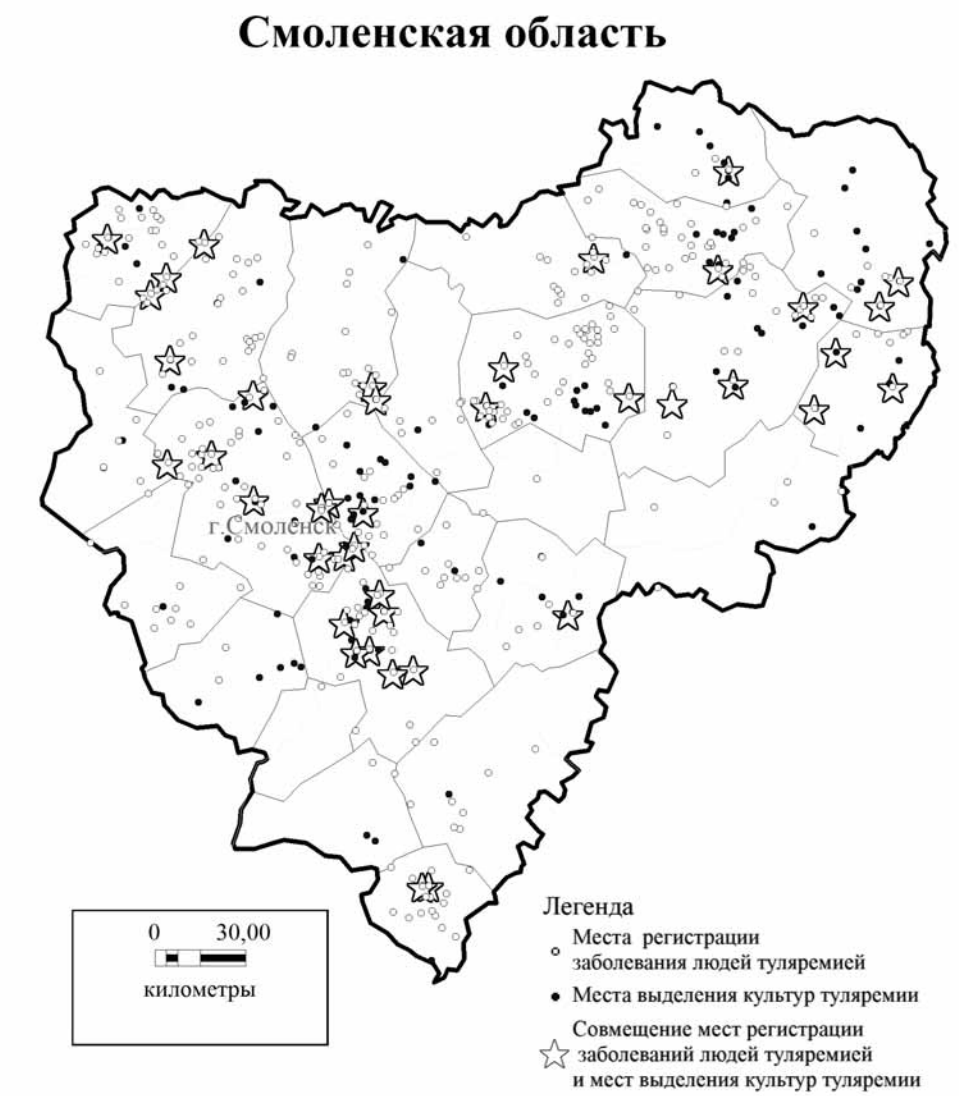


Рисунок. Карта заболеваемости людей туляремией в Смоленской области.

Полученные карты были транспортированы на физико-географическую электронную карту области. Это позволило в пространстве и во времени совместить эпидемиологическую и эпизоотическую активность природных очагов туляремии за более чем 65 летний период. По созданным кадастрам удалось выявить 41 населенный пункт, где в разное время болели люди и выявлены эпизоотии туляремии. Такие села расположены в Велижском, Вяземском, Гагаринском, Демидовском, Духовщинском, Ельнинском, Ершичском, Кардымовском, Починковском, Сафоновском, Смоленском, Сычевском, Тем-

кинском и Холм-Жирковском районах. Всего здесь изолировано 73 культуры возбудителя туляремии. Временной разрыв от случая регистрации заболевания до выделения культуры возбудителя туляремии в том же месте варьировал от нескольких дней до 60 лет. Это подтверждают высокую степень устойчивости природных очагов туляремии. Наш опыт применения ГИС-технологий может быть применен при изучении других природно-очаговых инфекций, а также для прогнозирования возможных эпидемических осложнений в районах максимальной эпизоотической активности природных очагов.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ГИС-ТЕХНОЛООГИЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Полухина А.Н. [1], Попов В.П. [2]

[1] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Московской области», г. Мытищи;

[2] ФКУЗ «Противочумный центр», Москва

annipol@mail.ru, tamarind@bk.ru

В настоящее время в ЦГиЭ Роспотребнадзора накоплен многолетний фактический материал (в виде полугодовых обзоров) по эпизоотической активности природно-очаговых и особо опасных инфекций. Практически этот уникальный архив до сих пор не востребован на практике.

Современные ГИС-технологии позволяют восстановить накопленный за прошедшие 50-60 и более лет архивный материал в виде карт и использовать его в повседневной работе при планировании и проведения профилактических мероприятий.

В работе были использованы материалы по выделению культур возбудителя туляремии из различных объектов внешней среды с 1964 года и мест регистрация случаев больных туляремией с 1943 года.

Природные очаги туляремии в Московской области изучены достаточно хорошо (Арефьев С.С. и др., 1965, Олсуфьев Н.Г. и др., 1965). Заболевание людей туляремией в области регистрируется с 1926 года, но регулярный её учет начат с 1942 года. На территории области Арефьевым С.С. и др. выделено 89 природных очагов туляремии, которые относятся в 5 основным типам: луго-полевой, балочно-кустарниковый, пойменный, пойменно-болотный с наличием пастбищных клещей и пойменно-болотный без пастбищных клещей. Во всех типах природных очагов основным носителем инфекции является обыкновенная полевка, второстепенными – водяная и рыжая полевка, лесная и полевая мыши, мышь-малютка, обыкновенная бурозубка, а основным хранителями – клещи *Dermacentor reticulatus*, второстепенными *Ixodes ricinus* и *I. persulcatus*. Значительную часть территории Московской области занимают очаги луго-полевого и пойменно-болотного типов.

За годы наблюдений (1964 по 2013) согласно статистическим данным санэпидслужбой Московской области изолировано 225 культуры возбудителя туляремии, из них 96 (42%) от мелких млекопитающих и насекомоядных, 98 (44%) – от иксодовых клещей, 19 (8%) – из воды различных открытых источников и 12 (6%) от подснежных гнезд грызунов.

Технологический процесс создания карт на базе ГИС-технологий состоит из нескольких этапов. Один из них – это составление кадастра точек выделения культур возбудителя туляремии и определение их географических координат с привязкой к базовым точкам (населенных пунктам). Для поиска точек были использованы электронные карты Ingit в масштабе 1:200000 (все регионы России, 7 версия), а также карты Google при поиске точек через Интернет.

В дальнейшем из созданного блокнота с помощью электронных таблиц, составленных в Microsoft Excel, координаты точек внесли в программу MapInfo, 10.5. Таким образом, получена карта с отображением 98 точек размещения культур возбудителя туляремии, изолированных из различных объектов (мелкие млекопитающие, иксодовые клещи, вода, подснежные гнезда грызунов) окружающей среды с 1964 по 2013 гг. в пределах Московской области. Подобная карта на 631 точку была создана по месту регистрации заболеваемости людей туляремией в области с 1943 по 2010 годы. Полученные карты с помощью программы Adobe Photoshop были транспортированы на физико-географическую карту Атласа Московской области в масштабе 1:150000.

Применение ГИС-технологий позволили совместить на карте в пространстве и во времени места выделения культур туляремии из объектов внешней среды и населенные пункты, где люди заразившиеся туляремией были зарегистрированы. Из 98 точек, где в разное время были выделены культуры туляремии, географические координаты 42-х совпали с координатами населенными пунктами, где болели туляремией местные жители. Всего в таких местах из 225 культур, выделенных на территории Московской области с 1964 года, изолировано 81 (36,0%) культура возбудителя. Культуры изолированы от мелких млекопитающих: обыкновенной полевки (31 культура), серой крысы (6), полевой мыши (4), мыши-малютки (3), лесной мыши (1), обыкновенной бурозубки (2), нутрии и водяной полевки – по 1 культуре, иксодовых клещей (14), воды (12), подснежных гнезд – 6 культур. На территории области выявлено 20 районов с очаги туляремии пойменно-болотного и луго-полевого типов на протяжении десятков лет, сохраняющих свою эпизоотическую активность. За 50 лет ни одной культуры не изолировано в Балашихинском, Егорьевском, Клинском, Красногорском, Озерском и Серебряно-Прудском районах.

Опыт применения ГИС–технологий в Московской области на примере природных очагов туляремии показал перспективность и доступность их использования для изучения природно-очаговых инфекций.

Литература:

1. Арефьев С.С., Домбровский В.В., Мосолов Л.П. Туляремия в Московской области и предпосылки ликвидации очагов этой инфекции. «Туляремия и сопутствующие инфекции». Омск, 1965.

2. Олсуфьев Н.Г., Доброхотов Б.П. Основные принципы и итоги изучения географии природных очагов туляремии в СССР. «Методы медико-географических исследований». М., 1965.

ЭЛЕКТРОННАЯ «БАЗА ДАННЫХ (БД) ПО ЛЕПТОСПИРОЗАМ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ» И ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМ НАДЗОРЕ ЗА ЛЕПТОСПИРОЗАМИ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ

Самарина И.В., Чеботарева Е.Н., Семенко О.В., Лямкин Г.И., Манин Е.А.
[1] ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь
e-mail: snipchi@mail.stv.ru

В Российской Федерации лептоспирозы имеют широкое распространение [1]. Всего с 1956 г. по 2012 г. в России зарегистрировано 86598 случаев заболеваний лептоспирозами среди людей. На Юге России максимальный удельный вес в структуре заболеваемости лептоспирозами в этот период занимал Краснодарский край (71,7%). Ставропольский край находится на втором месте (14,5%). На территории Ставропольского края расположена значительная часть особо охраняемого эколого-курортного региона Российской Федерации – Кавказских Минеральных Вод (КМВ), в Краснодарском крае расположены основные морские курорты России.

В сложившихся условиях особое внимание при проведении эпидемиологического надзора за лептоспирозами следует уделять эпизоотологическому и эпидемиологическому анализу обстановки по данной инфекции, который подразумевает работу с большими объемами эпидемиологической и эпизоотологической информации, находящейся в большинстве случаев на бумажных носителях, что влияет на оперативность и скорость его проведения. На современном этапе в практику противоэпидемических учреждений активно внедряются геоинформационные системы (ГИС), повышающие эффективность оценки и анализа эпидемиологической ситуации. Использование ГИС включает сбор информации, формирование электронных баз данных, послойное отображение баз данных на электронной карте по заболеваемости или явлению [2]. До настоящего времени противоэпидемическая служба не располагала методическим документом, позволяющим на основе визуализации быстро оценивать данные по заболеваемости населения Ставропольского края лептоспирозами во взаимосвязи с хозяйственными и природными очагами как в целом по краю, так и в любом его административном районе. Впервые созданная электронная «База данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» позволяет накапливать, быстро сопоставлять ретроспективные данные с оперативной эпидемиологической информацией, активно пополнять имеющиеся данные, анализировать их и обрабатывать математическими и статистическими методами. Это особенно важно для рекреационных зон, т.к. можно определять

наиболее безопасные места, где исключена возможность контакта человека с возбудителями лептоспирозной инфекции, а также разрабатывать эффективные профилактические мероприятия.

Электронная «База данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» предназначена для практического использования и научной деятельности в учреждениях Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Россельхознадзора. Она может быть полезна в лечебно-профилактических учреждениях, в учебном процессе в учреждениях высшего и среднего профессионального образования Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

В электронной «Базе данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» содержатся данные официальной регистрации в Ставропольском крае заболеваний людей, неблагополучных по лептоспирозам сельскохозяйственных и домашних животных пунктам, данные положительных результатов исследований на лептоспироз объектов внешней среды (мелких млекопитающих) с 1998 г.

В работе используется электронная карта России. Наложение данных на электронную карту Ставропольского края и их дальнейший эпидемиологический анализ осуществляется с использованием программы ArcGIS 10 фирмы ESRI (США).В процессе статистической обработки и создания баз данных, используется программный продукт Microsoft Office Excel. Текстовый и графический материал оформляется на персональном компьютере IBMPentiumIV в программных продуктах «Microsoft Office 2007», «Microsoft Office 2010».

Схема использования ГИС – технологий в эпидемиологическом надзоре за лептоспирозами в Ставропольском состоит из 3 основных этапов:

Первый этап – подготовительный – включает анализ сведений по эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозов в Ставропольском крае и их упорядочение в разделе 1,2,3 электронной базы данных по заболеваемости лептоспирозами в Ставропольском крае. Раздел 1 «Эпидемиология», содержит сведения из эпидемиологических карт больных. Раздел 2 «Неблагополучные пункты» включает сведения о неблагополучных по лептоспирозу сельскохозяйственных и домашних животных пунктах в Ставропольском крае в соответствии с Приказами Управления ветеринарии Ставропольского края. Раздел 3 «Природная очаговость» включает сведения из лабораторных журналов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае» об инфицированных лептоспирами объектах внешней среды (мелких млекопитающих). Разделы 1, 2, 3 электронной Базы данных по лептоспирозам в Ставропольском крае созданы на платформе программного продукта MicrosoftOfficeExcel. Сформированная база данных может использоваться как самостоятельная единица, так и в виде рабочего компонента программы Arc GIS 10.

Второй этап – работа в среде Arc GIS 10 – представлен определенным порядком последовательно – выполняемых действий при работе с Arc GIS 10.

На данном этапе проводится визуализация информации, находящейся в базе данных на карте Ставропольского края.

Третий этап – выработка предложений для принятия управленческих решений. На данном этапе осуществляется подготовка предложений по совершенствованию профилактических мероприятий по лептоспирозам на основе проведенного анализа.

Информация, содержащаяся в таблицах электронной «Базы данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае», обрабатывается посредством использования фильтрации данных. Электронная «База данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» пополняется вставкой дополнительных строк в приложении Excel.

Разработанная «Электронная база данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» предоставляет множество возможностей для анализа эпидемиологической и эпизоотологической информации по лептоспирозам в Ставропольском крае и одновременного ее отображения с использованием геоинформационных систем. Так как информация, содержащаяся в электронной «Базе данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае», представлена для каждого конкретного случая заболевания людей лептоспирозом, каждого неблагополучного пункта по лептоспирозам животных, каждого инфицированного лептоспирами объекта внешней среды (мелкого млекопитающего), на карте воспроизводится точечное расположение этих объектов с сопутствующей им информацией. Для выполнения этой задачи используется приложение ArcMap программного продукта ArcGis 10.1.

Электронная «База данных (БД) по лептоспирозам в Ставропольском крае» проста в употреблении, т.к. использует общедоступные информационные системы.

Литература:

1. Ананьина, Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики. / Ю.В. Ананьина // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – № 2. (51). – С. 13–16.

2. Использование географических информационных технологий в эпидемиологической диагностике особо опасных инфекций / Л.С. Кирьякова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2004. – Вып.87. – С. 24–27.

СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ПРИРОДНЫХ И АНТРОПУРГИЧЕСКИХ ЛЗН НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Захаров К.С., Поршаков А.М.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

В настоящее время накоплен большой пул информации по эпидемиологическому надзору и эпизоотологическому мониторингу за лихорадкой Западного Нила (ЛЗН). Такой объем данных связан с расширением нозоареала этой особо опасной арбовирусной природно-очаговой трансмиссивной инфекцией, повышением активности возбудителя на многих территориях Российской Федерации. В период 1997–2013 гг. общее число больных составило 2 330 человек. Природными резервуарами вируса Западного Нила (ВЗН) являются многие виды как беспозвоночных (клещи, двукрылые), так и позвоночных (млекопитающие, птицы) животных. При исследовании полевого материала маркеры ВЗН были обнаружены в пробах от водоплавающих птиц и птиц антропогенного комплекса (большого баклана, серой цапли, сизой чайки, речной крачки, серой вороны, обыкновенного скворца, полевого воробья), а также кровососущих членистоногих (комаров Anopheles maculipennis и Ochlerotatus cataphylla, иксодовых клещей Rhipicephalus rossicus, Rh. schulzei, Dermacentor marginatus и D. reticulatus). Антиген и РНК вируса выявлены также в пробах грызунов: домовой и малой лесной мышей, обыкновенной, общественной и рыжей полевок [Красовская Т.Ю. и др, 2011; Красовская Т.Ю. и др, 2013; Матросов и др., 2013; Щербакова С.А. и др., 2009].

На современном этапе развития науки оптимальным решением для проведения пространственного анализа и последующего прогнозирования является создание электронной базы данных (ЭБД) на основе геоинформационных систем. ЭБД решают проблемы систематизации существующих, добавления новых, отбора по параметрам и статистического анализа данных [Поршаков А.М. и др., 2014]. Автоматизация рутинных операций позволяет уменьшить количество затрачиваемого времени и повысить точность прогноза вероятности формирования локальных эпизоотических очагов ЛЗН.

Первичный ввод данных осуществлялся в программе Excel приложения Microsoft Office. Затем в соответствии с разработанной формой таблицы были экспортированы в созданную БД на платформе Arc GIS. Доступ и работа с таблицами возможны с использованием СУБД MS Access приложения Microsoft Office. Структура созданного проекта эпизоотологического мониторинга очагов ЛЗН имеет вид послойной базы данных. При такой организации БД каждый ее компонент является самостоятельной единицей, что позволяет использовать тематические слои, таблицы и др. компоненты по

отдельности или все вместе. Картографической основой, на исследуемую территорию, послужила цифровая карта России масштаба 1:1000000. Помимо общедоступных слоев на территорию Саратовской области были специально созданы специализированные тематические слои, отвечающие направлению исследования (рис.).

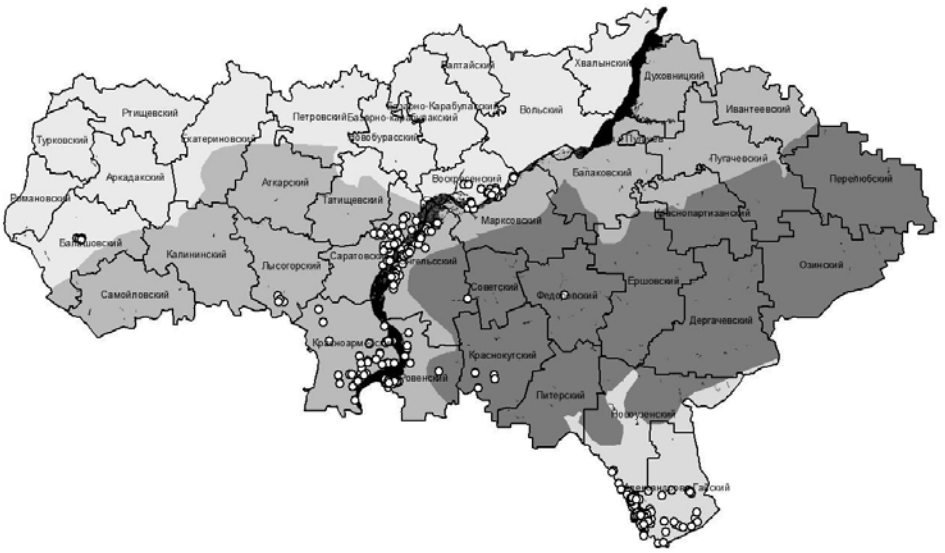


Рисунок. Места проведения обследований, наложенные на слои административно-территориального деления и ландшафтных зон Саратовской области.

Для анализа приуроченности природных очагов ЛЗН к различным ландшафтам был создан специализированный тематический слой, описывающий 27 подтипов геоботанических зон. Для более детального изучения формирования антропогенных очагов ЛЗН была использована крупномасштабная картографическая основа на территорию Саратовского и Энгельсского районов. Таким образом, созданная электронная база данных включает более 15 тематических наборов, которые содержат в себе более 60 классов объектов.

Информация, находящаяся в электронной базе данных является необобщенной в форме отдельных фактов полевых исследований

Созданная база данных по эпизоотологическому мониторингу за ЛЗН направлена на разностороннее информационное обеспечение исследований в области систематики, фаунистики, эпизоотологии и эпидемиологии.

Информации занесенная в БД подвергается комплексной обработке с учетом аспектов (географический, биотопический, токсономический и др.), имеющих значение при формировании очагов ЛЗН. После анализа единичных данных информация приобретает обобщенный вид и может быть представлена на карте в виде отдельного тематического слоя.

Таблица БД содержит информацию по следующим параметрам: географические координаты пункта обследования; дата сбора материала; количество добытых животных и видовая принадлежность; характеристики местообитания; метод отбора проб; количественные характеристики обследования; метод и результаты лабораторной диагностики.

Наполнение электронной БД атрибутивной информацией проводилось по архивным материалам и данным оперативного эпизотологического обследования Саратовской области за период с 2010 по 2014 гг. Объем данных составил 45 000 объектов по 354 обследованным пунктам со сведениями о местонахождении, характере и видовой принадлежности проб, а также результатах лабораторного исследования на ЛЗН. В базе данных содержится фаунистическая информация по: 19 видам комаров (39 734 экз. имаго и личинок); 4 видам клещей (2 357 экз.); 30 видам птиц (199 экз.) и 16 видам млекопитающих (2710 экз.).

Дальнейшее пополнение БД по эпизоотологическому мониторингу ЛЗН и многоуровневый анализ данных может использоваться в разработке прогноза эпидемиологической ситуации. Создание базы данных позволит ответить на многочисленные вопросы, связанные с формированием и функционированием новых природных и антропоургических очагов ЛЗН.

Литература:

1. Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Рябова А.В., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Федерова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кутырев В.В. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 3 (109). – С. 13–17.

2. Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Чекашов В.Н., Щербакова С.А., Билько Е.А., Куклев В.Е., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Кузнецов А.А., Рябова А.В., Князева Т.В., Сеничкина А.М., Казорина Е.В., Попов Н.В., Федерова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кожанова О.И., Кутырев В.В. Формирование очага лихорадки Западного Нила на территории Саратовской области // Журнал микробиологии и иммунологии. – 2013. – № 5. – С. 36–42.

3. Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шилов М.М., Кузнецов А.А., Захаров К.С., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Толоконникова С.И., Удовиков А.И., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Кресова У.А., Кедрова О.В., Попов Н.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Условия циркуляции вируса и предпосылки формирования природных очагов лихорадки Западного Нила в Саратовской области // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 17–22.

4. Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В. Создание электронной базы данных по эпизоотиям чумы в песчаных природных очагах Прикаспийской низменности в пределах Российской Федерации за весь период наблюдений (1923–2012 гг.) // Зоологические исследования регионов России и сопредельных территорий: Материалы III Международной научной конференции. – 2014. – С. 328–331.

5. Щербакова С.А., Билько Е.А., Найденова Е.В., Красовская Т.Ю., Слудский А.А., Князева Т.В., Матросов А.Н., Чекашов Н.В., Шарова И.Н., Самойлова Л.В., Кутырев В.В. Выявление антигенов арбовирусов в комарах и клещах, обитающих на территории Саратовской области. Мед паразитиол. и паразитарн. бол. 2009. 2:38–41.

БОКС БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ – ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ПЕРСОНАЛА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Шишкина О.Б., Тюрин Е.А., Чекан Л.В., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московская область

e.mail:turin@obolensk.org, info@obolensk.org

В соответствие с нормативной документацией [1, 2] все работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-IV групп должны проводиться в боксах биологической безопасности (ББББ) [1–7]. Боксы ББ максимально снижают риск заражения исследователя, обеспечивают относительную чистоту бактериологических исследований и практически исключают попадание ПБА в воздух рабочей зоны лаборатории. Боксы биологической безопасности, на наш взгляд, являются основным элементом индивидуальной защиты персонала для обеспечения условий соблюдения требований биологической безопасности в технологии микробиологических работ в лаборатории [2, 3, 8, 9]. Все боксы ББ, установленные в микробиологических лабораториях, должны проверяться на защитную эффективность [2, 3, 7, 9]:

– не реже одного раза в год;

– после монтажа и подготовки к эксплуатации по месту установки;

– после изменения места установки в помещении лаборатории или его ремонта.

При испытаниях ББББ проверяют эффективность работы фильтров очистки воздуха, скорости входящего и нисходящего воздушных потоков в рабочей зоне бокса, профиль распределения воздушных потоков в пределах внутреннего рабочего пространства камеры бокса.

Целью настоящего исследования являлась оценка защитной эффективности бокса ББ II класса отечественного производства.

Была проверена защитная эффективность 13 боксов биологической безопансости II класса тип 2 А, выпущенными ЗАО «Ламинарные системы» (Россия) до 2010 года и установленными в лабораториях Центра, для работы с ПБА III-IV групп. Эффективность оценивали физическими, аналитическими и инструментальными методами. Проводили:

– оценку места установки оборудования в условиях функционирующей лаборатории;

– комплектность необходимой проектной и технической документации на БББ;

– оценку герметичности конструкции БББ;

– дымовое тестирование входящего и нисходящего воздушных потоков;

– тестирование HEPA фильтров на проницаемость (DOP-тест);

– измерение скорости динамического входящего и нисходящего воздушного потока воздушного потоков;

– оформление протоколов испытаний с указанием результатов и замеров эксплуатационных характеристик бокса и дату следующей проверки.

Исходной информацией для анализа барьерных характеристик бокса ББ являлась техническая документация на смонтированное в боксе ББ оборудование (паспорт) и HEPA фильтры, установленных в боксе ББ.

Для инструментальной оценки применяли приборы, которые прошли госповерку и были признаны годными к работе: фотометр аналитический нефелометрический (ФАН) для измерения массовой концентрации частиц и термоанемометр «Testo 435-1» (производство Германия) для измерения скорости воздушных потоков с нижним пределом измерения 0,1 м/с.

Все работы по оценке средней интегральной скорости входящего и нисходящего воздушного динамических потоков, дымового теста, фильтров HEPA выполняли по методикам в соответствии с требованиями национального стандарта ГОСТ РЕН 12463-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности» [7] и ГОСТ 12.3.018-79. «Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Методы аэродинамических испытаний» [10].

Проверку комплексной защитной эффективности боксов ББ выполняли поэтапно. Первый подготовительный этап, включал: визуальный осмотр бокса ББ, контроль вентиляционного режима лабораторного помещения, очистки внешних поверхностей около места расположения выпускного фильтра, проведение дезинфекции бокса ББ с представлением акта. Второй основной этап, включал: проведение визуального контроля воздушных потоков по дымовому тесту, инструментальное измерение скоростей входящего и нисходящего воздушных потоков, определение проницаемости фильтров при заданных и фактических нагрузках. Третий заключительный этап, включал: вентилирование лабораторного помещения в режиме специального проветривания для удаления следов диактилфталата, подготовку протокола испытаний БББ, оформление протоколов с результатами испытаний.

Результаты проведенной работы представлены в таблице, из которой видно, что дымовой тест был положителен во всех случаях. У всех проходивших проверку боксов, рабочий проем соответствует нормативным требованиям и составлял 0,2 м. Это свидетельствует о соответствующей подготовке оборудования на заводе-изготовителе, правильной транспортировке и качественном монтаже на месте установки.

Таблица

Результаты оценки защитной эффективности боксов биологической безопасности «Ламинар-С»-1,2 и «Ламинар-С»-1,5 выпуск – до 2010 года

№ п/п	Тип бокса ББ	Класс защиты	Дымовой тест	Скорость входящего потока, м/с		Оценка проницаемости фильтров, к. %	
				Допуск	Факт	Допуск	Факт
1	«Ламинар-С»-1,2	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
2	«Ламинар-С»-1,2	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}5 \times 10^{-3}$
3	«Ламинар-С»-1,2	II А	+	0,4-0,7	0,45	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
4	«Ламинар-С»-1,2	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
5	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}2 \times 10^{-3}$
6	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}5 \times 10^{-3}$
7	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}2 \times 10^{-3}$
8	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
9	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
10	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
11	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,42	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
12	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$
13	«Ламинар-С»-1,5	II А	+	0,4-0,7	0,40	$0{,}9 \times 10^{-3}$	$0{,}1 \times 10^{-3}$

Скорость входящего воздушного потока составляла от 0,4 м/с (минимальная граница требуемой скорости) до 0,45 м/с, то есть практически оставалась в одном диапазоне с уровнями, требуемыми для эксплуатации бокса ББ такого класса по нормативным документам. Фильтры HEPA, установленные в боксах ББ, соответствовали нормативным стандартным требованиям, и их коэффициент проскока входил в интервал $0{,}1x10^{-3}\% - 0{,}5x10^{-3}\%$, что также находился в пределах допустимых значений.

Дымовая визуализация воздушных потоков позволила увидеть процесс вхождения динамического потока в открытый рабочий проем, определить профиль нисходящего воздушного потока, выявить критические точки. В результате испытаний установлено, что местами потенциального риска выхода ПБА за пределы бокса ББ являются: нижняя линия защитного стекла и верхние углы открытого проема рабочей камеры. Кроме того, наблюдался заброс восходящего воздушного потока с внутренней стороны защитного стекла, что может привести к загрязнению камеры бокса ББ извне.

Применение БББ различных классов во многом зависит от тех задач, которые ставят перед собой исследователи. Эффективное управление биологическими рисками в лаборатории с применением бокса ББ возможно только при проведении квалифицированных испытаний, грамотном анализе полученных данных и доведении полученной информации до персонала лаборатории. Персонал, работающий в боксе ББ, должен четко знать, где в рабочем объеме данного устройстве расположены зоны минимального и максимального рисков [11]. Каждый сотрудник лаборатории должен сдать периодический зачет по

знанию требований биологической безопасности при работе в боксе ББ. Важная роль в этом отводится службам биологического и эпидемиологического надзора и контроля, которые проводят бактериологический контроль работы персонала в БББ, контроль качества деконтаминации рабочих поверхностей дезинфицирующими растворами, контроль теоретических знаний и практических навыков исполнителей и обслуживающего персонала [12, 13].

Боксирование операций и процессов в микробиологической лаборатории является основным средством индивидуальной защиты персонала в системе биологической безопасности. Высокий уровень эффективнсти индивидуальной защиты сотрудников лаборатории возможен при проведении квалифицированного обслуживания БББ, грамотном анализе полученных данных, правильной эксплуатации боксов биологической безопасности.

Литература:

1. СП 1.3.1285-03 Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» – М.: Госсанэпиднадзор России. 2003. – 82 с.

2. СП 1.3.2322-08 Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». – М.: Роспотребнадзор. 2008. – 76 с.

3. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях – М.: Медицина. 1987. – 256 с.

4. Боровик Р.В., Дмитриев Г.А., Коломбет Л.В., Победимская Д.Д., Ремнев Ю.В., Тюрин Е.А., Федоров Н.А. Основы биологической безопасности: принципы и практика. Учебно-методическое пособие – М.: «Медицина для вас». 2008. – 303 с.

5. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. 3 издание. Всемирная организация здравоохранения. – Женева. 2004. – 139 с.

6. Тюрин Е.А., Шишкина О.Б. Оценка защитной эффективности боксов биологической безопасности // «Биозащита и биобезопасность». Изд. дом ВЭЛТ. 2012. т. IV, № 2 (11). – С. 26–35.

7. ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности». 46 с.

8. Тюрин Е.А. Индивидуальная и коллективная защита персонала лаборатории при проведении работ с микроорганизмами I-II групп патогенности // Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» – Новосибирск. Изд. «АРЕАЛ». 2013. – С. 209–211

9. Тюрин Е.А., Иванов С.А., Маринин Л.И.,. Дятлов И.А, Ляпин М.Н. Боксирующие устройства, используемые при проведении работ с ПБА I-II групп патогенности // «Проблемы ООИ». Саратов, 2010, в. 4 (106). – С. 23–27

10. ГОСТ 12.3.018-79. Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Методы аэродинамических испытаний.

11. Тюрин Е.А., Чекан Л.В. Использование боксов биологической безопасности для работы с микроорганизмами различных групп патогенности

и подготовка персонала // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы общей и военной гигиены». Санкт-Петербург. 2011 г. ВМА им С.М. Кирова. – С. 104

12. Чекан, Л.В., Тюрин Е.А. Шкафы биобезопасности – надежное средство профилактики внутрилабораторных заражений при работе с возбудителями ООИ // Материалы Всероссийской конференции, посвященной 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» «Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний» // Биотехнология. – Киров. 2008. – С. 426-428.

13. Шишкина, О.Б., Тюрин Е.А., Чекан Л.В. Защитная эффективность боксов биологической безопасности // Сборник научных статей III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Проблемы безопасности и защиты населения и территории от чрезвычайных ситуаций (Безопасность-2013)». – Уфа: ФГБОУ ВПО УГАТУ, Главное Управление МЧС России по Республике Башкортостан, 2013. – С. 239–250.

ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ С ТРАНСМИССИВНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ В ПРИВОЛЖСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ (ПФО) В 2013 ГОДУ

Ершов В.И.

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

micro@sinn.ru

В 2014 году ВОЗ провела Всемирный день здоровья, целью которого провозглашено информирование медицинской общественности и населения о проблеме профилактики широко распространенных в мире трансмиссивных болезней.

В течение последних десятилетий ПФО традиционно в числе лидеров в стране по заболеваемости целым рядом природно-очаговых инфекций, большинство которых передается кровососущими паразитами.

Из группы вирусных геморрагических лихорадок в 2013 году зарегистрирована заболеваемость **лихорадкой Денге** (переносчиками являются комары Aedes aegypti и Anopheles) (6 случаев или $0{,}02_{0/0000}$, из них – 4 случая в Оренбургской области и по 1 случаю – в Республике Башкортостан и Нижегородской области) и **лихорадкой Западного Нила** (в переносе участвуют комары, а также аргасовые и иксодовые клещи) (41 случай, что составило $0{,}14_{0/0000,}$ из них – 31 случай в Саратовской, 9 случаев в Самарской и 1 случай в Оренбургской областях).

Уровень заболеваемости **клещевым энцефалитом** по стране снизился в сравнении с 2012 годом на 17,5% ($1{,}58_{0/0000}$). В ПФО в 2012 году отмечено

466 случаев ($1,56_{0/0000}$), а в 2013 году – 272 случая клещевого энцефалита или $0,91_{0/0000}$. Несмотря на устойчивую многолетнюю тенденцию к снижению, заболеваемость клещевым энцефалитом регистрировалась в 9 регионах округа. Высокие показатели заболеваемости отмечались в Кировской области – $2,61_{0/0000}$, Пермском крае – $5,19_{0/0000}$, Удмуртской Республике – $3,02_{0/0000}$ и Башкортостане – $1,01_{0/0000}$. В остальных регионах заболеваемость проявилась единичными случаями.

Показатель заболеваемости **клещевым боррелиозом** по округу в 2012 году составил $4,46_{0/0000}$, а в 2013 году – $2,69_{0/0000}$, т.е. снизился на 66,0%, став приэтом в 1,5 раза ниже российского ($4,00_{0/0000}$). Наиболее высокие уровни заболеваемости клещевым боррелиозом достигнуты в Республике Удмуртия, Пермском крае и в Кировской области, где они в 3,3-4,3 раза превысили окружной.

В 2013 году зарегистрированы две относительно новые инфекции (выявлены и описаны в 80-х годах прошлого столетия), в передаче которых участвуют иксодовые клещи. Всего в ПФО было выявлено 30 случаев **гранулоцитарного анаплазмоза** ($0,10_{0/0000}$) и 5 случаев **моноцитарного эрлихиоза** ($0,02_{0/0000}$).

В ПФО постоянно отмечается высокий уровень **укусов клещами**. В 2013 году зарегистрировано 71 490 ($239,49_{0/0000}$). Принимая во внимание, что клещи одновременно могут являться хозяевами и переносчиками до 7 различных возбудителей инфекций одновременно, необходимо иметь эпидемиологическую настороженность и учитывать возможность возникновения не только моно-, но микст-инфекций.

В 2013 году заболеваемость **туляремией** (переносчиками возбудителей туляремии являются кровососущие членистоногие: иксодовые и гамазовые клещи, слепни, комары, блохи) снизилась к уровню предыдущего года в 2,8 раза ($0,05_{0/0000}$). Всего было зарегистрировано 15 случаев заболевания, из которых 5 случаев приходится на Республику Башкортостан, по 3 случая отмечено в Нижегородской, Кировской, Ульяновской областях, 1 случай выявлен в Саратовской области.

В 2012 г. зарегистрировано 4 случая **малярии** (в передаче участвуют комары рода Anopheles), в 2013 г. – 7 случаев или $0,02_{0/0000}$. В РФ отмечено 95 случаев ($0,07_{0/0000}$) впервые выявленного заболевания. В ПФО малярия зарегистрирована в 5 регионах округа (Республики Удмуртия и Татарстан – по 2 случая, Пермский край, Р. Башкортостан и Пензенская область – по 1 случаю).

В 11 регионах ПФО (кроме Р. Башкортостан и Чувашия, Оренбургской области) за 2013 год зарегистрировано 60 случаев заболевания **дирофиляриозом**, гельминтозом, передающимся при укусе комарами, зараженными от больных собак или кошек. Наибольшее число инвазий отмечено в Нижегородской области (17 случаев, или $0,53_{0/0000}$ против $0,19_{0/0000}$ в ПФО).

Как видно из вышесказанного, на территориях субъектов ПФО имеются условия для передачи и распространения ряда трансмиссивных болезней, обусловленных, большей частью, завозом инфекции из эндемичных регионов, а также для формирования собственных очагов.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ЭНЬЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН В 2013 ГОДУ

Камаева З.Р. [1], Кучимова Н.А. [1], Даянова З.Х. [1], Абдрахманова В.С. [1]
Рожкова Е.В. [2], Говорова В.Г. [2], Сыса А.М. [2], Ибрагимов Ш.И. [2]

[1] Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, Уфа;
rpnrb @02.rospotrebnadzor.ru

[2] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан»
fguz@02.rospotrebnadzor.ru

На фоне ликвидации полиомиелита более актуальной становится проблема неполиомиелитных энтеровирусных инфекций, которые проявляют тенденцию к нарастающему развитию.

Многообразие путей (воздушно-капельный, водный, фекально-оральный) и факторов передачи (питьевой, контактно-бытовой) определяют вспышки и спорадические случаи заболевания. На территории Республики Башкортостан в 2013 году по данным оперативной информации всего зарегистрировано 577 случаев энтеровирусной инфекции, из них лабораторно подтверждено 203 случая, показатель на 100 тысяч населения составляет 5,0. Случаи заболевания ЭВИ спорадические, в 89% случаев зарегистрированы среди неорганизованного населения. В организованных детских коллективах заболело 30 детей. Из общего числа заболевших дети до 17 лет составили 93%. Самые высокие показатели заболеваемости у детей отмечались в возрасте до 1 года (76,6%), 1 – 2 года (67,4), 3 – 6 лет (25,4).

В структуре заключительных диагнозов ЭВИ основную долю составили малые формы ЭВИ – 97,5% (198 сл.), в том числе: герпетическая ангина – 57%, афтозный стоматит – 25%, гастроэнтерит – 6%, ОРВИ – 4%, экзантемные формы 5%, в том числе: экссудативная эритема – 3%, экзематозно-лихорадочная форма – 2%, стволовой энцефалит 0,5%. Доля серозного менингита составила 2,5% (5 сл.). Летальных случаев не зарегистрировано.

По данным референс-центра по мониторингу за ЭВИ ФБУН «Нижегородский НИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора на территории республики от больных выделены 40 штаммов энтеровирусов, в т.ч.: серотип Коксаки составили – 63%, в том числе: Коксаки А10 (37,5%), Коксаки А5 (7,5%) Коксаки В3 (5%) и Коксаки А4 (5%), Коксаки В5 (2,5%), Коксаки А6 (2,5%); серотипы Есно составили – 25%, в том числе: Есно 9 (17,5%), Есно4 (2,5%), Есно25 (5%), ЭВ71 составили – 10% и экзотический Эв113 – 2,5%.

Наиболее часто среди энтеровирусов встречался вирус Коксаки А10, доля которой составляет 37,5%, клинически проявлялся герпангинами и гастроэнтеритом.

Энтеровирус ЭВ71 обнаружен у четверых больных с разной клинической картиной: ОРВИ, гастроэнтерит, герпетическая ангина и серозный менингит.

Больные проживают на разных административных территориях республики (гг. – Уфа, Мелеуз, районы – Иглинский, Стерлитамакский). Случаи не связаны между собой.

Приведенные данные указывают, на достаточно высокую степень циркуляции энтеровирусов среди населения и нельзя исключить в дальнейшем распространение их на территории республики.

Учитывая высокую контагиозность энтеровирусной инфекции, образования групповых случаев заболевания необходимо разработать и внедрить в практическую медицину методы специфической профилактики энтеровирусной инфекции.

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ МАНИФЕСТНОГО И ЛАТЕНТНОГО КОМПОНЕНТОВ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ГЕПАТИТА С В Г. НИЖНЕМ НОВГОРОДЕ

Михайлова Ю.В., Быстрова Т.Н.

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

gepatit-bystrova@yandex.ru

Актуальность проблемы гепатита С (ГС) обусловлена повсеместным распространением, значительным социально-экономическим ущербом, высокой частотой хронизации, активным вовлечением в эпидемический процесс лиц репродуктивного и трудоспособного возраста [1, 2, 3, 4]. Несмотря на успехи, достигнутые в изучении ГС, многофакторность развития и сложность структуры эпидемического процесса до сих пор не позволили в полной мере раскрыть закономерности течения этой инфекции [5, 6]. ГС отличается значительным преобладанием латентного компонента эпидемического процесса и выраженной территориальной неравномерностью по уровню заболеваемости и широте распространения инфекции, что обусловлено влиянием социально-экономических факторов и географических условий [7, 8]. У подавляющего большинства больных заболевание протекает скрыто (латентно) и, как правило, остается не диагностированным, поэтому именно хронические и латентные варианты ГС определяют основную часть эпидемического процесса. Все вышеизложенное определяет целесообразность проведения исследований по изучению современных проявлений эпидемического процесса ГС по отдельным субъектам РФ.

Цель исследования

На основе официальных статистических данных изучить динамику и тенденции заболеваемости острым, впервые выявленным хроническим ГС и носительства вируса ГС в г. Н. Новгороде с 1994 г. по 2012 г.

Материалы и методы исследования

Анализ этиологической структуры острых вирусных гепатитов (ОВГ), а также динамики заболеваемости манифестным острым (ОГС), впервые выявленным хроническим ГС (ХГС) и «носительства вируса ГС» на территории г. Н. Новгорода проведен на основе данных официальной статистики ФБУЗ «ЦГиЭ по Нижегородской области» (формы отчетности № 1, 2) за период с 1994 г. по 2012 г. Всего проанализированы 109 единиц форм отчетности. Также для изучения этиологической структуры ОВГ и интенсивности манифестного компонента эпидемического процесса ГС проведено исследование сыворотки/плазмы крови от 637 больных с явлениями гепатита, поступивших в инфекционные стационары гг. Н. Новгород, Дзержинск и Балахна. Для выявления территорий риска рассмотрены данные по заболеваемости ОГС в 8 районах города за период с 1994 г. по 2010 г. Статистическая обработка результатов включала определение показателя средних величин (M), стандартной ошибки средних величин (m), t-критерия Стьюдента (различия считали достоверными при вероятности >95 % ($p<0,05$)), периодичности и тенденций многолетней динамики заболеваемости с расчетом среднемноголетнего темпа прироста/снижения [9].

Результаты исследования и их обсуждение

По данным официальной статистики, удельный вес ГС в этиологической структуре ОВГ в г. Н. Новгороде варьировал от 1,2±1,0% в 2005 г. до 26,54±3,2% в 1999 г. В результате проведенного в 2010 г. лабораторного исследования доля ГС оказалась в 1,7 раза ниже (9,0±2,5%) данных официальной регистрации за этот год (14,0±2,7%), что обусловлено расширением этиологической структуры ОВГ за счет выявления специфических маркеров всех известных нозологических форм ВГ. При этом, среди всех установленных случаев ГС в 65,0±4,4% диагностирован впервые выявленный ХГС.

Анализ многолетней динамики заболеваемости регистрируемыми формами ГС в г. Н. Новгороде выявил закономерности, присущие большинству регионов РФ (рисунок 1). Установлена выраженная тенденция к снижению показателей ОГС (T=-9,8), средний многолетний уровень составил 5,9 0/0000, что в 1,2 раза ниже общероссийских данных. В динамике ОГС можно выделить два периода. В первом периоде (1994–2001 гг.) отмечен постоянный рост уровня заболеваемости (T1=11,3), очевидно, обусловленный как улучшением диагностики ГС, так и ухудшением социально-экономической ситуации в обществе в связи с широким распространением наркомании. Во втором (2002–2012 гг.) выявлена умеренная тенденция к снижению заболеваемости (T2=-2,12). В течение анализируемого периода зафиксированы 3 цикла эпидемического процесса с подъемам через 3-4 г. В 2010 г. начал свое формирование четвертый цикл эпидемического процесса, который продолжается до настоящего времени.

Анализ заболеваемости ОГС по районам города показал, что уровень заболеваемости достоверно выше в Автозаводском и Канавинском районах (среднемноголетний показатель составил 8,0 0/0000 и 7,0 0/0000 против 6,3 0/0000 в целом по городу). Тенденция к снижению заболеваемости ОГС

отмечена во всех районах, что свидетельствует об однонаправленности факторов, влияющих на эпидемический процесс.

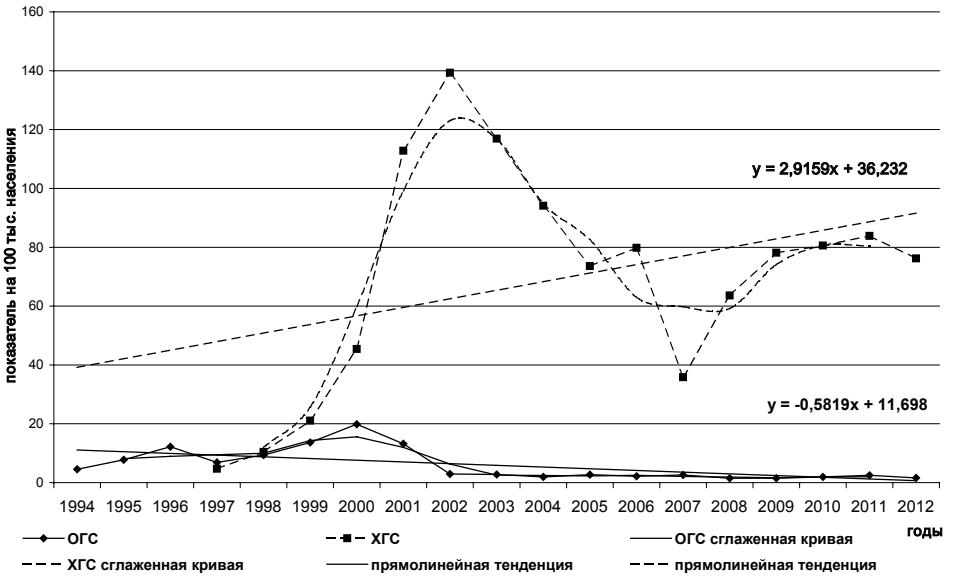


Рисунок 1. Динамика заболеваемости острым и впервые выявленным хроническим гепатитом С на территории г. Н. Новгорода в 1994–2012 гг.

В отличие от ОГС, многолетняя динамика заболеваемости ХГС характеризуется выраженной тенденцией к росту (Т=8,15), среднемноголетний уровень составил 69,8 0/0000, что в 2,3 раза выше общероссийских данных. При этом зафиксировано формирование одного полного цикла с 1998 г. по 2007 г. Распространенность «носительства вируса ГС» значительно превышала уровни заболеваемости как ОГС, так и ХГС.

Вместе с тем, на фоне снижения официальных показателей заболеваемости ОГС и стабилизацией ХГС на протяжении всего периода регистрации данной нозологической формы прослеживается постоянный рост распространенности ГС среди населения города.

При сопоставлении динамических кривых и анализе кумулятивных показателей в г. Н. Новгороде (с 1:0,7 в 1997 г. до 1:48 в 2012 г.), как и по России (1:0,5 в 1997 г. до 1:26 в 2012 г.) отмечен рост соотношения между уровнями заболеваемости ОГС и ХГС, в 2012 г. этот показатель в г. Н. Новгороде в 2 раза превысил таковой по РФ. Обращает на себя внимание, что в отличие от некоторых территорий России с промежутками между пиками заболеваемости ОГС и ХГС в пять лет, в г. Н. Новгороде аналогичные периоды разделены тремя годами. Постоянное увеличение доли впервые выявленного ХГС и сокращение промежутков между пиками заболеваемости острой и хронической формой инфекции свидетельствуют о росте темпов накопления источников инфекции в настоящее время и определяют неблагоприятный прогноз развития эпидемической ситуации по ГС на исследуемой территории в будущем.

Таким образом, на примере крупного города европейской части России по данным официальной статистической регистрации получены новые знания об особенностях эпидемического процесса ГС-инфекции в современных условиях, проявившиеся в изменении динамики распространенности манифестного и латентного компонентов эпидемического процесса. Рост заболеваемости впервые выявленным хроническим гепатитом по сравнению с предшествующим трехлетним периодом, что является неблагоприятным прогностическим признаком дальнейшего развития эпидемической ситуации в регионе

Список литературы:

1. Быстрова Т.Н. Парентеральные вирусные гепатиты: этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика: учебное пособие для студентов медицинских ВУЗов / Т. Н. Быстрова, Е. И. Ефимов, А. Н. Арзяева. – Н.Новгород: НГМА, 2010. 180 с.

2. Масалова О.В. Вирусный гепатит С: новые подходы к изучению патогенеза и разработка средств диагностики и профилактики: автореф. дис….д-ра. биол. наук: 03.02.02. / Масалова Ольга Владимировна. М., 2011. 31 с.

3. Albeldawi, M. Hepatitis C virus: Prevention, screening, and interpretation of assays / M. Albeldawi, E. Ruiz-Rodriguez // Cleve Clin J Med. 2010. Vol. 77(9). P. 616–626.

4. Ghany M.G. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C: An Update / M. G. Ghany, D. B. Strader, D. L. Thomas // Hepatology. 2009. Vol. 49. № 4. P. 40.

5. Ершова О.В. Современные проявления эпидемического процесса гепатита С, активность естественных путей передачи и совершенствование профилактики этой инфекции: автореф. дис….д-ра. мед. наук: 14.00.30 / Ершова Ольга Николаевна. М., 2006. 22 с.

6. Ющук Н.Д. Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитом С / Ющук Н.Д., Ивашкин В.Т., Жданов К.В. М., 2013. 64 с.

7. Исаева Н.В. Особенности эпидемического процесса гепатитов В, С и оптимизация эпидемиологического надзора в новых социальных условиях / Исаева Н.В. // Материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М., 2007. Т. 1. С. 341–342.

8. Заботина Е.Е. Эпидемиологические и молекулярно-генетические аспекты гепатитов В и С: автореф. дис….канд. мед. наук: 14.02.02, 03.02.02 / Заботина Екатерина Евгеньевна. М., 2011. 25 с.

9. Общая эпидемиология с основами доказательной медицины: руководство к практическим занятиям / Покровский В.И. [и др.]. М., 2008. 400 с.

ИЗУЧЕНИЕ СМЕРТНОСТИ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ ОТ ИНФЕКЦИОННЫХ И ПАРАЗИТАРНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Сергеева А.В., Саперкин Н.В., Чубукова О.А., Ксенофонтова Т.В.
ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород
saperkinnv@mail.ru

Инфекционные болезни продолжают составлять значительную проблему для общественного здоровья как в развитых, так и развивающихся странах. Оценка смертности от инфекционной патологии как составляющая общей смертности населения является одним из важных аспектов эпидемиологического анализа в отечественном здравоохранении. Цель исследования: ретроспективное изучение тенденций смертности от инфекционной патологии в России [8, 9].

В дореволюционной России инфекционные болезни были основной причиной смерти. За короткий период, с 1909 по 1913 г. от кори 487 тыс., от тифов – 261 тыс., от кишечных инфекций – 1 215 тыс. человек. В Нижнем Новгороде по состоянию на 1903–1905 гг. были зарегистрированы смертельные исходы от 14 нозологических форм (всего 1 769 случаев). В среднем, в городе отмечалось 589 случаев смертей от различных инфекционных заболеваний в год [5, 7].

В начале XX века в России инфекции являлись причинами смерти в 16% случаев. В частности, в 1913 г. смертность от острозаразных болезней находилась на уровне 471 на 100 тыс. населения, а общая смертность была равна 29,1 на 1 000 жителей. В структуре причин смерти от инфекционных болезней превалировал туберкулез (48,4%), т.е. практически каждый второй, погибший от инфекции, умирал от туберкулеза. Удельный вес инфекций с аэрозольным механизмом передачи, в основном «детских», составлял 28,8%, острых кишечных инфекций – 19,3%. Именно эти болезни становились причиной смерти среди детей младшего возраста. Например, в Петрограде в 1920 г. она достигала 81 на 10 тыс. населения [4].

В годы Великой Отечественной войны возросла смертность от туберкулеза – в городах она достигала 20% в структуре общей смертности мужчин (в 1945 г. – 19,9%). Смертность от «детских» инфекций в освобожденных областях на 51,0% превышала довоенный уровень. В послевоенные годы удельный вес смертности от инфекционной патологии в структуре смертности от всех причин стремительно снижался и к 1960 г. стал равен 10%. Эффективное снижение смертности от инфекционных болезней, в первую очередь от туберкулеза, привело к тому, что в 70–80-ые годы коэффициент смертности от инфекционных и паразитарных болезней снизился до 21–27 на 100 тыс. населения, а их доля в структуре смертности от всех причин не превышала 3%. Ведущей причиной смерти был, как и прежде, туберкулез (41%), на втором месте находились острые кишечные инфекции (26%). Количественные оценки смертности от инфекций в научной литературе в тот период почти

отсутствовали, что было связано с известными ограничениями в доступности и публикации сведений о смертности вплоть до начала 90ых годов XX века [3, 6].

Современная ситуация по смертности населения России изучена по данным периода с 2008 по 2010 гг., полученным из ежегодных отчётов Министерства здравоохранения и социального развития РФ «Медико-демографические показатели на территории Российской Федерации». Показатели смертности от всех причин колебались в пределах от 1416,8 $^{o}/_{oooo}$ до 1462,4 $^{o}/_{oooo,}$ а по разделу инфекционных и паразитарных болезней (ИПБ) составлял в 2010 г. – 23,7 $^{o}/_{oooo}$.

Анализ распределения количества смертей от ИПБ в зависимости от пола выявил, что показатели смертности среди мужского населения были в 3,5-4 раза выше, по сравнению с женским. В 2008–2009 гг. уровень смертности от некоторых ИПБ был выше среди сельского населения по сравнению с городским. В 2010 г. ситуация изменилась и показатели смертности от некоторых ИПБ были несколько выше среди городского населения по сравнению с сельским (23,9 и 23,0 на 100 тыс. соответственно).

Распределение показателей смертности от ИПБ среди различных возрастных групп имело выраженные различия. На протяжении 5 лет в период с 1991 по 1995 гг. наибольшее количество смертей от ИПБ регистрировались среди следующих групп: 45–59 лет и 60–74 года. Начиная с 1996 по 2007 гг. (12 лет) ситуация изменилась и основными группами стали лица 30–44 лет и 45–59 лет. Следует отметить, что если на протяжении 1991–2007 гг. основной возрастной группой с высокими коэффициентами смертности были лица от 45–59 лет, то в период с 2008 по 2010 гг. (3 года) произошло смена доминирующей группы в сторону лиц в возрасте от 30 до 44 лет. Таким образом, в настоящее время можно отметить тенденцию к увеличению количества смертей от ИПБ среди наиболее работоспособной группы населения. Следует отметить, что в имеющейся официальной информации пояснения по этому поводу отсутствуют, хотя, безусловно, подобные разъяснения были бы крайне важны для специалистов в области профилактической медицины. Минимальные показатели смертности обнаружены среди молодого населения в возрасте от 15 до 29 лет за период с 1991 по 1995 гг. и среди детей до 14 лет в период с 1995 по 2010 гг.

Анализ показателей смертности от ИПБ среди детей различных возрастных групп выявил высокие показатели смертности грудных детей до 1 года. За период с 2008 до 2010 гг. среднемноголетний показатель смертности составил 29,7±0,8 на 100 тыс. родившимися живыми. Следует отметить, что основной причиной смерти, как у новорожденных, так и у детей до 3 лет были кишечные инфекции. Показатели смертности в 2010г. от данной патологии составляли среди новорожденных 7,6 $^{o}/_{oooo,}$ а для детей в возрасте 1 год – 1,4 $^{o}/_{oooo}$. Высокий показатель смертности от туберкулёза приходился на возраст от 50 до 54 лет (27,9 $^{o}/_{oooo}$), а от вирусного гепатита – на возрастную группу от 60 до 64 лет (1,8 на 100 тыс.).

За период с 2009 по 2010 гг. в структуре смертности населения России от ИПБ основной причиной смерти являлся туберкулёз. На его долю в 2009 г.

приходилось 70% и несколько меньше – в 2010 году (65%). На втором месте находилась ВИЧ-инфекция (16,5% в 2009г. и 20,2% в 2010 г.). На третьем месте среди причин смерти – септицемия (4,4% в 2009 г. и 5,3% в 2010 г.) и вирусный гепатит (3,5% в 2009 г. и 3,8% в 2010 г.).

Имелась территориальная неравномерность распределения стандартизованных показателей смертности. На протяжении 3 лет самые высокие значения регистрировались на территориях Дальневосточного федерального округа (63,4±1,1$^{o}/_{oooo}$). Наименьшие стандартизованные показатели смертности отмечались на территориях Центрального ФО (в среднем, 15,0±0,7$^{o}/_{oooo}$) и Приволжского ФО (19,9± 0,14$^{o}/_{oooo}$).

Стандартизованные показатели смертности имели отличия по нозологиям. Наивысшие показатели смертности в 2010 году от туберкулёза регистрировались среди жителей Сибирского ФО (25,7 $^{o}/_{oooo}$), Дальневосточного ФО (23,2 $^{o}/_{oooo}$) и Уральского ФО (16,7 $^{o}/_{oooo}$). Наименьшие значения отмечались на территории Центрального ФО (7,9 $^{o}/_{oooo}$). В отношении вирусного гепатита в 2010 г. высокий уровень смертности сформировался среди населения Северо-Западного ФО (3,3 $^{o}/_{oooo}$) и существенно меньший – Приволжского ФО (0,2 $^{o}/_{oooo}$). Пневмонии являлись важным компонентом смертности в группе болезней органов дыхания. Распределение количества смертей имело выраженные различия по территориям. Так, в 2010 г. высокие показатели смертности от пневмоний отмечались в Дальневосточном ФО (66,1$^{o}/_{oooo}$), Сибирском ФО (42,2$^{o}/_{oooo}$).

В настоящее время ежегодно в России выявляется более 30 млн. случаев инфекционных и паразитарных болезней. В частности, за 2011 г. в стране зарегистрировано 33 млн. 732 тыс. случаев (в 2010 г. – 30 млн. 800 тыс.). По официальным данным, за период с 1990 по 2010 показатель смертности от инфекционных и паразитарных болезней находился в пределах от 12,0 до 27,2$^{0}/_{0000}$ (в среднем, 21,4$^{0}/_{0000}$). Смертность от данного вида патологии с 1998 по 2004 гг. увеличилась на 31% среди мужчин и на 82% среди женщин среднего возраста [1,2].

В 2000 году Роспотребнадзор сообщал, что по уровню смертности (24,8 на 100 тыс.) населения от инфекционных и паразитарных болезней наша страна вернулась к состоянию 1970, т.е. на 30 лет назад, причем более, чем в 80% случаев рост смертности по причине инфекций определялся туберкулезом. Однако, в 2007 г. показатель несколько возрос и составил 27,2 на 100 тыс. населения. По сравнению с развитыми европейскими странами, напр., Францией, смертность от инфекции в России остается на более высоком уровне. В динамике в 90-ые гг. в нашей стране по сравнению с Францией отмечался более быстрый рост смертности населения. Число смертей от некоторых ИПБ заметно различается по регионам-субъектам РФ, что обусловлено как различиями в интенсивности смертности, так и особенностями возрастной структуры населения этих регионов. Например, в 2012 г. значения коэффициента смертности от ИПБ варьировали от 2 в Ненецком автономном округе до 65 умерших в расчете на 100 тыс. в Республике Тыве (в т.ч. 57 от туберкулеза). В центральной половине регионов они колебались от 12 до 26 при медиане 17 на 100 тыс.

умерших. Место ИПБ в структуре общей смертности также менялось: от 0,2% в Ненецком автономном округе и Белгородской области до 5,9% в Республике Тыве [10].

Литература:

1. Анализ причин смертности населения России / М.И. Давыдов [и др.] // Вестник российской АМН. – 2007. – №7. – С. 17–26.

2. Здоровье России: атлас / Под ред. Бокерия Л.А. 9 изд., М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2012. – 408 с.

3. Ивлиева О.М. Эпидемиологические и социально-экономические аспекты смертности от инфекционных болезней в СССР: диссертация канд. мед. Наук. – М., 1985.

4. Кактурский Л.В., Зайратьянц О.В. Медико-демографические показатели России за столетие (1907–2007 гг.). / Л.В. Кактурский О.В., Зайратьянц // Здравоохранение. – 2010. – №1. – С. 28-37.

5. Материалы к докладу Онищенко Г.Г на науч.-практич. конференции, посвященной 80-летию образования государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации / Под ред. Онищенко Г.Г. (Москва, 2–3 октября 2002 г.). – М. – СПб, 2002.

6. Прохоров Б.Б. Здоровье населения России в прошлом, настоящем и будущем. Отдельный оттиск. – 2001. – С. 148–163.

7. Чубукова, О.А. Инфекционная заболеваемость в Нижегородской области в 1903 и 2007 гг.: исторические параллели / Чубукова О.А. // Медицинский альманах. – 2008. – № 2 (2). – С. 145.

8. Шаханина И.Л., Игонина Е.П. Динамика смертности от инфекционных болезней в России / Шаханина И.Л., Игонина Е.П // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. – № 4. – С. 47–50.

9. Fears, R., van der Meer, J.W., ter Meulen, V. The changing burden of infectious disease in Europe / R. Fears, J.W. van der Meer, V. ter Meulen // Sci Transl Med. – 2011. – Oct 5;3(103):103cm30.

10. http://www.demoscope.ru/weekly/2013/0543/barom02.php Институт демографии Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики» 21.08.2013.

РАЗДЕЛ 2.
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МОНИТОРИНГ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ

ЗНАЧИМОСТЬ ОБСЛЕДОВАНИЯ ДЕТЕЙ С ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЦИРКУЛЯЦИИ ЭНТЕРОВИРУСОВ

Фомина С.Г., Голицына Л.Н., Луковникова Л.Б., Морозова О.В., Сашина Т.А., Зверев В.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.

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

mevirfc@rambler.ru

Энтеровирусы человека (ЭВ) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*, порядок *Picornavirales*) – мелкие, безоболочечные РНК-содержащие вирусы, представлены более 100 серотипами, которые на основании молекулярно-биологических свойств делят на четыре вида: A, B, C и D. ЭВ способны вызывать разнообразные клинические симптомы: от легких лихорадочных заболеваний до тяжелых состояний, таких как паралитический полиомиелит, острый вялый паралич, серозный менингит, экзантема полости рта и конечностей и т.д.

В Российской Федерации эпидемиологический надзор за энтеровирусной (неполио) инфекцией (ЭВИ), включающий, в том числе, и мониторинг циркуляции ЭВ, был введен в 2008 г. Контроль распространения ЭВ осуществляют при анализе проб клинического материала от больных серозным менингитом (СМ) (при надзоре за неполиомиелитными энтеровирусами (НПЭВ)), острым вялым параличом, здоровых людей и объектов окружающей среды (при надзоре за вирусом полиомиелита). В тоже время наше предыдущее исследование показало эффективность применения мониторинга циркуляции ЭВ на основе анализа проб от детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) [Фомина С.Г., Новикова Н.А., 2011]. Целью данного исследования явилось изучение типового и видового разнообразия НПЭВ, идентифицированных у больных с ОКИ в Нижегородской области в 2010-2013 гг.

В работе было использовано 4 737 образцов копроматериала детей в возрасте 0–17 лет, госпитализированных в инфекционный стационар г. Н. Новгорода с первичным диагнозом ОКИ в 2010–2013 гг., а так же 182 пробы стула пациентов с ОКИ, заведомо положительных на наличие РНК ЭВ, госпитализированных в инфекционные стационары Нижегородской области в период 2010–2013 гг. РНК ЭВ для постановки ОТ-ПЦР выделяли из копрофильтратов с применением комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-сорб» производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению.

ОТ осуществляли с использованием реагентов производства ЗАО «Силекс» (Москва). ПЦР для обнаружения кДНК ЭВ и вакцинных полиовирусов проводили с применением комплекта реагентов для ПЦР «АмплиСенс Enterovirus-FL» и «АмплиСенс Poliovirus-FL», производства ФБУН ЦНИИЭ (Москва), согласно инструкции по применению. Вид и серотип выявленных НПЭВ определяли методом частичного секвенирования участка гена VP1 с использованием универсальных для всех ЭВ праймеров [Nix W.A. et al., 2006]. Для идентификации близкородственных штаммов ЭВ анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов гена VP1 с использованием онлайн ресурса BLAST [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/].

При обследовании детей, госпитализированных в инфекционный стационар г. Н. Новгорода с первичным диагнозом ОКИ, ЭВ были обнаружены в 242 случаях, что составило 5,1%. Выявленные в ходе скрининговых исследований ЭВ были впоследствии дифференцированы на вакцинные полиовирусы и НПЭВ. Доля полиовирусов среди выявленных ЭВ составила 13,7%. Частота обнаружения НПЭВ у детей, госпитализированных с ОКИ в изучаемый период времени, в среднем составила 4,4% (2,3–6,6%).

С целью изучения типового и видового разнообразия ЭВ, идентифицированных у больных ОКИ детей, проведено типирование обнаруженных НПЭВ с использованием метода секвенирования серотипового участка гена VP1 ЭВ. Тип вируса установлен в 143 случаях (у 57 детей из г. Нижнего Новгорода и у 86 пациентов из Нижегородской области). Всего идентифицировано 28 серотипов (табл.).

Таблица

Спектр типов НПЭВ, выявленный у детей с ОКИ в Нижегородской области в 2010–2013 гг.

№ п/п	Вид	Тип	Годы				Всего	
			2010	2011	2012	2013	абс.	%
1	A	КА2	2	6	1		9	6,3
2		КА4	4	2	2	1	9	6,3
3		КА5	2	1			3	2,1
4		КА6	4		4	1	9	6,3
5		КА10		1	2	1	4	2,8
6		КА16	1	5	2	1	9	6,3
7		ЭВ76		1	2		3	2,1
8	B	КА9	4	6		1	11	7,7
9		КВ1		1	5		6	4,2
10		КВ2	1		1		2	1,4
11		КВ3		1	2		3	2,1

12		КВ4	3	1			4	2,8
13		КВ5	4			1	5	3,5
14		Е2				1	1	0,7
15		Е3	1	2			3	2,1
16		Е4		2			2	1,4
17		Е6		7	4		11	7,7
18		Е9		1			1	0,7
19		Е11			3		3	2,1
20		Е14			1		1	0,7
21		Е18	1	2	1	1	5	3,5
22		Е25	1	1			2	1,4
23		Е30	1			22	23	16
24		КА1	1		1		2	1,4
25		КА20	1				1	0,7
26	С	КА22	4	2	1		7	4,9
27		КА24			1		1	0,7
28		ЭВ116	2	1			3	2,1
Итого			**37**	**43**	**33**	**30**	**143**	**100**

Установленный спектр включал, во-первых, энтеровирусы – признанные этиологические агенты СМ. В период 2010–2011 гг. вирус Коксаки А9 являлся наиболее распространенным вирусом (12,5%) и по частоте обнаружения с ним конкурировали вирусы КВ5 в 2010 г. и ECHO6 в 2011 г. Стоит отметить, что КА9 в 2010 г. доминировал и среди ЭВ, обусловивших подъем заболеваемости ЭВ-СМ в Нижнем Новгороде и Нижегородской области и на ряде других территорий РФ, тогда как в 2011 г. по частоте обнаружения у больных СМ и широте распространенности его обогнал ECHO6 [Новикова Н.А. и др., 2012]. В 2012 г. КА9 не выявлялся у детей с ОКИ, а одним из самых часто встречаемых вирусов стал ECHO6 (12,1%).

В 2013 г. абсолютно доминирующее положение среди выявленных НПЭВ занимал вирус ECHO30, на долю которого пришлось 73,3% от типированных ЭВ. Первые находки этого вируса были зафиксированы в июне 2013 г., т.е. в период предшествующий подъему заболеваемости ЭВ-СМ, и в дальнейшем вирус ECHO 30 продолжал обнаруживаться у больных ОКИ в течение всего анализируемого периода.

Вирусы Коксаки В – являющиеся основными этиологическими агентами миокардита и часто встречающиеся так же при ЭВ-СМ, были идентифицированы нами у детей с ОКИ в 1,4–4,2% случаев. Наиболее часто встречаемым среди них был вирус Коксаки В1 (4,2%) и Коксаки В5 (3,5%), который регистрировался в 2010–2011 гг. при различных формах ЭВИ на ряде территории России [Новикова Н.А. и др., 2012].

Во-вторых, спектр серотипов НПЭВ включал вирусы, наиболее часто ассоциируемые с герпангиной и экзантемой полости рта и конечностей. Так, вирус КА16 – являющийся основным возбудителем (совместно с близкородственным ему ЭВ71 и другими ЭВ вида А) ящуроподобного заболевания и герпангины, был одним из самых часто встречаемых вирусов в этом исследовании (6,3%) и выявлялся у детей с ОКИ ежегодно, примерно в одинаковом числе случаев при микст- и моноинфекции. Вирусы Коксаки А2, А4, и А6, так же часто встречаемые при экзантеме и герпангине, были идентифицированы нами в 6,3% случаев, каждый.

В-третьих, у детей с ОКИ идентифицированы НПЭВ, часто обнаруживаемые в других исследованиях при диарейных заболеваниях [Ворошилова М.К., 1979]. Так, вирус Коксаки А22 выявлен нами в 4,9% случаев, при этом в 67,0% – при моноэнтеровирусной инфекции. Обнаружение КА22 в большинстве случаев при моноинфекции может свидетельствовать о его возможной роли в возникновении ОКИ у детей. Вирусы КА1, КА20 и КА24 выявлялись в небольшом проценте случаев (1,4%, 0,7%, 0,7%, соответственно). ЭВ116 у детей с диареями был идентифицирован в 2,1% случаев, при этом наиболее часто в микстинфекции с другими вирусами кишечной группы.

Охарактеризованный методом секвенирования области VP1 генома пейзаж типов НПЭВ, наблюдаемый у детей с ОКИ в Нижегородской области в 2010–2013 гг., позволил провести оценку относительного видового распределения ЭВ. Установлено, что на долю ЭВ вида А приходится 32,2%, на ЭВ вида В – 58,0% и на ЭВ вида С – 9,8%. Анализ вирус-вирусных ассоциаций показал, что достоверно чаще ЭВ вида А ($p<0,01$) и В ($p<0,001$) выявляются при моноэнтеровирусной инфекции, тогда как НПЭВ вида С – примерно в одинаковом количестве случаев при моно- и микстинфекции (рис.).

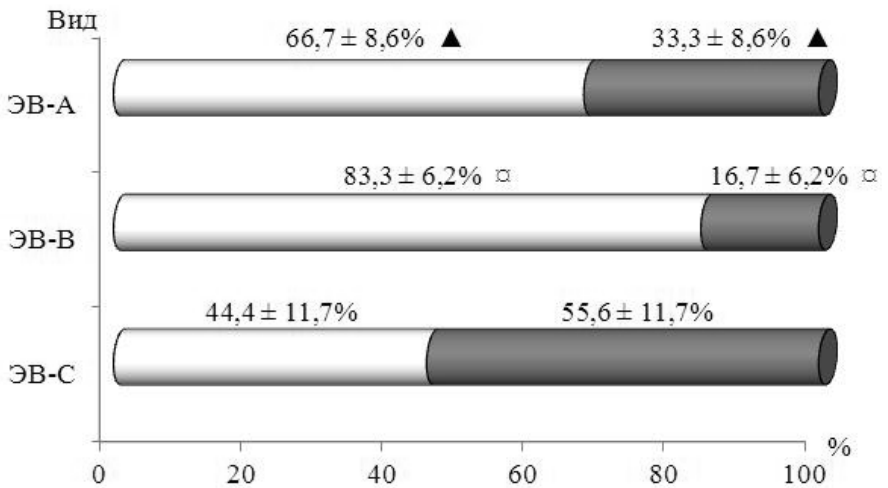


Рисунок. Распределение видов НПЭВ, выявленных у детей с ОКИ в Нижегородской области в 2010–2013 гг..

▲ различия достоверны при $p < 0,01$; ¤ различия достоверны при $p < 0,001$

Применение молекулярно-генетических методов исследования позволило идентифицировать в высоком проценте случаев НПЭВ вида А и С, циркуляция которых была ранее недооценена во всем мире, поскольку вирусы Коксаки А плохо реплицируются в культуре ткани и их обнаружение и серотипирование с использованием культуральных методов было весьма затруднительно.

Таким образом, охарактеризован пейзаж типов НПЭВ (Коксаки А типов 1, 2, 4–6, 9, 10, 16, 20, 22, 24; Коксаки В типов 1–5, ECHO типов 2–4, 6, 9, 11, 14, 18, 25, 30; ЭВ76, ЭВ116), обнаруженных у детей с ОКИ в Нижегородской области в 2010-2013 гг. Показано, что у больных ОКИ выявляются НПЭВ вида А (32,2%), В (58,0%) и С (9,8%). Отмечено, что ЭВ вида А ($p<0,01$) и В ($p<0,001$) достоверно чаще выявляются при моноэнтеровирусной инфекции. Полученные результаты свидетельствуют о значимости обследования детей с ОКИ в эпидемиологическом надзоре для установления наиболее полного спектра типов ЭВ, циркулирующих среди населения.

МОЛЕКУЛЯРНОЕ «СЕРОТИПИРОВАНИЕ» ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РОССИИ В 2013 г.

Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б., Зверев В.В., Парфенова О.В., Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Григорьева Г.И.

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

mevirfc@rambler.ru

Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ), насчитывающие более 100 серологических типов, играют важную роль в инфекционной патологии человека, вызывая заболевания, различающиеся по клиническим проявлениям и тяжести течения: легкую лихорадку, ОРВИ, ОРВИ с нейротоксикозом, острый гастроэнтерит, геморрагический конъюнктивит и увеит, серозный менингит и менингоэнцефалит, герпангину, экзантему полости рта и конечностей (HFMD), паралитические полиомиелитоподобные заболевания. В последние годы в Российской Федерации наблюдаются сезонные эпидемические подъемы заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ), в том числе серозным менингитом (СМ), регистрируются эпидемические очаги с групповыми случаями заболеваний, что может быть связано, в том числе, с завозом новых вариантов энтеровируса с территорий сопредельных государств. Все вышесказанное свидетельствует о необходимости постоянного наблюдения за энтеровирусами и определения филогенетических взаимосвязей их эпидемических вариантов с мировыми штаммами.

В 2008 г. приказом Роспотребнадзора от 17.03.2008 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» на базе Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной создан Референс-центр по мониторингу энтеровирусных инфекций (РфЦ-ЭВИ). Одной из задач центра является оказание практической помощи органам и учреждениям Роспотребнадзора в ускоренной идентификации нетипируемых энтеровирусов, а также в установлении этиологии вспышек и эпидемических подъемов заболеваемости ЭВИ с использованием современных молекулярно-генетических методов исследования.

За период 2008–2013 гг. с использованием молекулярного «серотипирования» на основе секвенирования фрагмента области VP1 генома [1, 2] оказана научно-практическая помощь учреждениям Роспотребнадзора 53-х субъектов 8-ми федеральных округов Российской Федерации (ФО РФ). Было исследовано 3 490 образцов, включающих биоматериал (ликвор, фекалии, мазки из ротоглотки, содержимое везикул, секционный материал) от больных с различными клиническими проявлениями ЭВИ и пробы из объектов окружающей среды (ООС). Тип энтеровируса установлен в 1 284 случаях. Нуклеотидные последовательности фрагментов гена капсидного белка VP1 и 5'НТР генома 256-ти энтеровирусов 33-х типов (ЭВ-А: CA2, 4–6, 10, 16, ЭВ71, ЭВ76; ЭВ-В: CA9, CB2-5, ECHO2-4, 6, 7, 9, 13, 16, 18, 19, 25, 30, 33; ЭВ-С: CA1, 13, 19, 20, 22, 24, ЭВ116) и 73 последовательности 73-х клинических изолятов парэховирусов человека 4-х типов (ПЭВ1, 3, 4, 6), собранных на разных территориях России, были депонированы в GenBank, что существенно обогатило международную базу информацией о российских вариантах энтеровирусов разных типов.

Наибольшее число исследований (2 225) было проведено в 2013 г. Сезон ЭВИ-2013 начался рано, проявившись в начале июня месяца массовыми вспышками СМ, ассоциированного с экзантемой полости рта и конечностей (HFMD/CM) в Ростовской области и СМ в Липецкой области. В клинических материалах заболевших были идентифицированы ЭВ71 и ECHO30, соответственно. Идентификация ЭВ71, способного вызывать тяжелое течение заболевания с летальным исходом, определила необходимость проведения исследований по оценке широты распространенности этого варианта вируса на территории России. В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 24.07.2013 № 484 на исследование поступили материалы из Центров гигиены и эпидемиологии 52-х субъектов 8-ми ФО РФ.

При исследовании 2 225 образцов биоматериала от больных с различными клиническими проявлениями ЭВИ, подозрением на ЭВИ и ООС тип энтеровируса методом секвенирования установлен в 888 пробах (в 856 пробах клинического материала и 32 пробах ООС).

Спектр неполиомиелитных энтеровирусов, идентифицированных у 842-х больных с подтвержденным диагнозом ЭВИ, включал 30 типов, в том числе 8 типов вида ЭВА: Коксаки А2, 4, 5–6, 10, 16, ЭВ71, ЭВ76; 19 типов вида ЭВВ: Коксаки А9, Коксаки В1-5, ECHO2-7, 9, 11, 14, 18, 25, 30; 3 типа

вида ЭВС: Коксаки А22, ЭВ99, ЭВ113. (Табл.). В ООС идентифицированы неполиомиелитные вирусы 10-ти типов: Коксаки А16, ЭВ71, Коксаки В2, 3, 5, ECHO6, 7, 11, 19, 30.

Таблица

Спектр типов энтеровирусов, идентифицированных у пациентов с различными клиническими проявлениями энтеровирусной инфекции в 2013 г.

Тип вируса	Количество идентифицированных энтеровирусов на территориях Федеральных округов РФ (абс.)								всего
	ЦФО	ЮФО	С-ЗФО	ДФО	СФО	УФО	ПФО	С-КФО	
CA2	1	–	–	–	–	–	1	–	2
CA4	7	5	1	1	–	1	10	2	27
CA5	15	-	3	–	–	1	7	–	26
CA6	15	1	3	–	–	8	5	–	32
CA10	–	–	1	1	–	–	21	17	40
CA16	6	4	5	1	–	–	4	–	20
ЭВ71	11	44	3	–	–	4	16	2	80
ЭВ76	–	–	–	–	–	–	1	–	1
НТЭВА	2	–	–	–	–	–	1	-	3
CA9	4	–	1	–	–	–	5	–	10
CB1	–	–	–	–	–	–	1	–	1
CB2	6	–	6	3	4	2	5	–	26
CB3	6	–	2	–	–	–	3	–	11
CB4	6	–	5	–	–	–	–	–	11
CB5	20	8	–	–	–	2	1	–	31
E2	–	–	–	–	–	–	1	–	1
E3	1	–	–	1	–	1	1	–	4
E4	3	–	–	–	–	–	1	–	4
E5	–	–	–	–	–	–	1	–	1
E6	17	5	2	–	–	–	5	–	29
E7	1	–	–	–	–	–	-	–	1
E9	4	17	–	–	–	2	7	–	30
E11	12	–	3	–	–	1	6	–	22
E14	–	–	2	–	–	1	1	–	4
E16	4	–	–	–	–	1	2	–	7
E18	2	2	–	–	–	–	1	1	6
E25	–	–	–	–	–	–	2	–	2
E30	125	11	33	–	5	21	168	–	363
НТЭВВ	–	9	8	–	3	–	19	–	39
CA22	1	–	–	–	–	–	1	–	2
ЭВ99	–	–	–	–	–	–	5	–	5
ЭВ113	–	–	–	–	–	–	1	–	1
Всего	**268**	**106**	**78**	**7**	**12**	**45**	**302**	**22**	**842**

Среди идентифицированных неполиомиелитных энтеровирусов доминировал вирус ECHO30 (43,5%), на втором месте по значимости (9,5%) находился ЭВ71; доля вирусов Коксаки А4, 5, 6, 10, Коксаки В2, 5, ECHO6, 9, 11 составила 2,51–4,8% каждого, остальные вирусы обнаружены в единичных случаях.

Вирус ECHO30 был выявлен при спорадической и вспышечной заболеваемости на территории 31-го субъекта Центрального, Южного, Северо-Западного, Приволжского, Сибирского и Уральского федеральных округов РФ. В типовой структуре энтеровирусов, идентифицированных у больных СМ, доля вируса ECHO30 составила 70,2%. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента области VP1 генома 363-х штаммов вируса ECHO30, идентифицированных в 2013 г., с последовательностями вируса ECHO30, представленными в GenBank, показал, что подавляющее их большинство (97,8% – 355 штаммов из 30 субъектов РФ) имели высокий уровень гомологии (95,0–99,7%) с современными «китайскими» штаммами, относящимися к генотипу H по классификации J. Bailly et al. [3].

ЭВ71 явился вторым значимым этиологическим агентом ЭВИ в 2013 г. Этот вирус манифестировал на территории РФ массовой вспышкой HFMD/СМ в Ростове на Дону. ЭВ типа 71 обнаружен в 82-х образцах, собранных на территории 15-ти субъектов РФ: Республиках Башкортостан, Калмыкия, Коми; Краснодарском и Ставропольском краях; Еврейской Автономной Области; Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курганской, Курской, Нижегородской, Пензенской, Ростовской, Саратовской областях. ЭВ71 выявлялся у больных с диагнозами СМ, экзантема, герпангина, ЭВИ-малая болезнь, ОРВИ, ОРВИ с нейротоксикозом, миалгия, острый гастроэнтерит.

Установлен генотип 82-х штаммов ЭВ71. Молекулярно-генетические исследования показали его генетическую неоднородность. На территории 3-х субъектов РФ идентифицирован ЭВ71 «европейского» генотипа C2b, генетические родственники которого циркулировали на территории РФ в предыдущие годы. На территории 15-ти субъектов РФ выявлен ЭВ71 генотипа C4a, на долю которого пришлось 91,5% всех штаммов ЭВ71. Популяция «российских» ЭВ71C4a-2013 была неоднородна, представлена, как минимум, 7-ю геновариантами, которые проявили генетическое родство (93-99% гомологии нуклеотидной последовательности) с «китайскими» штаммами ЭВ71-C4a/ KHP/2010-2012гг., что свидетельствует о множественных, вероятно случившихся в разные годы, заносах ЭВ71-C4a на территорию России.

Суммируя вышесказанное можно заключить, что подъем заболеваемости ЭВИ в сезон 2013 г. был обусловлен энтеровирусами как минимум 30-ти серотипов, среди которых доминирующее положение занял вирус ECHO30-H-2013, явившийся основным этиологическим агентом серозного менингита. На втором месте по значимости находился ЭВ71-C4a-2013, вызвавший вспышку и спорадические случаи экзантемы с проявлениями СМ. Оба вируса проявили высокий уровень гомологии нуклеотидной последовательности области VP1 генома с соответствующими «китайскими» штаммами, выделенными в 2010–12 гг.

Литература:

1. Nix 1. W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 2006. Vol. 44. P. 2698–2704.

2. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et.al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. and Evol. 2011. Vol. 28. P. 2731–2739.

3. Bailly J.L., Mirand A., Henquell C. et.al. Phylogeography of circulating populatios of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. Infect. Genet. Evol. 2009, Vol.9. P. 699–708.

ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ВОДНЫХ БИОЦЕНОЗОВ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ

Татарников С.А., Мазепа А.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Иркутск

adm@chumin.irkutsk.ru

Туляремия – зоонозная природноочаговая инфекция, ареал которой охватывает в основном зону умеренного климатического пояса Северного полушария. Наличие на территории Российской Федерации активных природных очагов туляремии, приуроченных к водным биоценозам, обуславливает необходимость постоянного комплексного мониторинга их с применением современных технологий и подходов, в том числе и молекулярно-генетических, направленных на ускоренное обнаружение возбудителя. В соответствии с нормативно-методическими документами, заключение о наличии на данной территории в настоящее время туляремийной эпизоотии, должно быть подтверждено результатами лабораторных исследований, подтверждающих наличие возбудителя (антигена или ДНК *Francisella tularensis*) в различных объектах [1]. Применение полимеразой цепной реакции (ПЦР) как высокочувствительного метода генодиагностики, позволяет по обнаружению специфической ДНК в короткий срок судить о наличии патогена в исследуемом материале и выявлять «некультивируемые» формы микроорганизмов в межэпизоотический период [2]. Для специфической индикации ДНК туляремийного микроба методом ПЦР, используют генодиагностические препараты, амплифицирующие видоспецифичные участки генома *F. tularensis*, за исключением генов 16S рРНК и lpn, гомологичных с генами эндосимбионтов клещей [3]. Эффективность обследования водных биоценозов на туляремию экспресс методами затруднена вследствие низких концентраций возбудителя. Чувствительность ПЦР тест-системы «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ»

(ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов) составляет 1×10^3 м.к. в пробах [4], что определяет необходимость разработки и внедрения в практику эпизоотологического мониторинга очагов туляремии высокочувствительных методов индикации *F. tularensis*. Двухэтапная (англ. – «nested») ПЦР – одна из наиболее эффективных модификаций ПЦР, характеризующаяся наибольшей чувствительностью.

Целью нашей работы была разработка и оценка диагностической ценности двухэтапной ПЦР для индикации низких концентраций *F. tularensis* в водных биоценозах.

Для генодиагностики возбудителя туляремии методом двухэтапной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, в качестве мишени был выбран ген «домашнего хозяйства» (англ. housekeeping gene) putA. На нуклеотидную последовательность данного гена сконструированы амплификационные праймеры, специфичность которых была проверена на базе данных GenBank с помощью приложения BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) и на коллекционных штаммах *F. tularensis* четырех подвидов (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* и *novicida*), а также гетерологичных микроорганизмах. Оптимизированы состав реакционной смеси и программа амплификации. Чувствительность nested-варианта ПЦР определялась при исследовании микробных взвесей чистых культур и серийных разведений геномной ДНК *F. tularensis*, а также проб объектов внешней среды (воды и ила), искусственно инфицированных возбудителем туляремии. Полученные результаты подтвердили высокую чувствительность и 100% специфичность сконструированной тест-системы, позволяя выявлять низкие концентрации ДНК эквивалентные единичным клеткам *F. tularensis* (рис. 1).

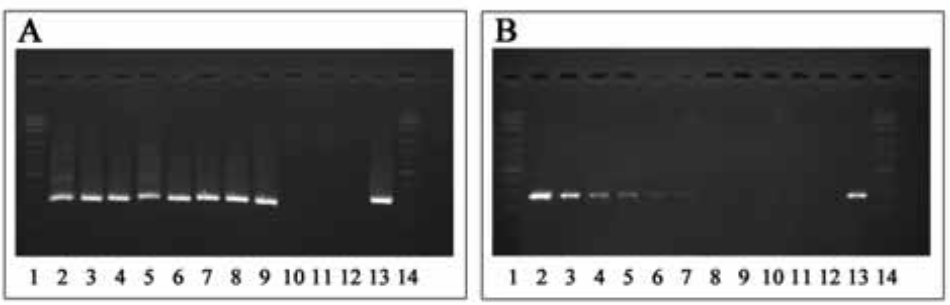


Рисунок 1. Электрофореграммы результатов ПЦР при определении чувствительности двухэтапной ПЦР со сконструированными праймерами (**A**) в сравнении с тест-системой «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» (**B**). 1, 14 – маркер молекулярного веса (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder); 2-10 – пробы воды с илом, искусственно контаминированые культурой *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250 в 10^7 м.к./мл (трек 2), 10^6 м.к./мл (3), 10^5 м.к./мл (4), 10^4 м.к./мл (5), 10^3 м.к./мл (6), 10^2 м.к./мл (7), 10 м.к./мл (8), 1 м.к./мл (9), 0,1 м.к./мл (10); 11 – отрицательный контроль выделения ДНК; 12 – отрицательный контроль амплификации; 13 – положительный контроль.

Таким образом, вследствие более высокой чувствительности двухэтапной ПЦР по сравнению с классической ПЦР, ее целесообразно применять для генодиагностики и первичного скрининга объектов окружающей среды в

случаях, когда в исследуемом материале предполагается низкое содержание микроорганизмов. Отмечена эффективность применения двухэтапной ПЦР с праймерами к гену putA *F. tularensis* при эпидемиологическом мониторинге водных биоценозов в природных очагах туляремии, основными объектами исследования которых являются вода, иловые отложения и гидробионты. Положительный результат молекулярно-биологического исследования может свидетельствовать о наличии в исследуемом материале возбудителя, что служит важным ориентиром в лабораторном исследовании, заключающемся в дальнейшем использовании биологического и бактериологического методов и последующего получения и идентификации культуры.

Литература:

1. Эпидемиологический надзор за туляремией. МУ 3.1.2007-05. М.; 2005. 24 с.

2. Совершенствование подходов эпизоотологического обследования водных биоценозов в природных очагах туляремии. – Иркутск, 2013 г. –17 с.

3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Онищенко Г.Г. , академика РАМН Кутырева В.В.. – Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.

4. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* метод полимеразной цепной реакцией с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis*-РЭФ) // ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора – Рег. уд. № ФСР 2011/12108 – 131011. – ТУ 9398-036-01898109-2011.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Спицын А.Н., Уткин Д.В., Германчук В.Г., Осина Н.А.

ФКУЗ « Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Защита населения страны и окружающей среды от угрозы распространения возбудителей особо опасных инфекционных болезней, в результате применения биологических средств поражения или при чрезвычайных ситуациях природного или техногенного характера, зависит от своевременного обнаружения факта биологического заражения и проведения противоэпидемических мероприятий. Определяющим фактором быстрого реагирования на биологические угрозы является обнаружение возбудителей особо опасных инфекционных болезней в максимально сжатые сроки (от нескольких минут до 1 ч). Выявление микроорганизмов представляет собой комплекс мероприя-

тий, направленных на обнаружение в объектах окружающей среды (воздух, вода, почва, поверхности сооружений и предметов) возбудителей, опасных для людей и животных без определения видовой принадлежности или с определением вида. Методы обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных болезней, направленные на выявление антигенных или генетических маркеров возбудителей, занимают от 1 ч до 3–5 ч. В связи с этим, разработка средств, обладающих экспрессностью для определения этих возбудителей, является на сегодняшний день актуальной задачей.

Для решения указанной задачи нами разработан новый инструментальный и методический подход к обнаружению возбудителей особо опасных инфекционных болезней (чумы, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза) на основе спектрометрического анализа.

Спектрометрические измерения проводили с использованием устройства для выявления микроорганизмов в жидкой фазе (патент РФ № 102259). Устройство состоит из источника излучения белого света, спектрометра, кюветодержателя для исследуемых образцов, персонального компьютера с программой управления, регистрации спектров и анализа результатов. Спектрометр позволяет проводить измерения спектральных характеристик излучения в диапазоне длин волн от 200 до 1 100 нм. При расположении на пути следования излучения исследуемого материала, содержащего биологические частицы и вещества (клетки микроорганизмов, белки), происходило изменение спектральных характеристик света. Данное свойство было использовано при разработке методического подхода для обнаружения возбудителей инфекционных болезней.

Оптическая плотность взвеси микроорганизмов, измеренная с помощью спектрометра, является суммой оптической плотности, обусловленной спектром поглощения света биомакромолекул клетки (в диапазоне длин волн 200–400 нм) и оптической плотности, обусловленной светорассеянием клеток (в диапазоне длин волн 500–660 нм). Первый показатель указывает на наличие в пробе частиц биологического происхождения, второй – на их количество. В результате проведенных исследований было установлено, что при наличии в пробе клеток микроорганизмов или растворимых белковых антигенов спектр поглощения имел пик в ближней ультрафиолетовой (УФ) области, связанный с наличием у микроорганизмов ряда биологических веществ (ароматических аминокислот, нуклеиновых кислот, липидов, НАД), имеющих пик поглощения в этой области спектра.

Для выполнения задачи по определению концентрации клеток по значениям оптической плотности при 600 нм были построены калибровочные кривые для разных видов микроорганизмов с концентрациями клеток от 1×10^5 м.к./мл до 1×10^9 м.к./мл.

Нами была разработана программа по учету и анализу результатов. Программа позволяла анализировать спектры поглощения растворимых веществ, дисперсных частиц, клеток микроорганизмов, сравнивать их с хранящимися в базе спектрами возбудителей особо опасных инфекционных болезней (чумы, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы). Программа дает

ответ о наличии в исследуемой пробе биологических частиц по положению максимума спектра поглощения в УФ области, определяет их концентрацию в пределах чувствительности метода (1×10^5 м.к./мл) по светорассеянию при длине волны 600 нм, определяет размеры биологических частиц по углу наклона кривой светорассеивания.

Обнаружение возбудителей особо опасных инфекционных болезней включает в себя комплекс специальных мероприятий выявления и определения вида возбудителя в исследуемых пробах. В результате проведенных исследований установлено, что при специфическом взаимодействии микроорганизмов в течение 30 мин при температуре 37°С с гомологичными антителами происходит изменение оптической плотности раствора, связанное с образованием комплексов «антиген-антитело». При инкубации исследуемого материала с гетерологичными антителами в течение 1 ч изменения спектральных характеристик не наблюдалось. Выявление изменений в спектрах поглощения клеток до инкубации со специфическими антителами и после, было включено в алгоритм работы программы по учету и анализу результатов.

Таким образом, разработан новый инструментальный и методический подход к обнаружению возбудителей особо опасных инфекционных болезней на основе спектрометрического анализа. Регистрация и анализ спектральных характеристик исследуемого материала позволяет выявлять биологические частицы, определять концентрацию клеток микроорганизмов в течение 3–5 мин, определять виды возбудителей особо опасных инфекционных болезней при использовании специфических антител в течение 30 мин. Преимущество метода перед традиционными иммунологическими методами индикации – отсутствие конъюгатов, меченных ферментными, флуоресцентными, радиоизотопными метками. Указанный методический подход может быть использован при проведении сигнального экспресс-обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных болезней в пробах из объектов окружающей среды для последующего их определения иммунологическими и молекулярно-генетическими методами.

Работа выполнена по Государственному контракту № 72-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИРОДНО - ОЧАГОВЫХ И ЗООНОЗНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ МЕДИЦИНЫ

Нафеев А.А.[1, 2] , Салина Г.В. [1], Мерцалова С.Л [2].

[1.] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области»

[2.] ФГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», медицинский факультет

nafeev@mail.ru

Эпидемиологическая диагностика – это система методов распознавания конкретных проявлений (спорадическая заболеваемость, эпидемическая вспышка, эпидемия, пандемия) эпидемического процесса, с установлением причинно-следственных связей его развития. В настоящее время задача эпидемиолога в расшифровке истинных причин эпидемического неблагополучия [3] значительно осложнилась и тому есть как объективные, так и необъективные причины. Рассмотрим некоторые из них. Значительная часть инфекционных заболеваний обусловлена вяло протекающими эпидемическими процессами. Конкретная причина их происхождения часто остаётся невыясненной. В этом случае подавляющее большинство очагов заболеваний остаётся нерасшифрованным. Ярким примером здесь являются зоонозные инфекции, так как источник для человека связан с животными, а их обследование законодательно закреплено за другой службой. Немаловажным в настоящее время является возможность проведения комплекса специальных, направленных на обнаружение либо самого возбудителя либо антител к нему, лабораторных исследований. Возьмём группу клещевых инфекций. Зачастую в остром периоде очень трудно выставить какой-то один диагноз (клещевой вирусный энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, с 2013 года добавились гранулоцитарный анаплазмоз человека и моноцитарный эрлихиоз человека), поэтому лабораторные исследования следует проводить в отношении как минимум первых 2-х. При этом если медицинское учреждение не имеет финансовых ресурсов, то оплата ложится тяжким бременем на больного. В Ульяновской области есть ещё одна особенность, связанная с эпидпроцессом – клещевой вирусный энцефалит регистрируется редко (от 1 до 3 случаев заболеваний в год), поэтому окончательный диагноз, как правило, выставляется в поздние сроки после неоднократно проведённых лабораторных тестов. Необходимость широкого обследования на клещевые инфекции обоснована обнаружением у населения антител к вышеперечисленным инфекциям в результате ежегодно проводимого серологического скрининга. Диагностика инфекционных болезней имеет существенные целевые и методологические различия с диагностикой терапевтических болезней. С позиции инфекционных болезней, это диагноз эпидемиологической ситуации развившегося эпидемического процесса. А с позиции соматических заболеваний это диагноз конкретному боль-

ному. Уровень возможностей у разного типа и уровней медицинских учреждений абсолютно разный. Наиболее сложное решение данного вопроса в районных медицинских учреждениях. Необходимо отметить, что в большинстве центральных районных больниц (ЦРБ), как правило, по штату один врач инфекционист. При постановке диагноза инфекционного заболевания используется три классических методологических подхода: клинический метод (оценка наблюдаемых синдромов и симптомов), лабораторный метод (на уровне ЦРБ крайне ограничено его практическое применение) и эпидемиологический метод, который нацелен на тщательный сбор эпиданамнеза, с целью установления предполагаемых факторов. По большому счёту у врача инфекциониста ЦРБ наиболее сильными и реальными в его работе являются клинический (который зависит от уровня познаний в области инфектологии, практического опыта и интуиции, которая играет определённую роль в диагностическом процессе, но лишь начального, подготовительного этапа и ни в коем случае не его завершения) и эпидемиологический (раскрывающий причины происхождения инфекционного заболевания у конкретного больного) методы. Не трудно представить, что в период его отсутствия на рабочем месте (длительного, кратковременного), его обязанности возлагаются на врачей терапевтов (у детей педиатров), как дополнительная нагрузка. Терапевты даже в своей непосредственной работе стали чаще ограничиваться синдромными (поэтапными) диагнозами и не всегда пытаются определить нозологическую природу болезни, приведшей к наблюдаемому синдрому [2]. Такой подход не приемлем при постановке диагноза инфекционного заболевания, учитывая его эпидемиологическую опасность.

На территории Ульяновской области при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) первоначальные диагнозы, выставляемые на поликлиническом этапе оказания медицинской помощи, зависят от знания медицинскими работниками эндемичности того или иного административного района откуда поступил больной и современной клиники. Если больные с диагнозом ГЛПС поступают в это медицинское учреждение довольно часто то и диагноз ГЛПС на ранних сроках выставляется быстрее. Но сегодня изменившаяся клиника ГЛПС нередко ставит в тупик специалистов даже с большим практическим опытом. Получив первые отрицательные результаты лабораторных исследований диагноз снимается. В последнее время в практике участились случаи, когда при обращении за медицинской помощью выставляется диагноз ГЛПС, а после проведения дифференциальных специфических лабораторных тестов выставляется диагноз лептоспироз, и, наоборот, вместо первоначального диагноза лептоспироз в сыворотке крови при серологическом обследовании в динамике обнаруживается нарастание титра антител к хантавирусам ГЛПС при отсутствии таковых к лептоспирам, что однозначно указывает на ГЛПС. А иногда имеет место и микст инфекция – ГЛПС в сочетании с лептоспирозом.

С практической точки зрения наиболее важными для постановки диагноза инфекционного заболевания являются следующие положения: установление органа(ов) или систем, вовлеченных в процесс и точное определение этиологи-

ческого агента. Когда речь заходит о специфическом поражении того или иного органа необходимо знать, какие наиболее важные патогенные агенты вызывают поражение именно данного органа. При осмотре больного врач, учитывая наблюдаемую клиническую картину, немедленно назначает лечение. При инфекционных заболеваниях в основе лежит химиотерапия, основанная преимущественно на антибиотиках, а в последние годы и противовирусных препаратов. Необходимо в полной мере отдавать себе отчет, что это может привести к временному или окончательному исчезновению симптомов болезни без достижения истинного излечения инфекционного больного и существенно затруднить выделение этиологического агента, отсрочить объективное распознавание природы заболевания и назначение исходя из этого адекватного лечения. Более того, антибиотики могут способствовать селекции устойчивых вариантов возбудителя или облегчить передачу R-факторов между патогенными и сапрофитными энтеробактериями. Устойчивые варианты могут затем заместить чувствительные штаммы и создать дополнительную опасность распространения их. Большинство распространенных гриппоподобных заболеваний излечиваются спонтанно, важную роль при этом играет симптоматическая терапия. Однако из-за тенденции этих болезней к спонтанному излечению, а также из-за того, что результаты серологических тестов в силу длительного периода времени, необходимого для их проведения, зачастую не могут быть получены до того момента, когда уже произошло выздоровление (а нередко больной уже выписан или умер), попытки определить специфическую этиологию заболевания часто считаются не имеющими практического значения «академическими» процедурами. В тоже время, с появлением новой разновидности гриппа А (H1N1) – pdm 09, результат лабораторного обследования имеет важное значение для процесса лечения и прогноза жизни и смерти больного. При этом необходимо иметь в виду, что уточнение этиологии инфекционного заболевания каждого отдельно взятого больного может иметь важное значение для здоровья общества.

В медицине (и практика всё больше даёт этому подтверждение), в отличие от других профессий, нельзя слепо работать только по инструкции. Сегодня в практике врача инфекциониста, наряду с обыденными диагнозами воздушно-капельных (грипп, ОРЗ, менингококковой инфекции) и кишечных инфекций (энтероколит, сальмонеллёз, брюшной тиф) наблюдаются случаи новых и возвращающихся инфекций (орнитоз, легионеллёз, лихорадка Западного Нила, ротовирусная, норовирусная инфекции и т.д.). Всё чаще стали регистрироваться случаи с атипичной клиникой, абортивным и инаппарантным течением. Здесь-то и проявляются профессиональные качества врача, его способности не только использовать всё имеющиеся возможности медицины субъекта (при редких инфекционных заболеваниях Российской Федерации) применительно к конкретному больному, а так же обладание интуицией. Интуиция (лат.intueri – пристально всматриваться) – непосредственное постижение истины без предварительного логического рассуждения [1]. Врачебная деятельность, как и любой познавательный процесс, в том числе включающий и интуитивное

познание, возможна только при накоплении большого числа ассоциативных связей, которые образуются путём многолетнего труда в данной области. Одной из субъективных ошибок в практике врачей терапевтического профиля, хирургов, специалистов других специальностей, является пренебрежение консультацией врача инфекциониста. В работе врача инфекциониста на современном этапе имеется ряд проблемных вопросов, наносящих вред выполнению его функциональных обязанностей, и прежде всего, расшифровке этиологии инфекционного заболевания. Экономические вопросы сегодня определяют возможность выбора направления лабораторных исследований. Практика специфических лабораторных исследований, сформировавшаяся ещё в 70-80 годы, когда бактериологические лаборатории имелись в учреждениях государственной санитарно-эпидемиологической службы, сохранялась до 2013 года (сейчас новый этап реорганизации – происходит слияние учреждений на районном уровне). Со времени введения в жизнь хозрасчётных работ, проводимые исследования стали платными. К сожалению, о нуждах врача инфекциониста и больного администрация медицинского учреждения вспоминает в последнюю очередь. Сложившаяся многолетняя практика постановки окончательного диагноза по результатам специфического лабораторного обследования разрешает только в отдельных случаях выставлять инфекционный диагноз по клинике. В итоге получается, что имеющиеся знания врача инфекциониста становятся невостребованными в данных условиях. Поэтому, если при анализе текущей заболеваемости наблюдается снижение её показателей, то необходимо, наряду с учётом объективных причин, приведших к этим результатам, учитывать и субъективные причины, что имеет важное значение при статистической обработке показателей.

Только тогда, когда врач будет обладать свободой (но не безграничной) в своих действиях при расшифровке диагноза инфекционного заболевания, можно будет получить необходимый результат, который, прежде всего, направлен на сохранение здоровья общества.

В последние годы, учитывая вышеперечисленные сложности с диагностическим процессом, новое значение и значимость приобрели эпидемиологический метод, основанный на разных формах анализов (оперативный, ретроспективный), позволяющий провести ландшафтно-экологическое районирование по природно-очаговым инфекциям и серологический мониторинг по обследованию «здорового» коренного населения на краевые природно-очаговые и зоонозные инфекционные болезни, применение которых на практике позволяет обнаруживать новые природные очаги, либо оценивается степень напряжённости активности ранее известных природных очагов. Всё это вместе позволяет ускорить клинический диагностический процесс в инфекологии.

Литература:

1. Абаев Ю.К. Интуиция врача //Клиническая медицина, 2012. № 12 – С. 70–73.

2. Гогин Е.Е. Диагноз: клинические задачи, обоснование и формулировки //Терапевтический архив, 2009. № 4. – С. 5–8.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Осина Н.А., Захарова Т.Л., Щербакова С.А.
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов
rusrapi@microbe.ru

Согласно принятой схеме лабораторной диагностики холеры заключение о токсигенности и эпидемической значимости V.cholerae основывается на результатах внутрикишечного заражения крольчат-сосунков, а также выявления ctxA и tcpA генов методом полимеразной цепной реакции. Использование биологической модели трудоемко и продолжительно по времени [1], а определение генов, кодирующих синтез холерного токсина (ХТ), не всегда указывает на наличие экспрессии самого токсина [1, 2, 3, 4]. Поэтому разработка и совершенствование методов определения токсигенности холерных вибрионов in vitro до сих пор остается актуальной. Для детекции холерного токсина предложено использование иммуноферментного анализа на основе ганглиозида GM1, культуры клеток Chinese hamster ovary и Y-1 adrenal cells [5, 7]. Однако из-за сложности постановки, высокой стоимости, наличия перекрестных реакции с термолабильным токсином E. coli данные приемы не получили широкого применения.

В наибольшей степени требованиям экспрессности, относительно невысокой стоимости, простоты технического исполнения и учета результатов отвечают иммунологические методы диагностики. При этом предпочтение отдается конструированию иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител (МКА), характеризующихся высокой чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью [6].

В нашей стране данных о применении иммунологических методов для определения холерного токсина крайне мало [8,9,10].

Целью настоящего исследования явилось является совершенствование способа определения ХТ в иммуноферментном анализа с использованием МКА.

В работе были использованы полученные нами ранее от пяти гибридом-продуцентов МКА, специфичных в отношении ХТ: ID5, IIE5, IIIE5, IIID3, IIIC4.

На первом этапе был определен изотип полученных моноклональных антител с помощью набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» (Sigma, США) по прилагаемой инструкции изготовителя. Дополнительно у всех МКА были установлены константы аффинности (Кафф.) по методу Битти [11].

Таблица.

Характеристика моноклональных антител к холерному токсину

№	МКА	Тип тяжелой цепи	Кафф 109 М-1
1.	ID5	IgG2a	0,53±0,04
2.	IIE5	IgG1	2,0±0,10
3.	IIIE5	IgG2a	1,8±0,10
4.	IIID3	IgG1	1,4±0,10
5.	IIIC4	IgG3	0,74±0,04

Как видно из данных таблицы, все изученные МКА относились к классу IgG трех субклассов. Два клона продуцировали IgG1, 2 клона – IgG2a, 1 клон – IgG3. Значения константы аффинности варьировали от 0,53×109 до 2,0×109 М-1, что свидетельствует о высокой степени связывания полученных МКА к ХТ.

Следующим этапом исследования стал подбор пары антител к разным эпитопам молекулы токсина, позволяющей выявлять ХТ с высокой чувствительностью в ИФА. Полученные антитела тестировали как в качестве связывающих, так и в качестве детектирующих реагентов. Для этого каждое из полученных антител было конъюгировано с пероксидазой хрена перйодатным методом [12]. Активность полученных конъюгатов определяли в прямом твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) при высоких и низких концентрациях холерного токсина.

Установлено, что использование в качестве связывающих антител – МКА IIIE5, а детектирующих антител – МКА IIE5 позволяет определить ХТ в наиболее низкой концентрации. Во всех других случаях чувствительность ТИФА была значительно ниже или реакция не регистрировалась. На основании полученных результатов для дальнейших исследований выбраны МКА IIIE5 и IIE5.

Интенсивность иммуноферментной реакции зависит от концентрации иммуноглобулинов, сорбированных на дне лунок планшета и использованных в качестве конъюгата. Недостаток антител может приводить к снижению чувствительности анализа, а избыток к появлению неспецифичных реакций. Поэтому нами была определена оптимальная концентрация связывающих и детектирующих иммуноглобулинов. Для этого использовали прием «шахматного титрования» в горизонтальном и вертикальном направлениях. Показано, что оптимальная концентрация иммуноглобулинов для сорбции составила 10 мкг/мл, для конъюгата – 0,28 мкг/мл.

С целью оптимизации условий постановки ИФА проведены также испытания сорбционных свойств твердой фазы, в качестве которой использовали поверхность лунок 96-луночных планшетов и стрипов различных производителей: Costar (США), Greiner bio-one (Германия), ВНИИМедполимер (Россия). Чувствительность анализа составила 0,1 нг/мл ХТ при использовании в качестве подложки 12-рядных стрипов Costar, 1 нг/мл – при применении Greiner bio-one (Германия), и 10 нг/мл – у ВНИИМедполимер (Россия).

На основании полученных результатов для проведения иммуноферментного анализа с целью выявления ХТ нами выбраны 12-рядные стрипы Costar, пара МКА (IIIE5 и IIE5), с оптимальной концентрацией связывающих и детектирующих антител – 10,0 и 0,28 мкг/мл, соответственно. При соблюдении указанных выше условий проведения иммуноферментного анализа его чувствительность составила 0,1 нг/мл ХТ.

Литература:

1. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 87 с.

2. Подосинникова Л.С., Черепахина И.Я. Изменчивость холерных вибрионов // Пробл. особо опасных инфекций: Сб. науч. тр. – Саратов, 1998. – С. 22–31.

3. Осина Н.А., Т.Б. Каляева, Т.В. Бугоркова, И.А. Касьян, Оброткина Н.Ф. Результаты мониторинга холерных вибрионов в водных экосистемах на территории Республики Калмыкия // Здоровье населения и среда обитания. 2013. № 2 (239) С. 28–30.

4. Иванова С.М., Титов Г.В., Безсмертный В.Е., Мазрухо А.Б., Телесманич Н.Р., Кругликов В.ВД., Москвитина Э.А., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Кудрякова Т.А. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2012 году // Холера и патогенные для человека вибрионы: М-лы совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (5–6 июня 2013 г.). – 2013. – вып. 26. – С. 21–25.

5. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev. – 1995. – Vol. 8. – P. 48–86.

6. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: МИА, 2005. 736 с.

7. Detection of Cholera Toxin. // Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae Centers for Disease Control and Prevention Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae Centers for Disease Control and Prevention\ – P. 62–88.

8. Гришин Е.В., Валякина Т.И. Получение моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину E. coli для разработки биплексного анализа токсинов в объектах окружающей среды // Biotechnologia acta, V. 6, № 4, 2013 – P. 19–32.

9. Девдариани, З.Л. Экспресс-диагностика токсигенных штаммов Vibrio cholerae в дот-иммуноанализе с помощью моноклональных антител / З.Л. Девдариани, Т.В. Аленкина, В.А. Федорова // Клин. лаб. диагностика. – 1999. – № 8. – С. 24–33.

10. Баранова Е.В., Федюкина Г.Н., Соловьев П.В., Колосова Н.В., Миронова Л.В., Куликова Е.С., Урбанович Л.Я., Свешников П.Г., Ягудин Т.А., Морозкина Е.В., Храмов М.В., Бикетов С.Ф., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф. Разработка иммунохроматографических тестов для выявления штаммов серогруппы О1 и токсинобразующих штаммов холерного вибриона// Холера и патогенные для человека вибрионы: М-лы совещания специалистов Рос-

потребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (5-6 июня 2013 г.). – 2013. – вып. 26. – С. 215–218.

11. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // J.Immunol. Methods. – 1987. – 100. – P. 173–179

12. Курманова Л.В., Ермолин Г.А., Эткин А.Ф., Цветков В.С. Получение специфических иммуноферментных конъюгатов против иммуноглобулинов классов А, G, М человека. Лаб. дело. 1984; 7:402–6.

РНГА С АНТИГЕННЫМИ ГИСТОПЛАЗМОЗНЫМ И КОКЦИДИОИДОМИКОЗНЫМ ДИАГНОСТИКУМОМ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ОСОБО ОПАСНЫХ МИКОЗОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Новицкая И.В., Куделина А.М., Дубина И.А., Кулаков М.Я., Пушкарь В.Г.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград

e-mail: irvnov@mail.ru

Проблема как можно более раннего выявления микотических инфекций, вызванных микромицетами II группы патогенности, в настоящее время становится особенно актуальной. В период возросших миграционных потоков возникновение особо опасных микозов у населения, прибывающего из эндемичных регионов, становится реальной угрозой и для нашей страны. Клиническая картина этих заболеваний отличается разнообразием и полиморфизмом, средств специфической профилактики не существует, а лечение, как известно, осложнено высокой токсичностью и длительностью применения противомикотических препаратов (2).

Поэтому создание высокоэффективных средств иммунодиагностики особо опасных микозов, направленных на выявление специфических антител и позволяющих осуществлять иммунодиагностику протекающей инфекции в возможно более ранние сроки заболевания и, как следствие, способствовать раннему началу лечения, в настоящее время является приоритетным направлением прикладной микологии (3).

На сегодняшний день остается актуальным создание высокочувствительных эритроцитарных диагностикумов для РНГА, пригодных для применения в условиях чрезвычайных ситуаций.

Нами проведено конструирование диагностикума на основе бараньих эритроцитов, обработанных танином, с последующей конъюгацией их с белково-полисахаридным антигенным комплексом, общим для возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, характеризующимся стабильностью и воспроизводимостью получаемых результатов РНГА. Такая тактика позволяет с высокой степенью достоверности в ранние сроки дифференцировать ми-

котические и бактериальные инфекции и выбрать необходимую схему антимикотической терапии.

Антигенный экстрацеллюлярный комплекс получали из клеток *H. capsulatum* G185 P в мицелиальной фазе роста путем его фильтрования и осаждения из среды культивирования (бульон Смита) охлажденным до -20°С ацетоном. В качестве жидкой питательной среды культивирования микромицетов применяли синтетическую солевую среду Смита, которая не содержит в своем составе белково-пептонных компонентов, что также способствует использованию выделенного антигенного комплекса без дополнительных этапов очистки. Осадок отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 15 мин, дважды отмывали новыми порциями охлажденного ацетона и высушивали при 37°С, после чего спектофотометрически определяли концентрацию белка и подбирали оптимальную сенсибилизирующую дозу (1). Полученный таким образом сенситин не требует лиофилизации, относительно легко поддается точному дозированию, не содержит остатков дезинфицирующих средств, длительно хранится без потери серологической активности и обеспечивает высокую воспроизводимость метода, т.е. единовременно приготовленный в достаточном количестве экстрацеллюлярный антигенный комплекс в течение длительного времени может обеспечить получение стандартного диагностикума со стабильными свойствами.

Для сенсибилизации сухой антиген растворяли в 0,01 М фосфатно-буферном растворе рН 5,9. Коньюгацию проводили на водяной бане при температуре 45°С в течение 2–2,5 ч при постоянном перемешивании. При этом дозу сенситина увеличивали в 2 раза по отношению к выбранной пробной сенсибилизации (в среднем до 200 мкг/мл).

Фиксацию сенситина на поверхности эритроцитов осуществляли добавлением 1 об. % формалина с дополнительной инкубацией смеси при тех же условиях в течение 30 мин, что позволяло оптимизировать процесс сенсибилизации эритроцитов, улучшало качество препарата и, в конечном итоге, повышало чувствительность РНГА.

Полученный диагностикум разливали в ампулы в виде суспензии 10 об. % в протективной среде высушивания, содержащей 15% реополиглюкина и 7,5% сахарозы, и подвергали лиофилизации в щадящем режиме (при плавном изменении температуры полок от -70°С до 0°С в течение 14 час и далее до +25°С в течение последующих 10 час) (4). Использование такого режима лиофилизации диагностикума после его регидратации позволило полностью сохранить иммунологические характеристики всех полученных серий препарата без снижения его аналитических характеристик.

Специфическую активность диагностикума после высушивания изучали на модели гистоплазмозных и кокцидиоидомикозных козьих иммунных сывороток, полученных путем многоцикловой иммунизации экспериментальных животных обеззараженными клетками микромицетов *H. capsulatum* и *C. immitis.*

Для оценки специфичности были использованы иммунные сыворотки лабораторных животных (баранов, козлов, лошади), содержащие антитела

к возбудителям сапа, мелиоидоза, чумы, а также сыворотки людей с верифицированными диагнозами инвазивного асепргиллеза или кандидоза и интактные сыворотки человека.

При постановке РНГА в макроварианте титры антител в иммунных сыворотках к возбудителям кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза составляли от 1:320 до 1:40960, в то время как титры РНГА с гетерологичными сыворотками не превышали порога 1:80.

Таким образом, получен специфичный и стабильный при длительном хранении антигенный эритроцитарный диагностикум, позволяющий выявлять антитела к возбудителям гистоплазмоза и кокцидиоидомикоза в РНГА в диагностическом титре от 1:160 и выше.

Литература:

1. Дроздов А.И. Методы выделения антигенов из патогенных грибов (Методическое пособие). – Ленинград, 1971, 33 с.;

2. K.J. Kwon-Chung and John E. Bennett Medical Mycology [Hardcover]. – N.-Y., 1992. – 480 p.;

3. Валькова Е.Р., Липницкий А.В. Серологические показатели при экспериментальных глубоких микозах. // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 1970. – № 12.– С. 55–59;

4. Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума / Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. – Патент 2011127595/06 от 05.07.2011.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПОРАДИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Епифанова Н.В. [1], Луковникова Л.Б. [1], Хохлова Н.М. [1], Новикова Н.А. [1], Княгина О.Н. [2], Окунь И.Н. [2]

[1] ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора,

[2] Управление Роспотребнадзора по Нижегородской области

mevirfc@rambler.ru

Введение.

Норовирусы (НВ) – важная причина как вспышечной, так и спорадической заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ). В последние годы норовирусная инфекция (НВИ) выходят на второе место в структуре ОКИ у детей и на первое – у взрослых [1, 2]. Основным методом молекулярной диагностики НВИ является полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая

выявить в исследуемом материале РНК норовируса. В настоящее время существуют коммерческие тест-системы как с электрофоретической детекцией, так и с детекцией в режиме реального времени. В данной работе представлены результаты молекулярной диагностики и эпидемиологическая характеристика спорадических случаев норовирусной инфекции на территории ряда районов Нижегородской области в 2010-13 годах.

Материалы и методы.

Материалом для исследования служили образцы стула больных, госпитализированных с ОКИ в центральные районные больницы (ЦРБ) Кстова, Балахны и Выксы в 2010–13 годах. Выделение РНК, постановку обратной транскрипции, амплификацию кДНК норовирусов проводили с использованием наборов реагентов производства ЦНИИЭ (Москва): «РИБО-Сорб, «Реверта-L», «АмплиСенс Norovirus 1, 2 genotypes-EPh», согласно инструкциям по применению. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли в 1,5% агарозном геле и трис-боратной буферной системе.

Результаты и обсуждение.

За период с 2010 по 2013 годы при обследовании 1 179 пациентов, госпитализированных в трех районах Нижегородской области, норовирусы были обнаружены в 335 случаях, что составило 28,4% от числа обследованных (таблица). Это почти в три раза превышает частоту обнаружения норовирусов в наших предыдущих исследованиях в период 2003–09 годов (9,5%) [3] и согласуется с мировой тенденцией увеличения доли норовирусной инфекции в структуре ОКИ [1, 2, 4].

Таблица.

Выявление норовирусов у больных, госпитализированных с ОКИ в ЦРБ Нижегородской области в 2010–13 годах

Район	Кол-во обследованных больных, абс./кол-во выявленных норовирусов, абс. (%)				
	2010 г.	2011 г.	2012 г.	2013 г	Всего:
Кстовский	166/42 (25,3)	133/33 (24,8)	181/52 (28,7)	177/59 (33,3)	657/181 (28,3)
Балахнинский	15/7 (46,7)	7/2 (28,6)	36/14 (38,9)	198/68 (34,3)	256/91 (35,6)
Выксунский	52/15 (28,8)	62/14 (22,6)	86/20 (23,3)	66/9 (13,6)	266/58 (21,8)
Итого:	**233/64 (27,5)**	**202/49 (24,3)**	**303/86 (28,4)**	**441/136 (30,8)**	**1179/335 (28,4)**

Используемая в работе тест-система позволяет одновременно с выявлением норовирусов проводить их дифференциацию на геногруппы I и II. Выявленные норовирусы распределились на геногруппы в следующих соотношениях: GI – 8,4%, GII – 91,0%, GI+GII (двойное инфицирование) – 0,6%. Норовирусы GI обнаруживались на всех территориях на протяжение всего периода наблюдения

в единичных случаях. Абсолютное большинство норовирусов, так же как и в других исследованиях, составляли НВ GII [1-4].

Спорадическая заболеваемость НВИ в расчете на 100 тыс. населения в среднем по трем районам области выросла в 2013 году более чем в два раза, по сравнению с 2010 годом (R^2=0,725), что связано, как ростом числа заболевших НВИ (Кстово), так и с резким увеличением числа обследованных (Балахна), то есть фактически, с улучшением качества диагностики (Рис. 1а, б).

а) б)

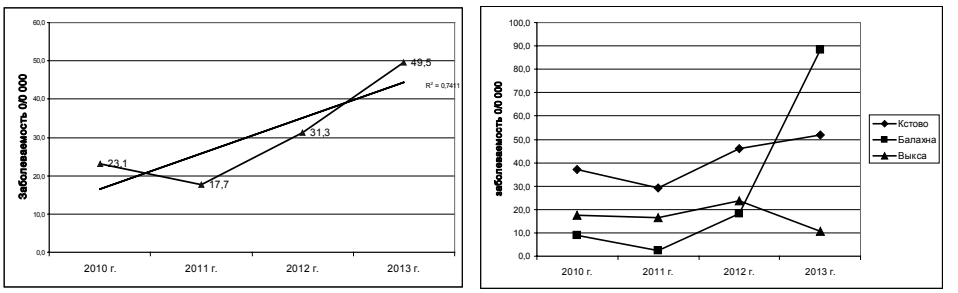


Рисунок 1. Заболеваемость НВИ по годам в среднем по трем районам Нижегородской области (а) и отдельно по каждому району (б) (на 100 тыс. населения).

Анализ среднемноголетней среднемесячной динамики заболеваемости показал, что НВИ встречается круглогодично (Рис. 2). Месяцами сезонного подъема инфекции явились в изучаемый период времени ноябрь-апрель с пиком в феврале, что подтверждает осеннее-зимне-весеннюю сезонность НВИ, наблюдаемую в странах умеренного климата [4]. Подъем заболеваемости, несколько превышающий круглогодичный уровень, наблюдался и в сентябре, что, вероятно, связано с формированием детских коллективов дошкольных учреждений и школ.

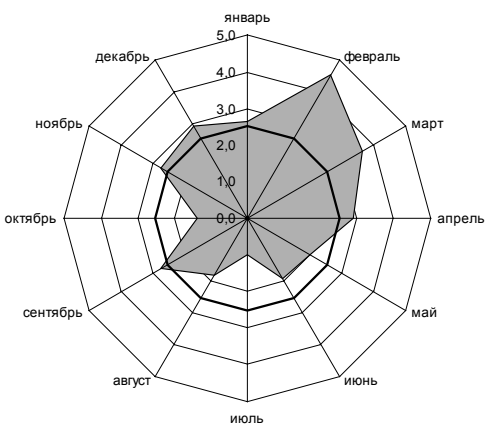


Рисунок 2. Среднемноголетняя (2010–13 гг.) помесячная динамика заболеваемости НВИ в Нижегородской области (на 100 тыс. населения).

Показатели регистрируемой заболеваемости НВИ наиболее высоки в группе детей до 1 года и 1-2-х лет (Рис. 3а). Так как большинство детей этого возраста являются неорганизованными, их инфицирование происходит,

вероятно, в результате заражения от взрослых бессимптомных носителей, либо при нахождении в стационарах по поводу других заболеваний за счет внутрибольничной инфекции. Заболеваемость населения других возрастных групп значительно ниже. Однако частота выявления норовирусов в процентах от числа обследованных госпитализированных больных каждой возрастной группы колеблется не столь существенно (Рис. 3б). Норовирусы выявляются с частотой 21,3% – 36,0% в разных возрастных группах, что подтверждает факт поражения норовирусами населения всех возрастов. Более низкие показатели регистрируемой заболеваемости в группах школьников, подростков и взрослых, скорее всего, связаны с тем, что многие заболевшие переносят НВИ в легкой форме или в среднетяжелой, но скоротечно, и не обращаются за медицинской помощью.

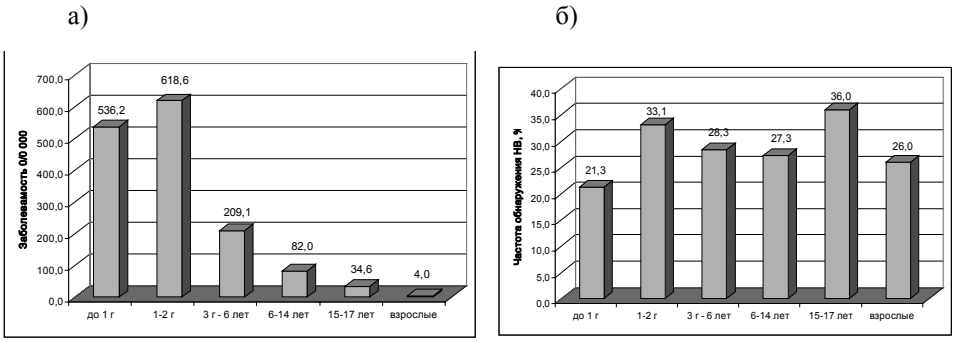


Рисунок 3. Заболеваемость НВИ на 100 тыс. населения (а) и частота выявления норовирусов в % от числа обследованных (б) в разных возрастных группах.

Таким образом, с использованием молекулярно-генетических методов исследовния показана значимость НВИ в инфекционной кишечной патологии населения ряда районов Нижегородской области. Показана циркуляция норовирусов GI (8,4%) и GII (91,0%) среди всех групп населения. Продемонстрирована тенденция к росту заболеваемости НВИ, что может быть связано как с улучшением качества диагностики, так и с временными особенностями циркуляции различных генотипов и геновариантов норовируса.

Литература:

1. Oldak E., Sulik A., Rozkiewicz D., Liwoch-Nienartowicz N., Zawadzka E. Norovirus and Rotavirus--two major causative agents of sporadic viral gastroenteritis in hospitalized Polish children. Adv. Med. Sci. 2009; 54(2):183-6.

2. Liu L.J., Liu W., Liu Y.X., Xiao H.J., Jia N., Liu G., Tong Y.G., Cao W.C. Identification of norovirus as the top enteric viruses detected in adult cases with acute gastroenteritis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010; 82 (4): 717-22.

3. Луковникова Л.Б., Новикова Н. А., Епифанова Н.В., Волкова М.А., Чупрова А.Б. Значимость калицивирусов в инфекционной кишечной патологии детей Нижегородской области. Здоровье населения и среда обитания. 2011. № 2 (215). С. 35–38

4. Koopmans M. Progress in understanding Norovirus epidemiology. Curr. Opin. Infect. Dis. 2008. 21 (5):544-52.

РАЗДЕЛ 3.
ДОСТИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ, ИММУНОЛОГИИ

ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ И ТУЛЯРЕМИИ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ И ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область

tomakud@yandex.ru, mokrievich@obolensk.org

Чума, сибирская язва и туляремия относятся к группе зоонозных природно-очаговых особо опасных инфекций. Эпидемиологическая обстановка по данным инфекциям остается достаточно сложной. Это обусловлено активностью природных очагов и ростом возможностей заноса возбудителей с эндемичных территорий на эпидемически благополучные.

Разработка тест-систем с использованием методологии мультилокусной ПЦР позволяет (за счет одновременной амплификации нескольких ДНК-мишеней) одновременно провести индикацию нескольких возбудителей, либо охарактеризовать один возбудитель по ряду признаков (вирулентность, эпидемическая значимость, таксономическое положение). Применение гибридизационно-флуоресцентной детекции продуктов амплификации в режиме «реального времени» позволяет сократить время анализа, а отсутствие необходимости постамплификационных манипуляций с продуктами ПЦР существенно сокращает трудоемкость исследований.

Целью данной работы было создание генодиагностической тест-системы для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *Y. pestis* и *B. anthracis* с различным набором плазмид, штаммы *F. tularensis* четырёх подвидов, а также штаммы гетерологичных микроорганизмов – *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* разных серотипов*, E. coli, B. cereus и других видов бацилл*, находящихся в Государственной коллекции «ГКПМ-Оболенск».

Бактериальные взвеси клеток готовили в 2 мл 0,9%-ого раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П). Соответствие количества клеток в 10-кратных разведениях подготовленных суспензий проверяли путем высева

0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведений 1·103 м.к./мл на соответствующие плотные питательные среды.

Обеззараживание проб проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Выделение ДНК осуществляли методом нуклеосорбции с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» или «ДНК-сорб-В» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Работу проводили в соответствии с инструкцией к указанному набору, начиная с этапа внесения лизирующего буфера.

Определение количества ДНК проводили спектрофотометрически, определяя поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Состав реакционной смеси (25 мкл) для ПЦР в реальном времени с подобранными праймерами и зондами: 10х буфер (Трис-HCl, KCl pH8.8) – 2,5 мкл, смесь дНТФ 0,25 мМ каждого – 2.5 мкл, 2,5 мМ MgCl2 – 3,5 мкл, Taq-полимераза 5 ед/мкл – 0.5 мкл, праймеры (0,2 пкмоль/мкл) – по 0, 5 мкл каждого (3.0 мкл); зонды (0.1 пкмоль/мкл) – по 0,3 мкл каждого (0,9 мкл); H2O – до 20 мкл, матричная ДНК – 5 мкл.

ПЦР проводили на амплификаторе «CFX96» BIO-RAD, используя программу Bio-Rad CFX Manager. Условия проведения реакции: исходный прогрев 95°С – 5 мин, циклирование 62°С – 40 с, 95°С – 15 с. Циклы повторить – 40 раз. Флюоресценцию измеряли по каналам ROX, HEX, FAM, Cy5.

Результаты и обсуждение

Для индикации туляремийного микроба была выбрана последовательность элемента вставки ISFtu5, которая присутствует у вирулентных подвидов туляремийного микроба и отсутствует у непатогенного для человека вида *F. philomiragia* и авирулентного подвида *F. tularensis* subsp. *novicida* (Champion M.D. et al., 2009).

Тест-система «FT» для идентифицирования методом ПЦР в реальном времени по гену ISFtu5 патогенных штаммов, принадлежащих подвидам *F. tularensis* subsp. *tularensis,* subsp. *holarctica* и subsp. *mediasiatica,* включает последовательности праймеров ISFtu5_up gcc-gtg-tga-act-tta-ctt-tgg-t, ISFtu5_low tcc-tcg-tgt-aca-gag-cga-atc и зонда ISFtu5_Pr_up2 (R6G)ac-ggt-cgt-tgt-gta-aaa-atc-aac-cac-atc-(RTQ2)

Для индикации сибиреязвенного микроба была выбрана последовательность гена *sspE* хромосомы, с помощью которой по анализу кривых плавления дифференцировали вид *B. anthracis* от близкородственных видов бацилл (Kim K, et al., 2005). Данный структурный ген спорообразования присутствует у всех видов рода *Bacillus*. Однако для праймеров и зонда были выбраны наиболее сильно различающиеся участки этого гена. Это позволит идентифицировать бесплазмидные изоляты *B. anthracis* и отличать штаммы возбудителя сибирской язвы от других видов группы *B. cereus*, с которыми у сибиреязвенного микроба наиболее высокий процент нуклеотидной идентичности.

Последовательности праймеров и зонда тест-системы «BA» для идентификации вида *B. anthracis* в режиме реального времени по хромосомному

sspE гену следующие: sspE_up agc-aaa-cgc-aca-atc-aga-ag, sspE_low acg-tct-gtt-tca-gtt-gca-aat-tct-gta-cc, sspE_Pr_up (FAM)ct-ggt-gct-agc-att-caa-agc-aca-aat-gct-(BHQ1).

Последовательность гена *ypo*2088, предположительно кодирующего метилтранферазу, использовали для выявления хромосомной ДНК чумного микроба, однако было показано, что в одном из исследованных штаммов – *Y. pestis antiqua* данный ген не выявлялся (Matero P, 2009, Janse I. et al., 2010). Последовательности праймеров и зонда тест-системы «YP» для выявления всех подвидов *Yersinia pestis* в режиме реального времени по хромосомному гену, кодирующему метилтрансферазу, следующие: Yp_ypo2088_upga-gta-ggg-tta-ggt-ggg, Yp_ypo2088_low ccg-tcc-aat-gca-tgt-tag-acc-a,

Yp_ypo2088_Pr_up (ROX) tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga-(RTQ2),

Yp_ypo2088_Pr_up (FAM) tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga-(RTQ1)

Праймеры и зонды были совместно разработаны и синтезированы в ЗАО «Синтол».

Специфичность каждой тест-системы «FT», «BA», «YP» и диагностического набора реагентов «MULTI-FLU», который одновременно выявляет ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии, была проверена на штаммах исследуемых видов возбудителей особо опасных инфекций и близкородственных им видах, а также на смеси ДНК из трёх видов микроорганизмов: *F. tularensis*, *B. anthracis* и *Y. pestis.*

Все штаммы *F. tularensis*, *B. anthracis* и *Y. pestis*, исследованные в работе, показали наличие специфической ДНК (по соответствующему оптическому каналу) при анализе образцов с помощью тест-систем «FT», «BA» и «YP».

При использовании мультиплексной тест-системы «MULTI-FLU» наличие специфической ДНК и, соответственно, возрастание сигнала по каналам FAM, R6G и ROX, обнаруживалось только в тех пробах, в которые была добавлена ДНК чумного, сибиреязвенного и туляремийного микроба. Другие виды иерсиний, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica,* патогенные для человека, данными тест-системами не обнаруживались. Образцы с ДНК *B. cereus, B.subtilis* и *B. thuringiensis* не показали роста интенсивности флуоресценции по каналу FAM, что означало отсутствие специфической сибиреязвенной ДНК. Также отсутствовал рост интесивности флуоресценции в образцах, содержащих ДНК авирулентного подвида *F. tularensis* subsp. *novicida.*

Тест-система дает возможность выявлять ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на основании амплификации фрагментов видоспецифических участков хромосом. В качестве маркерных локусов выбраны последовательности хромосомной ДНК, что позволяет отличать возбудителей особо опасных инфекций от близкородственных видов, а также идентифицировать штаммы с неполным набором плазмид и бесплазмидные.

На набор реагентов для выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, «MULTI-FLU» получено регистрационное удостоверение и подана заявка на патент.

Таблица

Результаты исследования смеси, содержащей штаммы *Y. pestis* KIMD, *B. anthracis* 1 и *F. tularensis* 503, с помощью разработанных «YP», «FT», «BA» и «MULTI-FLU» тест-систем.

Вид штамма	Тест-система	Ct по каналу FAM	Ct по каналу R6G	Ct по каналу ROX
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 1 нг/мкл	«MULTI-FLU»	22.3	21.3	22.0
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 0,1 пг/мкл	«MULTI-FLU»	35.0	34.8	34.0
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 1 нг/мкл	«FT»	–	17.2	–
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 0,1 пг/мкл	«FT»	–	34.2	–
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 1 нг/мкл	«YP»	–	–	22.0
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 0,1 пг/мкл	«YP»	–	–	34.0
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 1 нг/мкл	«BA»	21.7	–	–
Смесь ДНК (*Y. p.*+ *B. a.*+ *F. t.*), по 0,1 пг/мкл	«BA»	35.0	–	–

Литература:

1. Champion M.D., Zeng Q., Nix E.B., Nano F.E., Keim P. et al. Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog*. 2009, 5 (5): e1000459, doi:10.1371/journal. ppat. 1000459.

2. Kim K., Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W., Chung S.I., Leighton T. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005, 43 (2): 301–310.

3. Ingmar Janse, Raditijo A. Hamidjaja, Jasper M. Bok, Bart J. van Rotterdam. Reliable detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis* by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. *BMC Microbiology*. 2010, 10:314 doi:10.1186/1471-2180-10-314.

4. Matero P., Pasanen T., Laukkanen R., Tissari P., Tarkka E., Vaara M., Skurnik M. Realtime multiplex PCR assay for detection of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *APMIS*. 2009, 117 (1): 34–44.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПРИЕМА ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ГОЛАРКТИЧЕСКОГО ПОДВИДА FRANCISELLA TULARENSIS С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Сеничкина А.М., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательсский противочумный институт «Микроб» Роспотребназора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Туляремия – природно-очаговая, трансмиссивная инфекционная болезнь человека и животных, характеризующаяся высокой активностью природных очагов на эндемичных территориях и возможностью заноса на эпидемически благополучные благодаря хозяйственной деятельности человека [3]. Туляремия широко распространена в странах Европы и Средней Азии, Японии и Северной Америке. За последние 10 лет вспышки и единичные случаи этого заболевания были зарегистрированы в Финляндии, Болгарии, Германии, Франции, Японии, Швеции, Португалии, США [6,7].

Внутри вида Francisella tularensis выделяют четыре подвида: tularensis, holarctica, mediasiatica, novicida. Патогенность туляремийного микроба зависит от его подвида. Наибольшей вирулентностью для человека обладает подвид tularensis. Подвиды holarctica и mediasiatica характеризуются меньшей вирулентностью, тогда как вирулентность подвида novicida для человека до конца не изучена.

Для подвидов возбудителя туляремии характерны различные ареалы распространения: F.tularensis подвид tularensis – только на территории Северной Америки, F. tularensis подвид holarctica – повсеместно на территории стран северного полушария, F. tularensis подвид mediasiatica – только в районе поймы реки Чу и Или (Казахстан) и дельте реки Амударья (Узбекистан), F. tularensis подвид novicida – только на территории Северной Америки [2].

На территории Российской Федерации циркулирует и выделяется возбудитель туляремии голарктического подвида F. tularensis holarctica [4].

Для внутривидовой дифференциации штаммов F. tularensis нашли применение ПЦР с электрофоретическим учетом результатов [5], ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени [8, 9, 10], ПЦР со случайными праймерами (RAPD) [1].

Однако, предложенные авторами приемы по определению подвидов с помощью ПЦР с электрофоретическим учетом результатов и RAPD-ПЦР длительны и трудоемки, а с помощью ПЦР-РВ – направлены на определение подвида tularensis и адаптированы только к термоциклеру Light Cycler. Поэтому остается перспективным разработка простых и быстрых способов внутривидовой дифференциации туляремийного микроба с помощью молекулярно-генетических технологий.

Цель работы – разработка методического приема для определения голарктического подвида F. tularensis методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

На основании анализа полных геномов штаммов F. tularensis подвидов tularensis, mediasiatica, novicida, представленных в базе данных GenBank, а также отечественных и зарубежных публикаций в качестве перспективных ДНК-мишеней были выбраны гены FTT 1670c и ISFtu2. Локус FTT 1670c встречается только у культур туляремийного микроба подвидов tularensis, mediasiatica и novicida, тогда как фрагмент, включающий ISFtu2, имеет специфичную последовательность у штаммов F. tularensis holarctica. Нуклеотидная последовательность данных участков генома возбудителя туляремии была изучена у репрезентативной выборки штаммов туляремийного микроба разных подвидов из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»: 20 – F. tularensis holarctica, 2 – F. tularensis mediasiatica, 10 – F. tularensis tularensis, 2 – F. tularensis novicida.

Установлена высокая гомогенность выбранных локусов у соответствующих подвидов возбудителя туляремии. На основании полученных нуклеотидных последовательностей данных участков подобраны специфичные праймеры и зонды формата TaqMan. Характеристика праймеров и зондов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Свойства праймеров и зондов, подобранных на основе генов FTT 1670c и ISFtu2

Наименование мишени	Праймеры и зонды		% CG	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Флуоресцентные метки
	Обозначение	Длина, п.н.			
FTT 1670c	FTT 1670cf	20	35	112	н/и
	FTT 1670cr	20	40		н/и
	FTT 1670cp	20	40		FAM-RTQ1
ISFtu2	ISFtu2WHOf	20	35	191	н/и
	ISFtu2WHOr	20	35		н/и
	ISFtu2WHOp	20	30		R6G-RTQ1
Примечание: н/и – не используется.					

На следующем этапе была проведена оптимизация мультилокусной ПЦР с выбранными праймерами и зондами. Варьировали следующие показатели: концентрация праймеров (от 5 до 10 пМоль), зонда (от 3 до 5 пМоль), концентрация ионов Mg2+ (от 1 до 3 пМоль), ферментов: Taq-ДНК-полимеразы (СибЭнзим) и Hot-Start ДНК-полимеразы (СибЭнзим). В ходе ряда экспериментов установлено, что при содержании в реакционной смеси 6 пМоль праймеров, 3 пМоль зондов, 2 мМоль ионов Mg2+, 1 ед. фермента, чувствительность мультилокусной ПЦР составляет 1·104 м.к./мл туляремийного микроба вне зависимости от подвидовой принадлежности. Установлено, что подобранные условия проведения амплификации обеспечивают сохранение чувствительности анализа – 1·104 м.к./мл при исследовании проб биологического материала, эктопаразитов и объектов внешней среды, искусственно инфицированных возбудителем туляремии. При исполь-

зовании фермента Hot Start ДНК-полимеразы (СибЭнзим) отмечено повышение специфичности разработанной ПЦР при исследовании биологического материала и эктопаразитов. Поэтому для дальнейшей работы был выбран данный фермент.

Проведен подбор оптимальных условий амплификации: начальная денатурация – 95°С, 5 мин; 10 циклов, состоящих из денатурации 95°С – 30 с; отжига 53°С – 30 с; элонгации 72°С – 30 с; 35 циклов, включающих 95°С – 20 с, 51°С – 20 с, 72°С – 20 с, и завершение достройки комплементарной цепи 72°С – 3 мин. При проведении реакции с учетом результатов в режиме реального времени регистрацию флуоресценции осуществляли при температуре 51 °С по каналам FAM/Green, JOE/Yellow на термоциклере типа RotorGene, при использовании электрофоретической детекции – методом электрофореза в 2% агарозном геле, наблюдая образование фрагментов размером 112 или 191 п.н.

Специфичность разработанного подхода была оценена при исследовании 24 штаммов туляремийного микроба различных подвидов, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Результаты анализа представлены в таблице 2. Чувствительность анализа составила – 1·104 м.к./мл туляремийного микроба, а его продолжительность – 2 ч.

Таблица 2

Результаты исследования штаммов F. tularensis с помощью предложенного методического приема

Исследуемые штаммы	Количество штаммов	Образование специфичных фрагментов или флуоресценции			
		Ген FTT 1670c		ISFtu2	
		112 п.н.	FAM	191 п.н.	JOE
F.tularensis подвид tularensis	10	10	10	0	0
F.tularensis подвид mediasiatica	2	2	2	0	0
F.tularensis подвид holarctica	10	0	0	10	10
F.tularensis подвид tularensis novicida	2	2	2	0	0

Таким образом, нами разработан методический прием для ускоренной идентификации штаммов F. tularensis подвида holarctica методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, характеризующийся чувствительностью – 1·104 м.к./мл, специфичностью – 100%.

Литература:

1. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М. с соавт. ПЦР дифференциация подвидов Francisella tularensis с помощью одного праймера // Проблемы ООИ. – 2011. – № 1 (107). – С. 46–48.

2. Олсуфьев Н. Г. Мировое распространение туляремии, ее эпидемиология и профилактика // Природная очаговость и эпидемиология особо опасных инфекционных заболеваний – Саратов, 1960 – С. 422–436.

3. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза // Вестник Российской Академии наук. – 2003. – Т.73, № 3. – С. 195–204.

4. Спицин Н.А., Ермолова А.Д. Ландшафтно-эпидемиологическое районирование Волгоградской области по туляремийной инфекции// Вопросы гигиены и эпидемиологии. – Волгоград, 1968. – С. 317–322.

5. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A. et al. Genome-Wide DNA Microarray Analysis of Francisella tularensis Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent F. tularensis subsp. tularensis // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, N. 7. – P. 2924–2931.

6. Johansson A., Forsman M., Sjostedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of Francisella tularensis // APMIS. – 2004. – Vol. 112. – P. 898–907.

7. Kantardjiev. T., Ivanov. I., Velinov. T. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997–2005 // Emerg. Infect. Dis. 12 – 2006 – Vol. 678–680.

8. Kugeler K.J., Pappert R., Zhou Y. et al. Real-time PCR for Francisella tularensis types A and B // Emerg. Infections Dis. – 2006 – Vol. 1799–1800.

9. Molins C.R., Carlson J.K., Coombs J. et al. Identification of Francisella tularensis subsp. tularensis AI and AII infections by realtime polymerase chain reaction // J. Diagnostic Microbiol. and Infect. Dis. 64. – 2009. – Vol. 6–12.

10. Tomaso H., Scholz H.C., Neubauer H. et al. Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of Francisella tularensis subspecies tularensis // Molecular and Cell. Probes 21 – 2007. – Vol. 12–16.

ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ BRUCELLA MELITENSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН В 2012 г.

Писаренко С.В., Нечаева Ю.Н., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Ульшина Д.В.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

snipchi@mail.stv.ru

В настоящее время в связи с широким внедрением в практику новых молекулярно-генетических методов и развитием технологий высокопроизводительного секвенирования стало возможным проведение анализа полных геномов микроорганизмов, в том числе возбудителей особо опасных инфекционных болезней. Информация о первичной структуре геномной ДНК может быть использована для точной идентификации и типирования штаммов, поиска новых нуклеотидных маркеров значимых биологических свойств (резистентность к антибактериальным препаратам, вирулентность и т.д.).

В 2012 г. в Республике Дагестан от людей были изолированы 15 штаммов возбудителя бруцеллеза, которые при проведении идентификации в Референс-

центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза были отнесены к *B. melitensis* III биовар (14 штаммов), *B. melitensis* I биовар (1 штамм) [1]. Выполнено MLVA-генотипирование выделенных штаммов. Из данной коллекции нами проведено полногеномное секвенирование двух штаммов *B. melitensis* C-554 и *B. melitensis* C-555, которые относятся к III биовару и были выделены путем прямого посева крови больных в Тарумовском и Шамильском районах Республики Дагестан.

Выделение ДНК штаммов проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК бактерий ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit («Invitrogen», США), используя стандартный протокол, в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Секвенирование геномов штаммов осуществляли на генетическом анализаторе модели Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием соответствующих фрагментных библиотек (shot-gun).

Было установлено, что средняя длинна ридов *B. melitensis* C-554 и *B. melitensis* C-555 составила 173 и 147 п.о., количество ридов 5622339 и 5122471, среднее покрытие ×245 и ×199 соответственно. Сборку контигов (фрагментов геномной последовательности) и определение их взаимного расположения проводили в Newbler Assembler 2.9 (454 Life Science). Геном *B. melitensis* C-554 представлен 73 контигами общим размером 3278724 п.о. (G+C 57,2%), *B. melitensis* C-555 – 56 контигами общим размером 3280518 п.о. (G+C 57,2%).

Для подсистемной классификации и аннотации собранные контиги были представлены на сервер Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) [2]. Поиск тРНК- и рРНК-кодирующих последовательностей выполнялся с помощью tRNAscan-SE 1.21 [3] и RNAmmer1.2 [4] соответственно. Геном *B. melitensis* C-554 включает 3239 открытых рамок считывания (ORF), среди которых идентифицированы 2414 генов, кодирующих аминокислотные последовательности белков с известной функцией или их фрагменты, 51 – кодирующих тРНК и 9 – рРНК. В геноме *B. melitensis* C-555 были найдены 3249 ORF (2422 гена, 53 – тРНК, 9 – рРНК).

Геномные последовательности исследованных штаммов были депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) под номерами *B. melitensis* C-554 – JFAS00000000, *B. melitensis* C-555 – JFAT00000000, геномные последовательностей, описанные в настоящей публикации имеют номера доступа JFAS01000000 и JFAT01000000 соответственно.

На основании полученных данных, в дальнейшем, планируется проведение детального анализа последовательностей видоспецифичного гена BMEI1661, кодирующего рекомбиназу, мультигенных островов MA1 (BMEI1674-BMEI1702), MS2 (BMEII0827-BMEII0848) и комплексного транспозона BRA1072-1116/BMEII0183-227. Совокупность специфичных инсерций и/или делеций в указанных областях может служить одним из критериев для генотипирования, т.к. изменения в нуклеотидной структуре указанных локусов

часто сопровождаются появлением значимых метаболических различий у соответствующих близкородственных штаммов бруцеллезного микроба.

Таким образом, комплексное исследование геномов свежевыделенных штаммов бруцелл позволяет значительно повысить диагностическую точность при определении видовой и биоваровой принадлежности возбудителя, и является одной из важных составляющих плана работы Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза, функционирующего на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Литература:

1. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнева С.И., Тихенко Н.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в российской федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. Проблемы особо опасных инфекций – 2012. – № 1. – С. 21–24.

2. Aziz R.K. et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics. – 2008. – V9. – P. 75.

3. Lowe T.M., Eddy S.R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. –1997. – V. 25. – P. 955–964.

Lagesen K.,et al RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res. – 2007. – V. 35. – P. 3100–3108.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Рыковская О.А., Чемисова О.С., Смоликова Л.М., Подойницына О.А., Непомнящая Н.Б., Чайка С.О.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

plague@aaanet.ru

Введение.

Vibrio parahaemolyticus является галофильным условно патогенным микроорганизмом, естественным обитателем морской среды. Вызываемый парагемолитическими вибрионами острый гастроэнтерит протекает по типу пищевой токсикоинфекции (ПТИ). Основными факторами патогенности V. parahaemolyticus являются гемолизины-термостабильный прямой (TDH -thermostable direct hemolysin) и TDH-родственный (TDH-related hemolysin – TRH), а также две контакт-зависимые системы секреции третьего типа (T3SS), особенно T3SS2 [1, 2]. Популяция вида V. parahaemolyticus не однородна. Штаммы, выделенные из внешней среды являются, как правило, авирулентными, а клинические вирулентными.

В России крупные вспышки описаны в 1984–1986 годах на побережье Черного и Азовского морей. Начиная с 1996 года в мире наблюдается рост

числа заболеваний, обусловленных V. parahaemolyticus, что связывают с появлением клона, названного в зарубежной литературе «пандемичным» [3]. Характерной особенностью «пандемичных» штаммов является повышенный патогенетический и эпидемический потенциал, присутствие в геноме семи островов патогенности (VPaI-1 – VPaI-7) и принадлежность к определенным (O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:KUT, O6:K18) серогруппам [4]. Представители этих серогрупп оказались генетически родственными, что позволило говорить об их клональном происхождении [3].

Цель работы: анализ клинических штаммов парагемолитических вибрионов, выделенных в России и сопредельных странах с 1973 по 2013 год, с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы.

В работе было использовано 200 штаммов-возбудителей вспышки и спорадических случаев. В качестве контрольного образца был взят типовой штамм V. parahaemolyticus 13580 (ATCC 17802) [5].

Штаммы хранились в коллекции ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лиофилизированном состоянии. Для подтверждения видовой принадлежности культур использованы традиционные таксономические тесты [6] и ПЦР-детекция видоспецифических генов: tlh (термолабильного гемолизина), gyrB (гиразы), toxR (регулятора транскрипции белков наружной мембраны), Vpfla (жгутикового антигена) и vppC (коллагеназы). Также их видовая принадлежность была подтверждена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Учет результатов проводили по шкале показателей Score в диапазоне от 0 до 3.

Серологическую принадлежность штаммов определяли в слайд-агглютинации с помощью коммерческого набора О- и К-сывороток (Toschiba Kazaki Co.Ltd, Tokio).

Вирулентность культур оценена комплексным методом, включающим определение гемолитической активности в тесте Канагава (КР), способности к гидролизу мочевины на среде Кристенсена и ПЦР-тестирование генов основных факторов вирулентности: термостабильного прямого гемолизина (tdh), TDH-подобного гемолизина (trh) [7]. Кроме того, все культуры протестированы в ПЦР на присутствие маркерных генов семи островов патогенности (VPaI1–7). Для определения указанных генов использовали праймеры, предложенные зарубежными авторами [8, 9, 10] и сконструированные нами, которые синтезированны в НПФ «Литех» (Москва). В качестве ДНК-матриц использовали супернатанты 1 млрд. взвесей суточных агаровых культур, прогретых при 99°С в течение 30 мин. Амплификацию проводили на программируемом термостате «Терцик» («ДНК-Технология», Москва).

Результаты и обсуждение.

У всех исследуемых культур парагемолитических вибрионов подтверждена видовая принадлежность традиционными таксономическими тестами, методом MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокими показателями Score (более 2.300) и ПЦР-детекцией видоспецифичных генов.

Установлено, что вибрионы, послужившие причиной спорадических случаев, представлены большим набором серогрупп, причем возбудители эпидемических вспышек до 1997 года отнесены к серогруппам O5:K15, O4:K12, O4:K8, а начиная с 1997, – к O3:K6, которые выявлены только на Дальнем Востоке Российской Федерации.

Все исследованные клинические штаммы по содержанию основных факторов патогенности (генов tdh и trh) можно разделить на четыре группы: tdh^+ trh^- (142 штамма), tdh^- trh^+ (5 штаммов), tdh^+ trh^+ (4 штамма) и tdh^- trh^- (49 штамма). Подавляющее большинство клинических штаммов были Канагава–позитивными, не обладали уреазной активностью и имели ген tdh.

Все штаммы группы tdh^+ trh^- обладали кластером генов T3SS2α маркером VPaI-7, а штаммы, содержащие ген trh генами T3SS2β. Наиболее распространенным среди изученных клинических штаммов оказался ген ompA – маркер VPaI-2, который был выявлен практически у всех исследованных штаммов (99% tdh^+ и 88% tdh^- штаммов).

Также среди вибрионов с характеристикой tdh^+ trh^- $T3SS2\alpha^+$ выявлены две группы штаммов: вибрионы первой содержали все семь островов патогенности, а второй – не имели полного набора VPaI. К первой группе отнесены штаммы серогруппы 03:K6, выделенные на Дальнем Востоке от больных. Присутствие семи островов патогенности позволило отнести их к «пандемичному» варианту. Ни один из штаммов, выделенных на других территориях, не имел всех семи VPaI. Однако, острова патогенности присутствовали в их популяции в разных сочетаниях, образуя, таким образом, разные генотипы. Исключение из группы tdh+ штаммов составили вибрионы, дефектные по экспрессии признака, что, вероятно, связано с двумя нуклеотидными заменами у этих штаммов в промоторной области гена tdh2 [11].

Вибрионы, которые были лишены генов tdh, trh и кластеров T3SS2 были изолированы от больных, как правило, при спорадических случаях. Данные штаммы были выделены в различных регионах Украины, в Туркменистане, при спорадических случаях заболевания в Новороссийске и во Владивостоке [12]. Вероятно, их вирулентность обусловлена неизвестными в настоящее время факторами патогенности. Штаммы этой группы были Канагава-негативны, не обладали уреазной активностью и представлены множеством генотипов. Однако общим явилось отсутствие VPaI-3 и VPaI-6. Остальные маркерные гены остальных островов патогенности представлены в разных сочетаниях.

Группы tdh^- trh^+ и tdh^+ trh^+ представлены небольшим количеством вибрионов. Штаммы, в геноме которых обнаружены гены T3SS2β и trh были уреазопозитивными, Канагава-негативными, обладали маркерным геном VPaI-2. По набору других маркеров VPaI указанные штаммы разнились.

Штаммы с характеристикой tdh+trh+ были лишены гемолитической активности. Канагава-негативный феномен у этих штаммов сопровождался делецией генов T3SS2α, tdh2 и двумя нуклеотидными заменами в оставшейся копии tdh1.

Для определения возможности использования MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа для внутривидовой дифференциации парагемолитических вибрионов в программе Flexcontrol в ручном режиме проводили

обстрел с регистрацией до 70 наиболее интенсивных белковых спектров. В нашем исследовании 2 пика, соответствующие белкам с ММ 5517 и 11029 Да, были зарегистрированы только у штаммов с генетической характеристикой $tdh^{+}trh$, независимо от других характеристик (год и место выделения, серогруппа). Также особую важность представляет определение масс-пиков высоковирулентных штаммов V. parahaemolyticus серогруппы O3:K6, представляющих наибольшую угрозу для здоровья населения. Масс-пики с ММ 4785, 4800, 9570 Да были выявлены только у штаммов данной серогруппы.

Заключение.

Результаты ПЦР-тестирования парагемолитических вибрионов свидетельствуют о множестве генотипов способных вызывать заболевания у людей. Неоднородность популяции возбудителя проявилась не только в наборе островов патогенности, но и в составе самих островов патогенности. Таким образом, показано, что популяция возбудителя гетерогенна по фено- и генотипическим маркерам вирулентности. Множество обнаруженных генотипов подтверждает существующее положение о пластичности геномов V. parahaemolyticus.

MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ может служить высоковоспроизводимым методом для эффективной идентификации парагемолитических вибрионов выделенных из клинических образцов. Метод позволяет проводить внутривидовую дифференциацию по таким эпидемически важным параметрам как наличие факторов патогенности и принадлежности к высоковирулентному клону O3:K6.

Литература:

1. Nitshibuchi M., Kaper J.B. Thermostable direct hemolysin gene of Vibrio parahaemolyticus: a virulence gene acquired by a marine bacterium // Infect. Immun. 1995, 63. P. 2093–2099.

2. Park K.-S., Ono T., Rokuda M. et al. Functional characterization of two type III secretion systems of Vibrio parahatmolyticus//Infect. Immun. 2004, 72 (11). P. 6659–6665.

3. Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S. K. et al. Global dissemination of Vibrio parahaemolyticus serotype O3:K6 and its serovariants. Clin. Microbiol. Rev. 2007, 20(1). P. 39–48.

4. Hurley C.C., Quirke A-M., Reen F.J., Boyd E.F. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic Vibrio parahaemolyticus isolates // BMC Genomics. 2006, 7. P. 104–125.

5. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1: Пер. с анг. / Под ред. ДЖ. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с., ил.

6. МУК 4.2.1793 – 03. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2003.

7. Рыковская О.А., Шалу О.А., Монахова Е.В. и др. Комплексный метод оценки вирулентности парагемолитических вибрионов // Клиническая и лабораторная диагностика. 2013. № 2. с. 38–41.

8. Boyd E.F., Cohen A.L., Naughton L.M. et al. Molecular analysis of the emergence of pandemic Vibrio parahaemolyticus//BMC Genomics. 2008. V. 8. P. 110.

9. Hayashi S., Okura M., Osawa R. Soft-agar-coated filter method for earley detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH) – or TDH-related haemolysin-producing Vibrio parahaemolyticus in seafood// Appl. Environ. Microbiol. 2006. 72 (7). P. 4576-4582.

10. Okada N., Iida T., Park K.-S. et al. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive Vibrio parahaemolyticus strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level // Infect. Immun. 2009. 77 (2). P. 904–913.

11. Шалу О.А., Писанов Р.В., Монахова Е.В. Эффективность экспрессии гена tdh Vibrio parahaemolyticus зависит от двух точковых мутаций в его промоторной области // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 12. – С. 1364–1371.

12. Подойницына О.А. Генотипическая характеристика штаммов V. parahaemolyticus, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств. Автореферат. дис. канд. биол. наук. Ростов-на-Дону; 2013.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЯМОГО БЕЛКОВОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ *BRUCELLA SPP.*

Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Головнева С.И., Ковалева Н.И., Воропаев В.В.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

snipchi@mail.stv.ru

Аннотация.

Одним из перспективных современных методов идентификации и дифференциации бактерий является времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS), основанная на исследовании специфичных белковых профилей отдельных микроорганизмов [1]. Исходя из возможных угроз здоровью населения, актуальной задачей является разработка эффективного стандартизированного метода экспресс-идентификации бруцелл с использованием времяпролетной масс-спектрометрии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, белковое профилирование, возбудитель бруцеллеза.

Масс-спектрометрия является одним из наиболее интенсивно развивающихся методов анализа и установления строения индивидуальных органических соединений, синтетических, природных полимеров и их смесей.

Особенностью ионизации MALDI является относительная «мягкость» процесса перевода молекул вещества, нанесенного на мишень, в газовую фазу в виде, главным образом, однозарядных ионов. В данном способе ионизации раствор аналита наносится на поверхность металлической мишени совместно с вспомогательным низкомолекулярным соединением (матрицей) – слабой органической кислотой, содержащей ароматическое кольцо (например, производные бензойной, коричной и др. кислот). В качестве растворителя, как правило, используют легко испаряющуюся смесь ацетонитрил – вода или ацетон – вода в различных соотношениях.

Основными преимуществами MALDI-TOF масс-спектрометрии являются: высокая точность видовой идентификации (до 99%), специфичность (97,6%), экспрессность, низкая стоимость и возможность автоматизации анализа [2].

При использовании метода масс-спектрометрии бактерии идентифицируют путем сравнения полученного масс-спектра исследуемого образца с соответствующим масс-профилем из библиотеки референсных образцов. Таким образом, достоверность результатов анализа среди прочих факторов во многом определяется качеством и полнотой электронной базы данных, используемой при обработке масс-спектров. В настоящее время созданы базы данных белковых профилей большинства патогенных микроорганизмов для рутинной лабораторной идентификации с использованием соответствующего масс-спектрометра. Однако имеющаяся информация о протеомных профилях *Brucella spp.* не включена в большинство доступных баз данных, что связано, вероятно, с потенциальной возможностью применения некоторых видов рода *Brucella* в качестве биологического оружия. Это определяет необходимость разработки электронной базы данных качественных масс-спектров штаммов бруцелл для создания современной системы детекции и идентификации возбудителя с помощью масс-спектрометрии в достаточно короткие сроки и, по возможности, с использованием автоматических систем анализа.

Цель работы состояла в подборе и апробации метода идентификации и типирования *Brucella spp*. с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией и разработке проекта пополняемой электронной базы данных масс-спектрометрических белковых профилей штаммов возбудителя бруцеллеза.

На основании анализа литературных источников был выбран способ обеззараживания и подготовки проб культур возбудителя бруцеллеза, описанный ранее Lista et al. [3], в который в ходе исследования были внесены незначительные модификации. Согласно этому способу, единичную колонию 48-часовой культуры, выращенную на агаре Альбими, эмульгировали в 300 мкл воды I типа. К полученной суспензии добавляли 900 мкл спирта этилового 95% и перемешивали. Затем полученную смесь инкубировали при температуре 30°С в течение 90 мин. После проведенной инактивации образцы суспензии центрифугировали в течение 10 мин. при 12 000 об./мин., супернатант отбрасывали. Для полного удаления спирта процедуру центрифугирования повторяли. После инактивации проб вышеописанным способом дальнейшие исследования проводили, как с обеззараженным материалом. Эффективность предложенного

способа обеззараживания была подтверждена в ходе испытаний с вирулентным штаммом *Brucella melitensis* 548 бактериологическим и биологическим методами при участии членов комиссии по контролю соблюдения требований биологической безопасности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

В работе были использованы 12 штаммов бруцелл четырех основных патогенных видов (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis, B. canis*), представленные 4 известными референтными и 8 полевыми штаммами. Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, США) при следующих параметрах: частота лазера 60 Гц, интенсивность лазера 10 – 50%, 110 нс PIE, напряжение 1 источника ионов 19,4 kV, 2 – 17,3 kV, напряжение линзы 8 kV, напряжение линейного детектора 2,500 kV, диапазон масс 2000 – 20000 Да. Суммарный масс-спектр генерировали из 20 случайно выбранных позиций каждой капли мишени (всего по 4000 выстрелов лазера). Перед каждой серией анализов проводили внутреннюю калибровку с использованием бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, США). Сбор исходных данных с формированием масс-спектров проводили в программах Bruker Daltonics flexControl v 3.3, предварительный анализ спектров – flexAnalysis v 3.3. Визуализацию и анализ полученных масс-спектров проводили в программе mMass v 5.5.0 (Strohalm M.).

Нами были получены 253 масс-спектра для 12 исследуемых штаммов бруцелл. Из полученной коллекции были отобраны репрезентативные масс-спектры для каждого штамма с целью дальнейшего включения в проект электронной базы данных в среде программы MALDI Biotyper v 3.0 (Bruker Daltonics, США).

Анализ спектров в базе данных Biotyper DB v 3.1.2 показал низкие значения показателя score (менее 1,397) для всех штаммов возбудителя бруцеллеза относительно других микроорганизмов (4613 референсных масс-спектров), что позволяет сделать вывод об уникальности исследуемых белковых профилей. С другой стороны, сравнение коллекции масс-спектров штаммов бруцелл между собой подтвердило высокую степень родства изучаемых бактерий (score в интервале 1,946 – 2,845).

При построении MSP-дендрограммы (рис. 1), основанной на масс-спектрометрических профилях, 11 штаммов всех четырех видов бруцелл формировали отдельные кластеры. Исключением стал референтный штамм *B. melitensis* 16-M, белковый профиль которого имел высокую степень сходства с соответствующими профилями штаммов бруцелл вида *suis*. Указанный штамм также не отвечал результатам фенотипической идентификации, что может быть связано с исходным несоответствием наименования штамма и возможным загрязнением при пересевах и хранении.

Сравнительный анализ совокупности пиков на полученных масс-спектрах позволяет предположить существование набора родоспецифичных фрагментов в интервале масс 2000 – 20000 Да. На всех изученных спектрах установлено наличие 20 идентичных сигналов, отличающихся по интенсивности (m/z (±3 Da): 2422, 2500, 2581, 3263, 3336, 3523, 3696, 3754, 5036, 5170, 5360, 6534,

6672, 7048, 7392, 8034, 8813, 9789, 12436, 16068). Вероятно, по наличию этой совокупности специфичных фрагментов можно определить принадлежность исследуемого микроорганизма к роду *Brucella*.

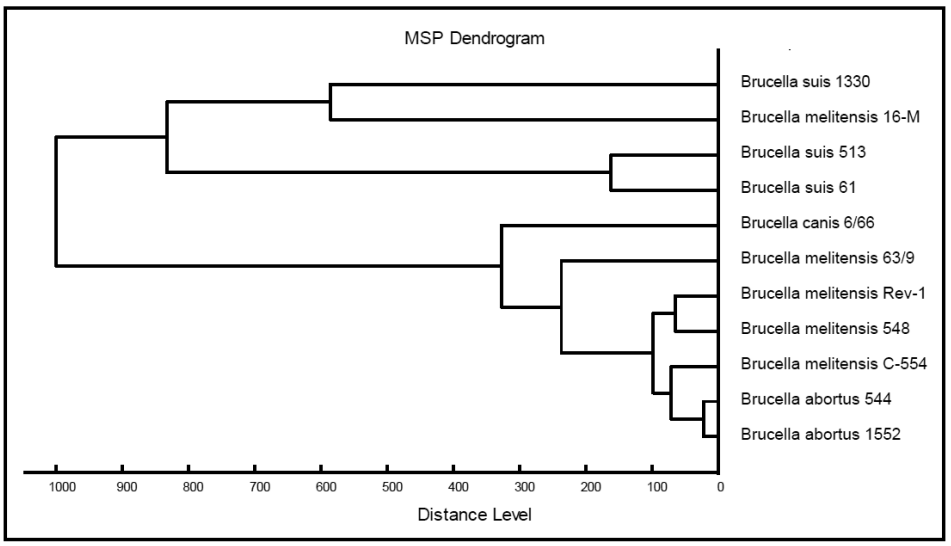


Рисунок 1. MSP-дендрограмма, построенная на основании анализа масс-спектров образцов 11 штаммов бруцелл в диапазоне масс 2 – 20 кДа.

Нами планируется проверить это предположение при изучении достаточного количества проб культур бруцелл с помощью описанного метода. Следует отметить, что 10 из 12 исследуемых штаммов возбудителя бруцеллеза имеют в масс-спектрах наборы уникальных фрагментов, количество которых варьирует от 2 (*B. abortus* 1552) до 12 (*B. suis* 61). Эта информация может быть использована в качестве одного из критериев для паспортизации, а также полезна для установления происхождения и идентичности отдельных штаммов.

Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что MALDI-TOF MS позволяет быстро и воспроизводимо проводить идентификацию бруцелл на уровне рода и, в ряде случаев, дифференциацию до уровня штамма. Для эффективного применения метода необходимо создание представительной электронной базы данных масс-спектров коллекционных штаммов возбудителя бруцеллеза. Не менее актуальным является поиск и отбор родоспецифичных маркерных фрагментов, наличие которых в масс-спектрах позволит сделать вывод о возможном присутствии возбудителя бруцеллеза в пробе.

Литература:

1. Ferreira L., Vega S., Sanchez-Juanes F., Gonzalez M., Herrero A. et al. Identifying bacteria using a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Comparison with routine methods used in clinical microbiology laboratories. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. – 2010. – V. 28. – P. 492 – 497.

2. Veen S., Claas E., Kuijper E. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. J.Clin.Microbiol. – 2010. – V. 48. – P. 900 – 907.

3. Lista F. et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiology. – 2011. – V. 11. – P. 267.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, ВЫДЕЛЕННЫХ В Г. КАЗАНИ В 2013 ГОДУ

Спицын А.Н., Портенко С.А., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Осина Н.А.

ФКУЗ « Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS) является в настоящее время одним из наиболее быстрых и чувствительных методов анализа белковых профилей для точной идентификации бактерий до уровня рода, вида или подвида [3, 4]. В микробиологии MALDI-TOF-MS имеет ряд потенциальных преимуществ относительно других методов типирования бактерий: относительно простая подготовка образца, которая может быть проведена в течение нескольких минут, не требуется наличие препаратов специфических антител и зондов, рабочий процесс является простым, быстрым и может быть унифицирован для большинства видов бактерий, многие этапы пробоподготовки, сбора и анализа данных могут быть автоматизированы.

Нами была изучена возможность применения MALDI-TOF-MS для идентификации штаммов возбудителя легионеллеза, выделенных в г. Казани в 2013 году.

В работе использовали 6 штаммов *Legionella pneumophila*, выделенных из разных источников в г. Казани в июле 2013 г. при мониторинге системы горячего водоснабжения во время подготовки и проведения XXVII Всемирной летней Универсиады. Отбор, концентрирование и микробиологические исследования проб проводили в соответствии с МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *Legionella pneumophila* в объектах окружающей среды». Штаммы легионелл культивировали на буферном угольно-дрожжевом агаре при температуре 37°С в течение 48 ч. Экстракцию белков осуществляли двумя способами: экстракцией с использованием 80% трифторуксусной кислоты (ТФУ) [1] и с применением 70% муравьиной кислоты [2].

Сбор спектров проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия). Анализируемый диапазон масса/заряд составил 2000 – 20000 Да. Автоматическую идентификацию проводили с помощью программы «MALDI Biotyper 3.0 RTC» (Bruker Daltonics, Германия), сравнивая

исходные спектры с референсными спектрами базы данных MALDI Biotyper. По окончании процесса идентификации, программа отображала результат, приводя наиболее ревалентную исходному спектру таксономическую единицу базы данных, с указанием значения коэффициента соответствия (Score Value). Значение коэффициента соответствия большее или равное 2,0 рассматривалось как достоверная идентификация. В результате установлено, что все выделенные штаммы принадлежат к виду *L. pneumophila*. При этом коэффициент соответствия составил в среднем ∑ 2,054 при экстракции муравьиной кислотой, а при экстракции ТФУ – 1,972.

Полученные данные указывают на то, что способ подготовки проб для масс-спектрометрии с использованием муравьиной кислоты является более эффективным, чем с применением ТФУ.

При кластерном анализе полученных масс-спектров изученные штаммы легионелл объединены в две группы. В первую (I) вошли штаммы 81/8, 53/2, 54/3, 52/1, во вторую (II) – 56/5 и 55/4. В случае использования для анализа масс-спектров, входящих в базу данных MALDI Biotyper, штаммы *L. pneumophila*, выделенные в г. Казани в 2013 году формировали отдельную ветку от штаммов, выделенных в Европе и США. Полученные данные указывают на то, что по совокупности пиков в масс-спектре все штаммы в 100% случаев идентифицированы как *L. pneumophila*, но в тоже время имеются незначительные отличия, на основании которых каждый штамм имеет уникальный масс-спектр, который может быть ассоциирован с эколого-географической характеристикой патогена. Для подтверждения выдвинутого предположения требуется продолжить работы по изучению масс-спектров штаммов возбудителя легионеллеза, выделенных в разных регионах РФ и других странах мира.

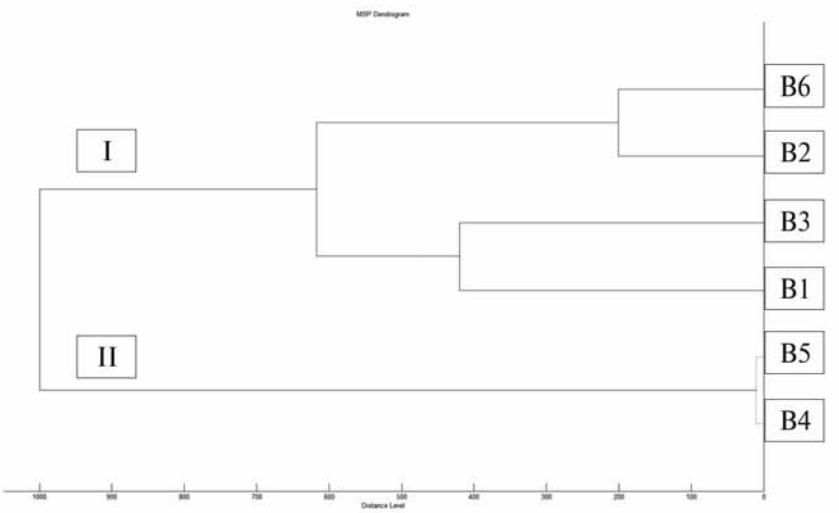


Рисунок 1 – Кластерный анализ MALDI-TOF-MS спектров штаммов: L. pneumophila 52/1 (B1), 53/2 (B2), 54/3 (B3), 55/4 (B4), 56/5 (B5), 81/8 (B6). Расстояние отображается в относительных единицах.

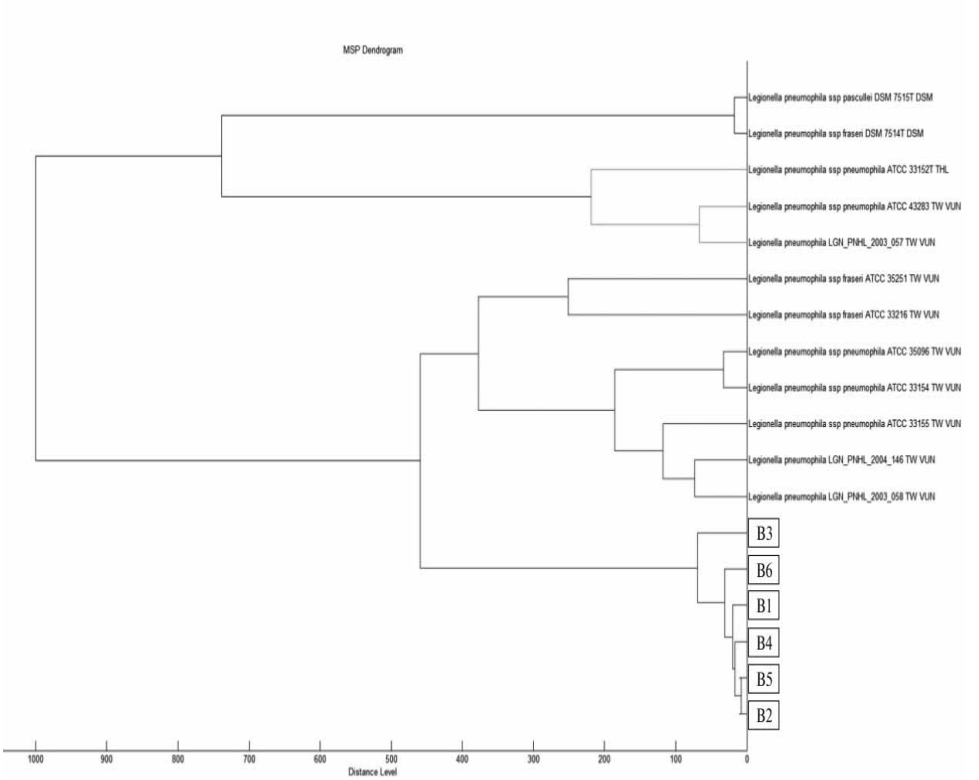


Рисунок 2 – Кластерный анализ MALDI-TOF-MS спектров штаммов: L. pneumophila 52/1 (B1), 53/2 (B2), 54/3 (B3), 55/4 (B4), 56/5 (B5), 81/8 (B6) и штаммов L. pneumophila базы данных MALDI Biotyper (L. pneumophila LGN_PNHL_2003_057, L. pneumophila LGN_PNHL_2003_058, L. pneumophila LGN_PNHL_2004_146, L. pneumophila ssp fraseri ATCC 33216, L. pneumophila ssp fraseri ATCC 35251, L. pneumophila ssp fraseri DSM 7514T, L. pneumophila ssp pascullei DSM 7515T, L. pneumophila ssp pneumophila ATCC 33152T, L. pneumophila ssp pneumophila ATCC 33154, L. pneumophila ssp pneumophila ATCC 33155, L. pneumophila ssp pneumophila ATCC 35096, L. pneumophila ssp pneumophila ATCC 43283).

Расстояние отображается в относительных единицах.

Литература:

1. Lasch, P., H. Nattermann, M. Erhard, M. Stammler, R. Grunow, N. Bannert, B. Appel, D. Naumann MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. Anal. Chem. 2008, 80: 2026–2034.

2. Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., Lasala P., Kostrzewa M., Harmsen D.. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. J. Clin. Microbiol. 2008, 46: 1946–1954.

3. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K: Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS ONE 2008, 3: e2843.

4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 2009, 49: 543–551.

ИЗУЧЕНИЕ ХОЛЕРОГЕН-АНАТОКСИНА МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Спицын А.Н., Германчук В.Г., Киреев М.Н., Захарова Т.Л., Уткин Д.В., Осина Н.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Времяпролетная MALDI масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является новой технологией в клинической диагностике, позволяющей проводить анализ биологических молекул и представляет альтернативу традиционным хроматографическим методам их определения. MALDI-TOF MS использовалась для идентификации ботулинического нейротоксина, столбнячного токсина, стафилококкового энтеротоксина [1] и шига-токсина *E. coli* O157 [2]. Для анализа холерного токсина данный метод не использовался.

Целью данной работы являлось исследование препаратов холероген-анатоксина разных серий с помощью масс-спектрометрического анализа. Холероген-анатоксин входит в состав химической бивалентной холерной вакцины, выпускаемой ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». В работе использовали две серии препаратов холероген-анатоксина. Выделение белка проводили по методу Mekalanos J.J. *et al.* [3], состоящий в осаждении белка из культуральной жидкости при низком значении pH и последующей очистке ионообменной хроматографией, основанной на способности белка холерогена (в отличии от других белков холерного вибриона) связываться с катионообменными смолами при pH 7,0. В качестве контроля использовали коммерческий препарат холерного токсина – «Cholera toxin from *Vibrio cholera*» (Sigma, USA).

В качестве матрицы для MALDI-TOF-анализа использовали 10 мг/мл α-циано-4-гидроксикоричной кислоты в 50% растворе ацетонитрила и 2,5% растворе трифторуксусной кислоты. Сбор спектров проводили на масс-спектрометре Microflex™ LT (Bruker Daltonics, Германия) в диапазоне масса/заряд 2000 – 20000 Да.

В результате получены масс-спектры препаратов холероген-анатоксина различных серий и контрольного образца холерного токсина (Рисунок 1).

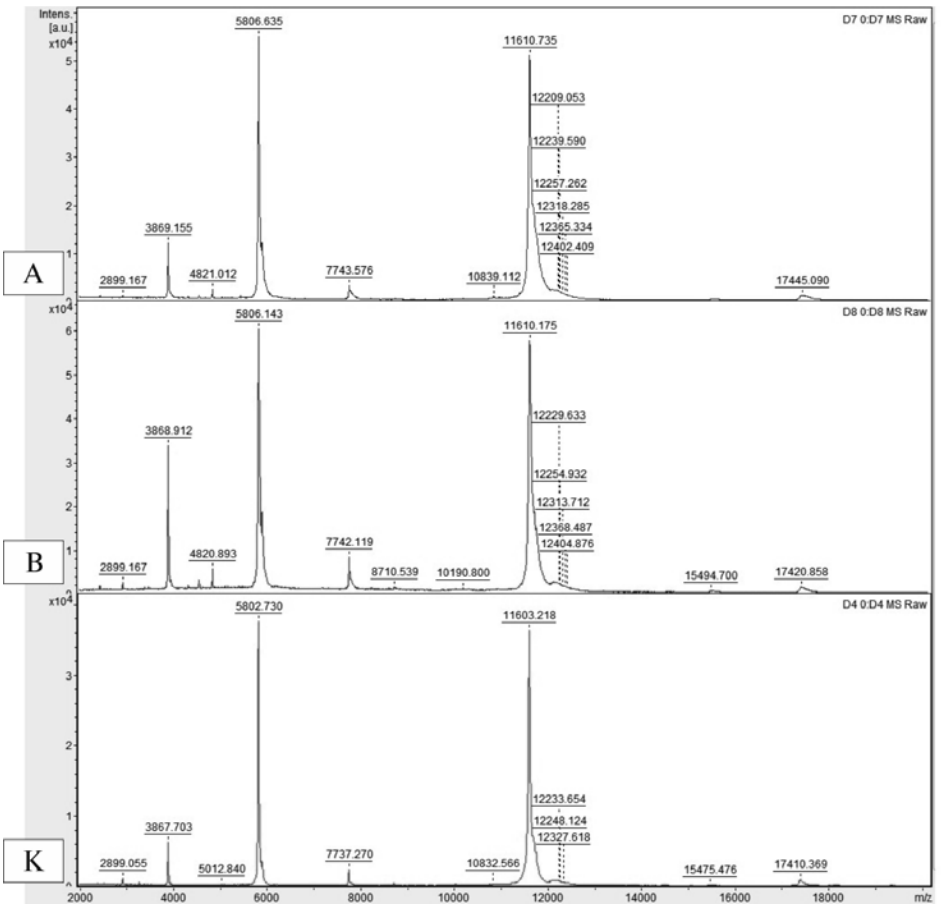


Рисунок 1. Масс-спектры препаратов холероген-анатоксина и контрольного образца (А-серия 1; Б-серия 2; К-холерный токсин).

На основании полученных данных выделены биологические маркеры (спектральные пики с определенным значением *m/z*), соответствующие препарату холероген-анатоксину (значения *m/z* 2899±1, 3868±1, 5803±4, 7737±6, 11603±7). Спектральный пик с *m/z,* равным 11603±7, предположительно, соответствовал одному мономеру В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой ~11 кДа. Масс-спектр холероген-анатоксина в полной мере соответствовал масс-спектру коммерческого препарата холерного токсина. Отмечено образование большего количества пиков, соответствующих белкам с молекулярной массой ~ 12 кДа в препаратах холероген-анатоксина.

Таким образом, метод MALDI-TOF масс-спектрометрии может быть использован для контроля холероген-анатоксина в процессе производства данного профилактического препарата.

Литература:

1. Дубровский Я.А., Подольская Е.П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор). Научное приборостроение. 2010; 20 (4): 21-35.

2. Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved α-Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS. J. Biomed. Biotechnol. 2010.

3. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of cholerae toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypertoxinogenic mutants // Infect. Immun. – 1978; 20:552–9.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИНАМИКИ СПЕКЛОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА

Бахарев А.А. [2], Владимиров А.П. [1,2], Малыгин А.С.[1], Михайлова Ю.А. [1,2], Бородин Е.М. [1], Порываева А.П. [2]

[1] ФГОУ ВПО «Уральский Федеральный Университет», Екатеринбург;
[2] ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург.

virus@eniivi.ru

Введение.

Важным аспектом в изучении клеточных процессов является возможность контроля их развития неразрушающими методами. Перспективным инструментом для изучения микроскопических процессов, происходящих в биологических средах, является метод регистрации динамики лазерных спеклов или биоспеклов [1]. Спеклы (англ. speckle – крапинка, пятнышко) – случайная интерференционная картина, которая образуется при взаимной интерференции многих когерентных волн, имеющих случайные сдвиги фаз.

При освещении лазерным излучением живых объектов вследствие изменения во времени амплитуд и фаз рассеянных волн картина спеклов меняется. Динамика спеклов использовалась для оценки биологической активности семян [2], фруктов [3], кожи человека [4] и других объектов. Ссылки на многочисленные работы в данной области можно найти в книге [1]. С научной и практической точки зрения представляет интерес выявление связи между параметрами, характеризующими процессы в объектах, вызывающие случайные изменения амплитуд и фаз волн, с характеристиками динамики спеклов. В общем случае установление такой связи является сложной задачей. Примером успешного решения проблемы является разработка метода, предложенного впервые в работах [5,6] и доведенного до практического применения в клиниках. В настоящее время метод достаточно проработан теоретически и экспериментально [7]. Он позволяет по контрасту спеклов оценивать скорость потоков крови на сетчатке глаза и вблизи кожных покровов конечности пациента.

В одной из наших работ [8] рассмотрена теория динамики спеклов на основе процесса зондирования когерентными волнами тонкого прозрачного объекта.

На основе полученных результатов была предложена спекл-интерферометрическая установка, позволяющая оценивать метаболическую активность клеток, культивированных на прозрачной подложке [9]. В качестве параметра, характеризующего активность клеток, было выбрано значение вариации оптической разности хода σ_u пар волн, зондирующих объект. Недостатком установки являлась невозможность проведения измерений в реальном времени, а также трудности, возникающие при интерпретации данных. Последнее обстоятельство связано с наличием процессов в клетке, одновременно протекающих с разной скоростью.

Целью работы являлось устранение указанных недостатков методики и ее использование для изучения метаболической активности трех клеточных культур с вирусом и в отсутствие вируса.

Техника и методика эксперимента

В качестве объектов исследований были выбраны культуры клеток Л-41 КД/84, ЛЭЧ-3, Vero нативные и зараженные ВПГ-1 в дозах обеспечивающих массовую деградацию клеток к 24 часам. Подготовка биологических образцов осуществлялась специалистами ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора. Эксперименты проводились на установке, представленной на рисунке 1.

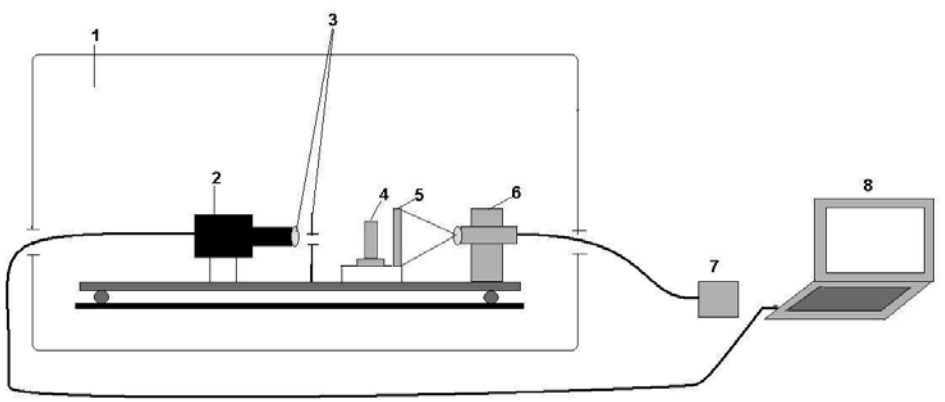


Рисунок 1. Схема оптической установки: 1 – термостат, 2 – телекамера Видеоскан, 3 – линза с диафрагмой, 4 – кювета, 5 – матовое стекло, 6 – лазерный модуль, 7 – блок питания (5В), 8 – ПК.

В качестве источника света использован полупроводниковый лазерный модуль с длиной волны λ=0.65 мкм и мощностью 20 мВт. Излучение от модуля попадало на матовый рассеиватель. На расстоянии порядка 10 см от рассеивателя располагали стеклянную кювету размером 9х25х40 мм (толщина внутренней полости 3 мм). В кювету вводили стеклянную подложку толщиной 1,5 мм со слоем клеток, рядом располагали подложку без клеток и стеклянный фиксатор. Далее излучение попадало на объектив с диафрагмой, формирующей картину спеклов. Типичное увеличение оптической системы равнялось 0,3мкм, линейное разрешение линзы на объекте составляло 60 мкм. В опытах использовалась монохромная телекамера 2 типа Видеоскан –

415/П/К-USB. Частота ввода кадров – до 25 Гц. Время экспонирования телекамеры составляло 9 с.

Как известно, оптимальная температура роста клеточных культур – 36,6 ± 0,5°С, снижение температуры приводит к быстрому снижению физиологической активности клеток, поэтому система устройств находилась в термостате. Сигналы с телекамеры через USB-порт поступали на ноутбук типа Aspire 3692 WLMi фирмы Acer.

Программное обеспечение в режиме реального времени в течение 1-2 суток регистрировало два параметра динамики спеклов – цифровое значение оптического сигнала I и параметр η, характеризующий изменение оптического сигнала на участке 10×10 пикселей. Величина η определялась по формуле (9):

Зависимость $\eta=\eta(t)$ является нормированной временной автокорреляционной функцией, характеризующей процесс случайного изменения интенсивностей излучения в плоскости изображения тонкого прозрачного объекта [8].

Анализ формулы показывает, что, если процесс изменения разностей фаз во времени является стационарным (величины k_{11} и k_{22} равны), то функция $\eta=\eta(t)$ выходит на постоянный уровень после времени, превышающего время корреляции разностей фаз. По значению этого уровня можно определить величину k_{11}. Если процесс изменения разности фаз является нестационарным, но время усреднения величины I превышает указанное время корреляции, то по мере увеличения k_{22} величина η уменьшается. Отметим, что для фиксированных значений t_1 и t_2 величина η является коэффициентом корреляции интенсивностей в моменты времени t_1 и t_2, а формула (1) соответствует усреднению по ансамблю объектов (реализаций). В качестве реализаций нами были взяты различные области подложки с клетками, размер которых равен линейному разрешению линзы.

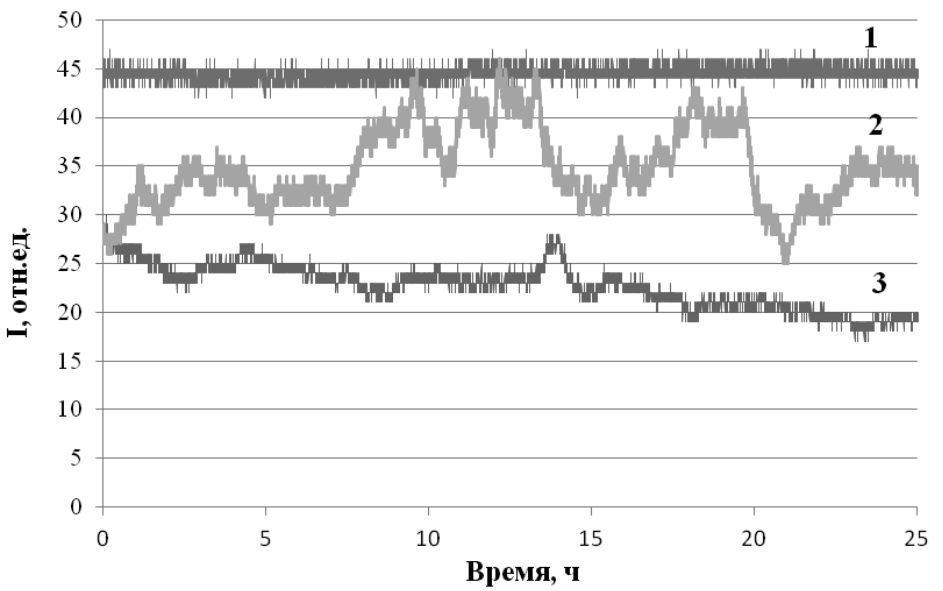


Рисунок 2. Зависимость цифрового значения оптического сигнала от времени для культуры Vero: 1 – питательный раствор, 2 – клетки, зараженные ВПГ-1, 3 – интактные клетки.

Исследуемые параметры (параметр η и оцифрованное значение оптического сигнала I) для картины спеклов, соответствующей процессам в питательной среде, интактным клеткам и клеткам, зараженным ВПГ-1 представляют собой зависимости, изображенные на рисунках 2-3.

На рисунке 2 представлены типичные зависимости оцифрованных значений оптического сигнала *I* от времени для питательной среды (1), клеток (3) и клеток с вирусом (2).

Полученные результаты показали, что оцифрованные значения оптического сигнала I для клеток зараженных ВПГ-1 изменяются в больших пределах, чем в отсутствие вируса.

На рисунке 3 представлены зависимости параметра η от времени для клеточной культуры Vero с ВПГ-1 и без него.

Видно, что величина η имеет тенденцию к постепенному уменьшению для клеток и клеток с вирусом. Для клеточных культур ЛЭЧ-3 и Л-41 наблюдались подобные зависимости. Коэффициент множественной детерминированности (при сравнении клеток с вирусом и без ВПГ-1) был равен 0,934 – для ЛЭЧ, 0,89 – для Vero, 0,87 – для Л-41. Для клеточных культур в отсутствие вируса коэффициент множественной детерминированности был равен 0,939. Близость коэффициента к единице свидетельствует о том, что типы процессов в клетках, изменяющих пути рассеянных волн, подобны.

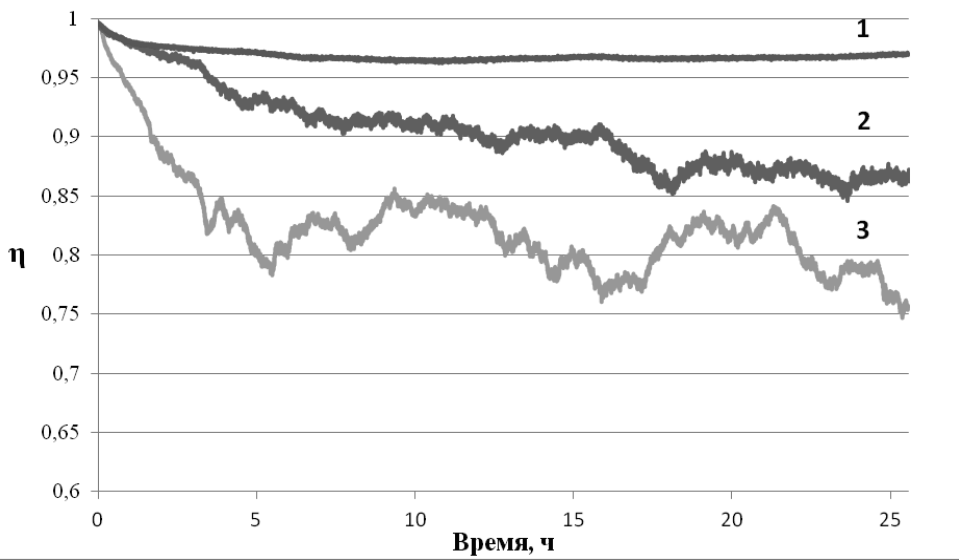


Рисунок 3. Зависимость η от времени для культуры Vero: 1 – питательная среда, 2 – интактные клетки, 3 – клетки, зараженные ВПГ-1.

В настоящей работе время экспонирования *T* телекамеры было выбрано равным 9 секундам, что превышало время корреляции интенсивности излу-

чения (5-8 секунд), найденное ранее в работе [9]. При малых по сравнению с единицей значениях k_{11} и k_{22} время корреляции интенсивности равно времени корреляции τ_0 разности фаз волн [8]. Согласно этой формуле, из рис. 4 следует, что уменьшение величины η соответствует увеличению дисперсии разности фаз k_{22}. Пока не ясно, чем вызвано это увеличение. Возможно, по мере уменьшения количества питательных веществ в растворе, изменение рельефа поверхности клеток, а также структура самих клеток становятся более неоднородными, в тоже время данное явление может объясняться выходом вирусных частиц. Для внесения ясности в данный вопрос нужны дальнейшие исследования.

Как было отмечено выше, в работе [9] в качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клеток, была выбрана величина $\sqrt{k_{22}}$, соответствующая клеткам. Поскольку при $T > \tau_0$ имеется однозначное соответствие между величинами η *и* k_{22}, то в подобных случаях для оценки метаболической активности можно использовать значение величины η.

В целом, полученные результаты соответствуют общеизвестным характеристикам взаимодействия вирусов и клетки. Продуктивная вирусная инфекция приводит на первых этапах к угнетению синтеза крупных молекул, которое (для ВПГ) достигает максимума к 5 часам после заражения, максимум синтеза вирусной ДНК достигается через 8 часов, активный выход вирусных частиц наблюдается через …18-20 часов. Имеющиеся на приведенных графиках экстремумы как по времени, так и по направленности, соответствуют указанным периодам. [10]

Заключение

На основе проведенных исследований можно сделать выводы:

1) Для разных клеточных культур зараженных ВПГ-1 и интактных зависимости η от времени имеют одинаковую тенденцию: величина η (отражает степень изменения картин спеклов от времени) нелинейно уменьшается по мере увеличения времени проведения эксперимента. Коэффициент множественной детерминированности, найденный по зависимостям $\eta=\eta(t)$, составляет 0,94.

2) В качестве параметра, характеризующего метаболическую активность клетки, рекомендовано использовать определяющую степень корреляции изображений на участке размером в 10×10 пикселей, взятых в начальный момент и через время τ.

3) Зависимость η от времени для клеточных культур с вирусом и в отсутствие вируса существенно различаются. Коэффициент множественной детерминированности равен 0,934 – для ЛЭЧ, 0,89 – для Vero, 0,87 – для Л-41.

4) Экспериментальные данные на графиках зависимости I от времени имеют определенную величину, связанную с высокочастотными изменениями оптического сигнала, что можно рассматривать как шум.

5) Как показал анализ экспериментальных данных, на фоне этих шумов различие величины η для клеток и клеток, зараженных ВПГ-1, можно обнаружить через 10 минут после начала эксперимента, в то время как минимальное время обнаружения вируса традиционными методами составляет около 3 часов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности использования метода динамической спекл-интерферометрии для исследования в области биологии клетки.

Литература:

1. Dynamic Laser Speckle and Applications. Edited by Hector J. Rabal and Roberto A . Braga. CRC Press, 2008.

2. R.R. Cardoso, A.G. Costa, C.M. B. Nobre, R.A. Braga Jr. Frequency signature of water activity by biospeckle laser. Optics Communications, 2011, V.284, pp. 2131–2136.

3. A. Oulamara, G. Tribillon, J. Duvernoy. Biological activity measurement on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle. Journal of Modern Optics, 1989, V. 36, No. 2 , pp. 165–79.

4. Владимиров А.П., Лисин А.Л., Микушин В.И. и др. Применение техники счета числа мерцаний спеклов для изучения биологической активности кожи. Письма в ЖТФ, 2000, т. 26, с. 20–24.

5. FERCHER A.F., BRIERS J.D., Flow visualization by means of single-exposure speckle photography, Optics Communications 37 (5), 1981, pp. 326–30.

6. BRIERS J.D., WEBSTER S., Laser speckle contrast analysis (LASCA): a nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow, Journal of Biomedical Optics 1 (2), 1996, pp. 174–179.

7. J. D. Briers. Laser speckle contrast imaging for measuring blood flow. Optica Applicata, Vol. XXXVII, No. 1–2, 2007, pp. 139–152.

8. Vladimirov, A.P., Druzhinin, A.V., Malygin, A.S., Mikitas, K.N., «Theory and calibration of speckle dynamics of phase object», Proc. SPIE 8337, 83370C-1-83370C-15 (2012).

9. Малыгин А.С., Бебенина Н.В., Владимиров А.П., Микитась К.Н., Бахарев А.А. Спекл – интерферометрическая установка для изучения биологической активности клеток// ПТЭ – 2012 – № 3. – С. 124–127.

10. Бочаров А.Ф., Кицак В.Я., Бочаров Е.Ф., Трухачев А.А. «Вирус простого герпеса» Новосибирск. Наука, 1992.

РАЗДЕЛ 4.
ИММУНОЛОГИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ВАКЦИН

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БРУЦЕЛЛЕЗА

Курчева С.А., Старцева О.Л.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

labdiagn@yandex.ru

Иммуноферментный анализ (ИФА) к настоящему времени прошел путь от новейшей научной разработки до рутинного метода в клинической диагностике. По сравнению с другими методами выявления антигенов и антител профессионально разработанные тест-системы обладают следующими преимуществами: высокой чувствительностью, позволяющей выявлять концентрации белка в диапазоне нг/мл и специфичностью; воспроизводимостью полученных результатов; стабильностью при хранении всех необходимых реагентов (до года и более); простотой проведения реакции и возможностью использования минимальных объемов исследуемого материала; наличием инструментального учета реакции и возможностью автоматизации всех ее этапов [1].

Нами была разработана и зарегистрирована в Росздравнадзоре тест-система иммуноферментная для выявления антител к возбудителю бруцеллеза для исследования сывороток крови больных людей и подозреваемых на заболевание острым бруцеллезом (РУ № РЗН 2013/428) [2].

Основные параметры ИФА, а именно чувствительность, точность и воспроизводимость, могут существенно изменяться при варьировании условий проведения эксперимента, что обуславливает необходимость оптимизации каждой стадии анализа [3].

Проведен эксперимент с различными концентрациями антигена водорастворимого бруцеллезного поливалентного (Аг-в/р), извлеченного из микробных клеток по методу Е.Н. Афанасьева (1983) [4]. Кроме Аг-в/р, мы изолировали бруцеллезный липополисахаридный антигенный комплекс (ЛПС) водно-фенольной экстракцией по модифицированному методу E. Moreno, S. Speth, L.M. Jones et al. (1981) [5], активировали его по методу Т.В. Белика (2010) [6]. Оптимальные сенсибилизирующие дозы Аг-в/р и ЛПС определяли в серии опытов «шахматного титрования» специфической и нормальной сывороток против коньюгата пероксидазного антигенного бруцеллезного (рабочее разведение 1:800) на микропланшетах, сенсибилизированных

различными антигенными комплексами в разведениях от 300 до 1 мкг/мл. Также подбирали оптимальную температуру (37; 22 и 4°С) взаимодействия компонентов реакции – исследуемый образец (сыворотка крови) с поверхностью микропланшета, сенсибилизированного различными антигенными комплексами. Учет результатов теста ИФА проводили на фотометре марки «Multiskan FC» при длине волны 450 нм по отношению оптической плотности (ОП) испытуемой сыворотки к ОП отрицательного контроля. Результат считали положительным, если ОП испытуемой сыворотки в 2 и более раза превышала ОП отрицательного контроля.

После проведения реакции ИФА с тест-системой иммуноферментной для выявления антител к возбудителю бруцеллеза оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при различных концентрациях антигенных комплексов в растворе. Недостаточное количество Аг-в/р и ЛПС приводит к снижению чувствительности теста, а избыток – к перерасходу дорогостоящего реагента. Было установлено, что оптимальная концентрация Аг-в/р и ЛПС для сенсибилизации микропланшет – 50 мкг/мл. Температурные же показатели не оказывали значительного влияния на результаты взаимодействия исследуемой сыворотки крови с поверхностью сенсибилизированного антигенным комплексом микропланшета. Наименее материально затратной и трудоемкой является сенсибилизация микропланшет Аг-в/р в концентрации 50 мкг/мл.

Планируется провести дополнительные эксперименты по оптимизации проведения отдельных этапов реакции и при получении значимых результатов внести соответствующие изменения в промышленный регламент производства МИБП.

Литература:

1. Верховский О.А. Лабораторная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота с использованием иммуноферментного анализа (лейкоз, ящур, бруцеллез) // Ветеринария Кубани. – 2007. – № 2. – С. 11–12.

2. Разработка тест-системы иммуноферментной для выявления антител к возбудителю бруцеллеза и оценка ее диагностической эффективности / С.А. Курчева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев [и др.] // Актуальные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в Причерноморском регионе: материалы региональной науч.-практич. конф. с междунар. участием. – Ставрополь, 2013. – С. 110–111.

3. Вязникова Т.В. Конструирование иммуноферментных тест-систем на основе авидин-биотинового взаимодействия для определения антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-HBS): автореф. дис…. канд. биол. наук. – Екатеринбург, 2007. – 26 с.

4. Афанасьев Е.Н. Сравнительная характеристика антигенной структуры бактерий рода Brucella: дис. … канд. мед. наук. – Ставрополь, 1983. – 173 с.

5. Immunochemical characterisation of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides / E. Moreno, S. Speth, L.M. Jones [et al.] // Infect Immun. – 1981. – Vol. 31, № 1. – P. 214–222.

6. Способ сенсибилизации планшета для иммуноферментного анализа полисахаридными антигенами / Т.В. Белик // Патент РФ 2380709. – № заявки 2008118599/15; 14.05.2008; опубл. 27.01.2010, Бюл. № 3. – 11 с.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ «РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ» CD95, DR3 И DR6 ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ АПОПТОЗЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Анисенкова Е.В. [1], Преснякова Н.Б. [1], Филатова Е.Н. [1], Уткин О.В. [1,2]

[1] ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород;

[2] ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

lena_anisenkowa@mail.ru

При моделировании инфекционных процессов важную роль отводят исследованию характера программируемой клеточной гибели (ПГК) в различных популяциях лимфоцитов. Одним из вариантов ПГК является апоптоз. В качестве активатора иммунокомпетентных клеток и потенциального индуктора апоптоза в модельных in vitro системах часто используется липополисахарид (ЛПС) – термостабильный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

В настоящее время отсутствуют данные, демонстрирующие прямое апоптоз-индуцирующее действие ЛПС на популяцию Т-клеток [1]. Применение ЛПС в некоторых in vivo животных моделях свидетельствует об активации апоптоза Т-лимфоцитов [2]. In vitro продемонстрировано повышение уровня апоптоза $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток при добавлении ЛПС в культуру мононуклеарных клеток периферической крови [1].

Один из возможных путей индукции апоптоза Т-лимфоцитов in vitro связан с активацией ЛПС популяций моноцитов, дендритных клеток, NK-клеток, а также субпопуляций Т-регуляторных клеток (Treг) через Toll-подобные рецепторы (TLRs) на их поверхности. Ряд исследований указывает на то, что ЛПС ингибирует программируемую гибель В-клеток, в то время как совместное культивирование ЛПС-стимулированных В-лимфоцитов и интактных Т-клеток индуцирует апоптоз в обеих популяциях [3]. Предполагается, что ЛПС-активированные Treг и антигенпрезентирующие клетки инициируют гибель Т-лимфоцитов путем апоптоза без участия рецептора CD95 [4].

CD95 (Fas/Apo1) является членом белкового семейства «рецепторов смерти», представителями которого также являются молекулы DR3 и DR6. Наряду с рецептором CD95 молекулы DR3 и DR6 также участвуют в инициации апоптоза лимфоцитов [5].

Целью данной работы явилась оценка плотности экспрессии рецепторов CD95, DR3 и DR6 на поверхности разных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови человека в сопоставлении с уровнем апоптоза при активации липополисахаридом.

Материалы и методы:

Материалом для исследования явились 10 образцов периферической крови здоровых волонтеров в количестве 20 мл. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли в градиенте плотности Гистопак

(ρ=1,077 г/см^3, «Sigma», США). Выделение субпопуляций наивных Т-хелперов ($CD4^+CD45RO^+$, наивные Тх), зрелых Т-хелперов ($CD4^+CD45RO^-$, зрелые Тх), наивных цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CD45RO^+$, наивные ЦТЛ) и зрелых цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+CD45RO^-$, зрелые ЦТЛ) проводили методом негативной магнитной иммуносепарации с помощью коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies», Великобритания). Выделенные субпопуляции Т-лимфоцитов культивировали раздельно в концентрации 1x10^6 кл/мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Австрия) и 2 мМ L-глутамина при 37°С и 5% CO_2. Активацию субпопуляций наивных и зрелых Тх и ЦТЛ проводили с помощью липополисахарида E. coli 0111:B4 («Sigma», США) высокой степени очистки в концентрации 10 мкг/мл в течение 20 часов. Клетки, не подвергавшиеся активации ЛПС, культивировали в аналогичных условиях в течение 20 часов и использовали в качестве контроля. Наличие апоптоза в контроле расценивали как спонтанный вариант ПГК.

Уровень апоптоза в субпопуляциях Т-лимфоцитов, а также плотность экспрессии мембранных рецепторов CD95, DR3 и DR6 определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Для оценки уровня апоптоза применяли двойное окрашивание аннексином V (AV) и 7-аминоактиномицином-D (7-AAD) с использованием коммерческого набора «PE Annexin V Apoptosis Detection Kit» («BD Biosciences», США). Плотность экспрессии поверхностных «рецепторов смерти» определяли с помощью набора флуоресцентно меченых антител против CD95-PE-Cy7 («eBioscience», США), DR3-DyLight488, DR6-APC («Novus Biological», США). Уровень фоновой флуоресценции, а также гейты клеток, негативных по CD95, DR3 или DR6 определяли с применением изотипического контроля для каждого антитела.

Гейтирование субпопуляций лимфоцитов проводили на основании анализа прямого и бокового светорассеяния. Как в контрольных, так и в опытных образцах $AV^-7\text{-}AAD^-$ и $AV^+7\text{-}AAD^-$ клетки определяли как живые и апоптотирующие, соответственно. Гейты $AV^-7\text{-}AAD^-$ и $AV^+7\text{-}AAD^-$ клеток анализировали раздельно. Уровень апоптоза оценивали в соответствии с процентом $AV^+7\text{-}AAD^-$ клеток. Плотность экспрессии «рецепторов смерти» определяли по показателю интенсивности флуоресценции (MFI) как разницу между MFI $CD95^+$, $DR3^+$ или $DR6^+$ клеток и MFI соответствующего изотипического контроля. Сбор данных, оценку и статистический анализ проводили с помощью программ «BD FACS Diva 6.1.3» («BD Biosciences», США) и «Statistica 8.0» («StatSoft», США). Различия в уровнях спонтанного и ЛПС-индуцированного апоптоза, а также значений показателя MFI «рецепторов смерти» живых и апоптотирующих клеток определяли с применением непараметрического критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение:

При ЛПС-активации выявлено статистически значимое увеличение в 1,6 раза процента зрелых Тх (p=0,028), вступивших в раннюю стадию апоптоза, по

сравнению со спонтанно апоптотирующими контрольными клетками. В субпопуляциях наивных Тх, наивных и зрелых ЦТЛ различий в уровнях ЛПС-индуцированного и спонтанного апоптоза не обнаружено.

Добавление ЛПС в культуру изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов не оказывало влияние на характер экспрессии CD95, DR3 и DR6. Так не обнаружено различий в плотности экспрессии изучаемых «рецепторов смерти», а также проценте клеток, их экспрессирующих, в ЛПС-активированных субпопуляциях Т-лимфоцитов по сравнению с контрольными клетками в стадии спонтанного апоптоза.

Однако выявлены различия в экспрессии рецепторов CD95, DR3 и DR6 на поверхности живых и апоптотирующих клеток в контрольных (данные не представлены) и ЛПС-активированных субпопуляциях Т-лимфоцитов, предположительно не связанные с воздействием активатора. При ЛПС-индуцированном апоптозе показано статистически значимое увеличение процента $CD95^+$ клеток во всех исследуемых субпопуляциях Т-лимфоцитов: зрелых Тх в 1,7 раза ($p=0,028$), наивных Тх в 1,6 раза, зрелых ЦТЛ в 1,2 раза и наивных ЦТЛ в 1,3 раза ($p=0,043$ для трех субпопуляций, соответственно). Индукция апоптоза ЛПС в субпопуляции зрелых Тх приводила к статистически значимому увеличению в 3,5 раза показателя MFI рецептора CD95 по сравнению с живыми клетками ($p=0,028$). В наивных Тх, наивных и зрелых ЦТЛ ЛПС-индуцированный апоптоз не сопровождался изменением плотности экспрессии рецептора CD95.

Кроме того, ЛПС-активация вызывала статистически значимое увеличение процента $DR3^+$ клеток: в субпопуляции зрелых Тх в 2,1 раза ($p=0,028$), в наивных Тх в 1,3 раза ($p=0,043$), в зрелых ЦТЛ в 1,6 раза ($p=0,046$), в наивных ЦТЛ в 1,4 раза ($p=0,043$). При активации апоптоза ЛПС в субпопуляции зрелых ЦТЛ выявлено статистически значимое увеличение в 1,6 раза плотности экспрессии рецептора DR3 по сравнению с живыми клетками ($p=0,028$). В других исследованных субпопуляциях Т-лимфоцитов изменений показателя MFI данного рецептора не обнаружено.

Стимуляция изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов ЛПС не сопровождалась изменением процента $DR6^+$ клеток, а также показателя MFI данного рецептора по сравнению с живыми клетками.

Данные литературы о функциональной роли ЛПС как индуктора апоптоза различных субпопуляций Т-клеток противоречивы. Показано, что ЛПС оказывает влияние на популяцию изолированных зрелых Трег посредством активации TLR-4-зависимого рецепторного комплекса. В конечном итоге ЛПС стимулировал пролиферацию зрелых Трег и увеличивал их супрессивную активность в отношении других субпопуляций Т-лимфоцитов при дальнейшем совместном культивировании [6]. В работах других авторов полученные результаты подтверждения не нашли [7, 8].

В ходе нашего исследования показано, что ЛПС может участвовать в индукции апоптоза только изолированных зрелых Тх, возможно, при участии Т-регуляторных клеток, входящих в состав данной популяции [1, 4]. При этом не наблюдалось изменения экспрессии «рецепторов смерти» CD95,

DR3 и DR6 по сравнению со спонтанно апоптотирующими клетками, что может свидетельствовать об отсутствии вклада данных молекул в реализации пусковых событий ЛПС-индуцированного апоптоза.

С другой стороны, рецепторы CD95 и DR3 могут участвовать в инициации апоптоза в зависимости от типа клеток. Это выражалось в увеличении процента Т-клеток, экспрессирующих данные молекулы во всех исследованных субпопуляциях Т-лимфоцитов, а также повышении плотности экспрессии рецепторов CD95 и DR3 на мембране зрелых Тх и зрелых ЦТЛ, соответственно.

Литература:

1. Nielsen J.S., Larsson A., Ledet T., Turina M., et al. Rough-form lipopolysaccharide increases apoptosis in human CD4+ and CD8+ T lymphocytes // J. Clinic. Immunol. 2011. V. 75. P. 193-202.

2. Nielsen J.S., Larsson A., Brix-Christensen V., et al. Endotoxemia-induced lymphocyte apoptosis is augmented by a hyperinsulinemic-euglycemic clamp // J. Anesthesiology. 2005. V. 102. P. 768–773.

3. Souvannavong V., Lemaire C., Chaby R. Lipopolysaccharide protects primary B lymphocytes from apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and bax translocation to mitochondria // J. Infect Immun. 2004. V. 72. P. 3260–3266.

4. Tretter T, Venigalla RK, Eckstein V et al. Induction of CD4+ Tcell anergy and apoptosis by activated human B cells // J. Blood. 2008. V. 112. P. 4555–4564.

5. Wajant H. Death receptors // Essays Biochem. 2003. V. 39. P. 53-71.

6. Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D. et al. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide // J. Exp. Med. 2003. V. 197. P. 403-411.

7. Crellin N.K., Garcia R.V., Hadisfar O. et al. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells // J. Immunol. 2005. V. 175. P. 8051-8059.

8. Sutmuller R.P., den Brok M.H., Kramer M. et al. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T Cells // J. Clin. Invest. 2006. V.116. P. 485-494.

ЭКСПРЕССИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ХЕМОКИНОВОГО РЕЦЕПТОРА CCR7 НА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ, СТИМУЛИРОВАННЫХ ВАКЦИНАМИ IN VITRO

Талаев В.Ю.[1,2], Плеханова М.В.[1], Бабайкина О.Н.[1], Зобова С.В.[1]

[1] ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород;

[2] ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России

talaev@inbox.ru

Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, способными вовлекать наивные Т-лимфоциты в иммунный ответ [1]. Незрелые ДК (нДК) населяют разнообразные ткани нашего организма, особенно кожу и слизистые – наиболее вероятные входные ворота инфекции. Функция нДК заключается в сборе антигенов (АГ) с помощью фагоцитоза и пиноцитоза. Следует отметить, что среди всего разнообразия молекул бактерий и вирусов ДК способны идентифицировать лишь наиболее типичные для больших групп микроорганизмов молекулы – т.н. молекулярные паттерны патогенов (МПП). Распознавание МПП ведет к созреванию нДК в зрелые ДК. Эти клетки увеличивают экспрессию молекул, необходимых для представления собранных АГ и стимуляции Т-лимфоцитов, покидают нелимфоидные ткани и направляются в региональный лимфатический узел (ЛУ). Конечным пунктом миграции большинства ДК становится Т-клеточная зона ЛУ – место их встречи с наивными Т-лимфоцитами, которые постоянно рециркулируют через лимфоидные органы в поиске первого контакта с АГ [2].

Таким образом, участие ДК в запуске иммунного ответа обеспечивается не только их способностью поглощать микроорганизмы и презентировать их АГ лимфоцитам, но и уникальными миграционными свойствами, которые позволяют этим клеткам собирать АГ в различных тканях организма и транспортировать их в региональные лимфоидные органы – место запуска адаптивного иммунного ответа. Основным событием, определяющим путь миграции ДК, является изменение набора её хемокиновых рецепторов. При созревании на мембране ДК снижается количество рецепторов для хемокинов периферических и, особенно, воспаленных тканей, а вместо них экспрессируются рецепторы хемокинов, направляющих клетки в лимфатические сосуды и ЛУ. Среди этих вновь экспрессируемых рецепторов ключевую роль отводят CCR7, взаимодействующему с хемокинами CCL19 и CCL21 [3-5]. На пути миграции ДК значимая продукция CCL21 начинается в эндотелии лимфатических капилляров. ДК, привлеченные этим хемокином, через щелевые проходы между эндотелиальными клетками [4] попадают в лимфатические сосуды, и поток лимфы приносит их в краевой синус ЛУ. Под действием градиента CCL19 и CCL21, мощная продукция которых происходит в паракортексе, ДК преодолевают барьер стенки синуса и мигрируют вглубь

коры в Т-клеточную зону ЛУ. Продуцентами CCL19 и CCL21 в коре являются клетки высокого эндотелия венул, а также фибробластные ретикулярные клетки стромы ЛУ. Кроме того, сами ДК продуцируют CCL19, который привлекает наивные Т-лимфоциты в непосредственную близость к ДК, а также может обеспечивать контакты вновь прибывающих и резидентных ДК для обмена антигенным материалом [3].

Представляется очевидным, что эффективность вакцин зависит не только от качества и количества АГ, но и от дополнительных факторов (естественных МПП или адъвантов), которые должны стимулировать ДК к транспорту и эффективной презентации вакцинных АГ. В данной работе в условиях *in vitro* исследовалось действие вакцин на экспрессию дендритными клетками CCR7. Оценивались экспрессия гена *ccr7*, продукция белка CCR7 в цитоплазме, экспрессия его на мембране и функциональный статус этого рецептора.

Материалы и методы.

В работе использовали туберкулезную вакцину БЦЖ (Микроген, Москва), и рекомбинантную вакцину против гепатита В (ВПГВ) пр-ва ЗАО НПК «Комбиотех» (Москва). нДК получали из моноцитов периферической крови взрослых здоровых доноров с помощью инкубации с рекомбинантными ИЛ-4 (R&D, США) и ГМ-КСФ (R&D, США). ГМ-КСФ по 100 нг/мл и ИЛ-4 по 20 нг/мл добавляли дважды – при засеве моноцитов и на 3 сутки культивирования. Через 7 суток к нДК добавляли вакцины по 0,2 детские дозы/мл. Положительным контролем созревания служили ДК, инкубированные со смесью медиаторов воспаления (25 нг/мл ИЛ-1β (R&D, США), 25 нг/мл ИЛ-6 (R&D, США), 50 нг/мл ФНО-α (R&D, США), 1 мкг/мл простагландина E_2 (Sigma, США). Отрицательным контролем служили нДК без стимуляторов. Через 2 суток ДК собирали и анализировали экспрессию гена и белка CCR7, а также миграционные свойства ДК. Для оценки экспрессии гена из лизата клеток выделяли РНК с помощью набора NucleoSpin RNA XS (Machery-Nagel, Германия) и проводили одноэтапную полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (РТ-ПЦР) в режиме относительного количественного анализа на приборе Stratagen MX3500 (Agilent, США). Использовали праймеры и меченные пробы TaqMan Gene Expression Assay и реагенты One-Step RT-PCR Master Mix пр-ва Applied Biosystems (США). В качестве референсного использовали ген β2-микроглобулина. Нормализацию проводили по уровню мРНК *ccr7* в нДК (принимали за 1). Для оценки фенотипа ДК, а также анализа продукции белка CCR7 внутри клеток и его экспрессии на мембране использовали лазерную проточную цитометрию на приборе FACSCalibur (BD, США). Окрашивание мембранных молекул проводили антителами к CCR7, CD80, CD83, CD86 (eBiosciences, USA), CD14 и HLA-DR (Сорбент, Москва) традиционным способом. Для оценки внутриклеточной экспрессии белка CCR7 перед окрашиванием ДК фиксировали 4% параформальдегидом и перемеабилизировали мембрану 0,1% сапонином. Функциональные свойства CCR7 оценивали по способности ДК мигрировать через поры диаметром 8 мкм из вставок ThinCerts (Greiner-bio one, Швейцария) в лунки планшет, содержащие 500 нг/мл рекомбинантного хемокина CCL21. Одновременно оценивали спонтанную миграцию тех же клеток в лунки не содержащие

CCL21. Миграцию проводили в течение 2 ч., затем вставки убирали, среду из лунок собирали, и проникшие через поры клетки подсчитывали с помощью лазерного проточного цитометра. Результаты выражали как абсолютное к-во событий в гейте дендритных клеток за 90 сек. отбора пробы.

Результаты и обсуждение.

Использованные в работе нДК имели типичный фенотип: HLA-DR экспрессировали, в среднем, 96% клеток, CD80 – 84%, CD86 – 62%. Характерную для зрелых ДК молекулу CD83 несли лишь 13% нДК. Слабая остаточная экспрессия моноцитарного маркера CD14 наблюдалась на 9% клеток. Стимуляция нДК смесью медиаторов воспаления вызывала выраженное созревание клеток, проявляющееся в достоверном увеличении количества клеток, несущих CD80 и CD86 (до 96 и 92%, соотв.) и появлении молекулы CD83 на 76% клеток. В дальнейшем такие зрелые ДК мы использовали в качестве положительного контроля созревания. Стимуляция нДК вакцинами БЦЖ и ВПГВ также приводила к созреванию ДК, которое проявлялось в достоверном увеличении экспрессии CD83 и CD86 (данные не приведены).

Созревание ДК, индуцированное смесью медиаторов воспаления, приводило к увеличению количества транскриптов гена *ccr7* более чем в 20 раз (см. таблицу – зрелые ДК). Усиление экспрессии гена вело к эффективному синтезу белка и транспорту вновь синтезированного рецептора на наружную мембрану. В результате количество ДК, содержащих белок CCR7 как внутри клетки, так и на поверхности увеличивалось, приблизительно, до 30%. Экспрессированый на мембране CCR7 был функционально активен, о чем свидетельствует существенный рост количества клеток, мигрировавших через поры в лунки с хемокином CCL21 (индуцированная миграция). Вакцина БЦЖ также оказывала выраженное стимулирующее действие на экспрессию гена *ccr7* и синтез соотв. белка внутри ДК (табл.). В то же время, не все клетки, синтезировавшие CCR, экспрессировали его на мембране. Кроме того, ДК, зараженные БЦЖ, снижали свою спонтанную подвижность и слабее, чем контрольные зрелые ДК отвечали миграцией на хемокин CCL21.

Таблица

Экспрессия и функция CCR7 на ДК, стимулированных вакцинами

Тип клеток	Экспрессия мРНК *ccr7* (нормализация по нДК)	Экспрессия белка (% $CCR7^+$ ДК)		Миграция	
		внутри клеток	на мембране	спонтанная	индуцированная
нДК (-К)	1±0,5	10,6±4,8	9,6±1,6	23,2±16,8	23,3±11,4
Зрелые ДК (+К)	23,8±6,7*	30,3±10,7*	29,5±4,8*	47,5±28,7	397,3±144*
ДК с БЦЖ	16,8±4,8*	21,3±6,6*	14,8±3,0*	9,7±3,1	165,5±92,3
ДК с ВПГВ	5,4±1,8*	Н.О.	27,5±5,8*	11,0±2,4	64,8±30,0*

* различия с уровнем нДК статистически достоверны при $p<0,05$ в парном т-тесте.

ВПГВ относительно слабо, но достоверно стимулировала экспрессию гена *ccr7*, однако это приводило к значительному росту количества клеток, несущих CCR7 на поверхности (табл.). При оценке миграционных свойств ДК, поглотивших ВПГВ, также отмечалась тенденция к угнетению спонтанной подвижности клеток, и был зарегистрирован небольшой, но статистически достоверный рост индуцированной хемокином миграции.

Таким образом, показано, что стимуляция ДК вакциной БЦЖ и рекомбинантной вакциной против гепатита В индуцирует усиление экспрессии гена *ccr7* и его белкового продукта в цитоплазме и на поверхности клеток. В то же время, выявлены определенные препятствия в использовании хемокинового рецептора стимулированными ДК. Так, часть ДК, стимулированных вакциной БЦЖ, продуцирует CCR7, но не экспрессирует его на поверхности клеток. Кроме того, поглотившие вакцины клетки снижают свою спонтанную подвижность. В результате ответ этих клеток на хемокин CCL21 оказывается менее эффективным, чем у зрелых ДК, стимулированных смесью медиаторов воспаления. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности поиска новых адъювантных компонентов вакцин, которые будут направленно стимулировать миграционные свойства ДК, увеличивая трафик вакцинных АГ и эффективность иммунного ответа.

Литература:

1. Steinman R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu. Rev. Immunol. 1991; 9: 271–296.

2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

3. Alvarez D., Vollmann E.H., von Andrian U. H. Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. Immunity. 2008; 29(3): 325.

4. Johnson L.A., Jackson D.G. Cell Traffic and the Lymphatic Endothelium. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008; 1131: 119–133.

5. Cyster J.G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. J. Exp. Med. 1999; 189: 447–450.

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛОВУШЕК В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

В 2004 году группой немецких ученых из института инфекционной биологии имени Макса Планка (Brinkmann V. et al., 2004) был открыт новый механизм киллинга бактерий, более эффективный, чем фагоцитоз (McDonald B. et al., 2012). Было доказано, что активированные нейтрофилы формируют во внеклеточном пространстве ловушки, состоящие из ядерного хроматина

(ДНК, гистонов) и содержимого лизосомальных гранул, которые захватывают и убивают патогенные бактерии в условиях полного фармакологического подавления фагоцитарной реакции. В настоящее время установлена важная роль внеклеточных нейтрофильных ловушек (ВНЛ) в патогенезе бактериальных, вирусных, паразитарных, аутоиммунных заболеваний (Кравцов А.Л. 2012; Коротина О.Л. с соавт. 2012).

Для визуализации ВНЛ применяют методы люминесцентной и электронной микроскопии, при этом предлагают использовать нейтрофилы, выделенные из периферической крови (Долгушин И.И. с соавт. 2009; Hosseinzadeh A. et al., 2012). Однако, стимуляция нейтрофилов и формирование ловушек происходит посредством активации тромбоцитов через TLR-4 типа (Clark S.R. et al., 2007; McDonald B. et al., 2012). При попытках обнаружения внеклеточных ловушек нейтрофилов в цельной (гепаринизированной) крови отдельные исследователи высказывают предположение, что нейтрофилы цельной крови не образуют ловушек (Савочкина А.Ю., 2012). Действительно, согласно данным Fuchs T.A. et al. (2010), гепарин способствует инактивации тромбоцитов, играющих, как упоминалось выше, роль активаторов процесса образования ловушек и вымыванию гистонов из ядерного хроматина – строительных элементов «сети» ловушек.

Учитывая все перечисленное, мы планировали не проводить травмирующие нейтрофилы этапы выделения, отмывания, а исследовать клетки в естественном для них окружении, не нарушая сложные межклеточные взаимодействия в крови. В качестве альтернативы гепаринизированной крови предполагалось использовать дефибринированную кровь.

Цель работы – оценить возможность обнаружения в дефибринированной крови человека внеклеточных нейтрофильных ловушек.

В качестве индуктора стимуляции нейтрофилов применяли стандартный препарат липополисахарида *Escherichia coli* (Sigma, США). ЛПС добавляли в дефибринированную кровь человека *in vitro* и инкубировали в течение 4-х часов при температуре 37°С. В контрольные образцы вместо ЛПС добавляли физиологический раствор в том же объеме.

Для визуального обнаружения нейтрофильных ловушек использовали метод люминесцентной микроскопии. Клетки крови суправитально окрашивали раствором флуорохрома — акридинового оранжевого (АО). Высушенные мазки просматривали под люминесцентным микроскопом Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия) с видеокамерой AxioCam Erc 5s под иммерсией при увеличении х1000.

Для косвенного подтверждения роли тромбоцитов в инициации процесса образования ловушек по их наличию в дефибринированной крови, используемой в исследовании, из крови делали мазки на предметном стекле (неразведенная дефибринированная кровь и в разведениях с физиологическим раствором 1:50; 1:100; 1:200), фиксировали спиртом и окрашивали по Романовскому-Гимзе с дальнейшем просмотром мазков под микроскопом Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия) в светлом поле под увеличением х400.

По результатам наших исследований в мазках крови человека бактерицидные гранулы нейтрофилов окрашиваются в красный цвет, хроматин – в зеленый. Хорошо заметные сетеподобные структуры из зеленых нитей хроматина с вкраплениями красно-желтых «пятен» ферментов бактерицидных гранул стали хорошо заметны через 1, 3 и 4 ч наблюдения (рисунок).

Необходимо отметить, что в некоторых случаях активированные нейтрофилы образовывали группы. Экспериментально доказано, что на нитях ДНК нейтрофильных ловушек происходит адсорбция тромбоцитов и эритроцитов, что ведет к образованию тромбов. Формирование ловушек, таким образом, рассматривается в настоящее время как ранее неизвестное звено между инфекцией, воспалением и тромбозом (Fuchs T.A. et al., 2010).

В контрольных образцах крови подобных образований не наблюдали.

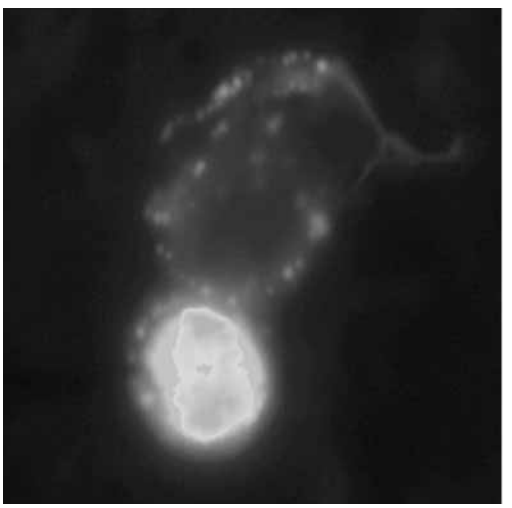


Рисунок. Внеклеточная ловушка нейтрофила крови человека с использованием люминесцентной микроскопии под воздействием липополисахарида кишечной палочки (суправитальное окрашивание клеток крови человека флуорохромом акридиновым оранжевым, х 1000).

Просмотр мазков крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе подтвердил наличие тромбоцитов в дефибринированной крови. При этом соотношение 1 тромбоцит на 15-20 эритроцитов, принятое за норму (Лаб. методы исслед. в клинике, 1987), сохранялось.

Таким образом, в дефибринированной крови человека под действием ЛПС *E. coli* происходит формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек, которые можно обнаружить путем суправитального окрашивания клеток крови акридиновым оранжевым с последующим просмотром мазков под люминесцентным микроскопом.

Литература:

1. Долгушин И.И., Андреева Ю.С. Способ обнаружения нейтрофильных ловушек. Патент 2384844 РФ, опубл. 20.03.2010 г.

2. Коротина О.Л., Генералов И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 4. – С. 23–32.

3. Кравцов А.Л. Формирование внеклеточных ловушек – эффективный механизм защиты организма от патогенна // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – № 112. – С. 69–74.

4. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. Под ред. В.В. Меньшикова, 1987.

5. Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, методы обнаружения, биологическая роль. – Автореф. дис. докт. мед. наук. – Челябинск. 2012. – 33 с.

6. Brinkmann V., Reichard U., Gosemann C. et al. Neutrophil extracellullar traps kill bacteria // Science – 2004 – V.303. – P. 1532–1535.

7. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood // Nat. Med. – 2007. – V. 13. – P. 463–469.

8. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis // Proc. Nat. Acad. Scien. – 2010. – V.107. – P. 15880–15885.

9. Hosseinzadeh A., Messer P.K., Urban C.F. Stable Redox-Cycling Nitroxide Tempol Inhibits NET Formation // Front Immunol. - 2012. – V.3. – P.391.

10. McDonald B., Urrutia R., Yipp B.G. et al. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis // Cell Host Microbe. – 2012. – 12(3). – P. 324–333.

ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОЙ ФЛОУРЕСЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПРОТИВЭПИТОПОВ ГЛИКОПРОТЕИНА И КАПСУЛЫ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

Храпова Н.П., Замарина Т.В, Агеева Н.П., Молчанова Е.В., Прохватилова Е.В., Корсакова И.И., Пименова Е.В., Ким Е.Э.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград

e-mail:vari2@sprint-v.com.ru

В общей схеме лабораторного анализа проб клинического материала и из объектов внешней среды иммунодиагностическому тестированию отводится важная роль, особенно в первые часы от момента их поступления на исследование. При этом полнота воспроизведения схемы индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций, в том числе возбудителей сапа и мелиоидоза, зависит от обеспеченности каждой конкретной лаборатории соответствующими препаратами и тест-системами для их обнаружения. Методам лабораторной диагностики, направленным на выявление *B. pseudomallei* и *B. mallei*, посвящены разделы практических руководств [1,2] и нормативные документы [3,4].

Одним из наиболее востребованных регламентированных иммунодиагностических методов экспресс-обнаружения микроорганизмов в различных объектах исследования является метод флуоресцирующих антител

(МФА). Для его применения в работе специализированных лабораторий предназначены два препарата, изготавливаемых на основе МКА к антигенам поверхностных структур патогенных буркхольдерий: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные (№ ФСР 2011/11615) и иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные (№ ФСР 2011/11614), позволяющие дифференцировать два близких в антигенном отношении вида буркхольдерий. При этом в случаях использования в работе препарата «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные» необходимо помнить о том, что он обладает кросс-реактивностью в отношении *B.thailandensis,* близкородственной буркхольдерии III группы патогенности.

В последние годы в рамках совершенствования средств индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза получило развитие направление по созданию высокоэффективных диагностических препаратов, в том числе и для МФА, лишенных перекрестной активности в отношении *B.thailandensis,* базирующееся на экспериментальных доказательствах того, что гликопротеин капсулы с м.м. 200 *kDa* – характерный признак вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза. В настоящее время общепринято, что авирулентные Ara^+ *B. pseudomallei* изоляты из внешней среды отличаются от вирулентных Ara^- клинических изолятов и Ara^- изолятов из внешней среды способностью ассимилировать L-арабинозу и отсутствием на их поверхности 200 kDa антигена [5]. Актуальным является создание новых МИБП на основе высокоаффинных моноклональных антител к «идеальной мишени» на поверхности искомого патогена – своеобразного маркера видовой принадлежности *B. pseudomallei*.

Ранее нами были опубликованы сведения о создании коллекция гибридом-продуцентов МКА к гликопротеину капсулы 200 kDa *B. pseudomallei*, в состав которой вошли десять вариантов перевиваемых клеточных линий [6].

Целью настоящей работы явилось изучение свойств панели моноклональных иммуноглобулинов к различным эпитопам антигена 200 kDa, меченных флуорохромом, в МФА антител при работе с чистыми культурами коллекционных штаммов буркхольдерий II и III-IV групп патогенности.

Материалы и методы.

Микроорганизмы. В работе использовали штаммы буркхольдерий II (*B. pseudomallei* – 49 штаммов, *B. mallei* – 10 штаммов) и III-IV (*B. thailandensis – 5* штаммов*, B. cepacia* – 5 штаммов, *B. gladioli – 3* штамма) групп патогенности, полученные из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Буркхольдерии выращивали на агаре, приготовленном на основе гидролизата казеина, с 5% глицерина (ГКА), pH 6,8, при 37°С в течение 48 ч. Работу с вышеназванными бактериями выполняли в соответствии с положениями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2518-09 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» Дополнения и изменения N 1 к СП 1.3.2322-08».

Перевиваемые клеточные линии. Штаммы гибридом-продуцентов МКА против эпитопов гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei* служили источником получения целевого продукта. Все манипуляции с гибридными клетками выполняли в соответствии со стандартным протоколом [7]. Основной средой культивирования гибридных клеток служила питательная среда RPMI-1640 с необходимыми ингредиентами и 15% ЭТС. Накопление препаративных количеств МКА проводили *in vivo.*

Моноклональные иммуноглобулины из асцитической жидкости осаждали сульфатом аммония при 50 % его насыщения [7]. В образцах иммуноглобулинов, освобожденных от сульфата аммония, содержание белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Специфическую активность антител оценивали по результатам ТИФМ и непрямого МФА. Для определения аффинности МКА использовали методику Beatty J.D.[8].

Метку моноклональных иммуноглобулинов флуоресцеинизотиоцианатом, очистку конъюгата ФИТЦ-белок выполняли по методике [7]. Готовые конъюгаты характеризовали по параметрам качества, затем ампулировали и хранили при – 20°С. Свойства экспериментальных иммуноглобулинов флуоресцирующих оценивали по результатам окрашивания м.к. при просмотре фиксированных и обеззараженных мазков-препаратов культур коллекционных штаммов буркхольдерий. Препаратом сравнения в этих исследованиях являлись «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные».

Результаты и обсуждение.

Для изготовления экспериментальных образцов препаратов для МФА были отобраны семь вариантов МКА различной эпитопной направленности, которые по результатам НМФА характеризовались высокими показателями удельной активности в отношении *B. pseudomallei 100.* Эти данные свидетельствовали о высокой плотности эпитопов, экспрессированных на поверхности *B. pseudomallei 100,* гомологичных каждому из вариантов МКА. Вторым критерием отбора служила аффинность антител, значения которой для различных вариантов МКА колебались в диапазоне от $9 \cdot 10^5$ до $8 \cdot 10^7$ M^{-1}. Рабочие разведения экспериментальных препаратов были равны 1:8 – 1:16.

Таблица

Определение спектра специфической активности и специфичности экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных

Виды микроорганизмов	Кол-во исследованных шт.	Количество штаммов буркхольдерий, выявленных в МФА при использовании различных образцов МКА, меченных флуорохромом (абсолютные показатели)							
		$1F_4$*	$3C_6$	$5C_2$	$5C_9$	$5H_{11}$	$6A_{11}$	$6B_7$	$6E_7$
B. pseudomallei	49	37	25	24	18	23	26	12	19

B. mallei	10	–	5	1	7	2	10	4	4
B. thailandensis	5	5	–	1	–	–	–	–	1
B. cepacia	5	–	–	1	2	–	–	2	4
B. gladioli	3	–	–	–	–	–	–	–	1
Примечания: * – препарат сравнения; « – » – отрицательный результат МФА									

В таблице суммированы данные о результатах проверки экспериментальных препаратов, отражающие индивидуальные спектры специфической активности и специфичности МКА в отношении буркхольдерий различных видов: получены их основные характеристики.

Показатели активности препарата сравнения ($1F_4$*) соответствовали его паспортным данным: специфическое окрашивание клеток не менее, чем 75-80% музейных штаммов *B. pseudomallei* и перекрестная активность в отношении

B. thailandensis. Активность экспериментальных препаратов, приготовленных на основе МКА против антигена 200 kDa, в отношении *B. pseudomallei* оказалась ниже этого уровня (50% и менее).

Отличительной особенностью этой группы препаратов, направленных на выявление различных эпитопов, экспонированных на антигене капсулы, является способность узнавать представителей капсулообразующих буркхольдерий, к которым, по данным электронной микроскопии [9], отнесены *B. pseudomallei, B. mallei* и *B. cepacia.* Выявленный факт перекрестной активности препаратов $5C_2$ и $6E_7$ в отношении типового штамма *B. thailandensis* 264 является основанием для последующего изучения влияния условий культивирования буркхольдерий на экспрессию эпитопов, узнаваемых вышеназванными МКА, плотность этих эпитопов на поверхности бактериальных клеток в зависимости от сроков их культивирования *in vitro* и после пассажа через организм восприимчивых биопробных животных. В целом, получены данные, представляющие интерес как для анализа спектра поверхностно локализованных антигенов патогенных и непатогенных буркхольдерий, так и для использования в качестве дополнительных средств их идентификации.

Литература:

1. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство / Под ред. Г. Г. Онищенко. – М., 2006. – 288с.

2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с., гл. «Мелиоидоз», с. 231–254.

3. МУ 4.2.2787-10. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика мелиоидоза. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 06.12.2010). – 2011. – 32 с.

4. МУ 4.2.2831-11. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика сапа. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 14.01.2011).- 2011.- 24 с.

5. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lipopolysaccaride and 200-kDa suface antigen during the in vitro growth of virulent Ara^{-} and avirulent Ara^{+} *Burkholderia pseudomallei*. Acta tropica. 2000; 74: 221-8.

6. Получение моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* и перспективы их применения для совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза / Храпова Н. П., Пивень Н.Н., Корсакова И.И. и др.// Матер.IX Межгос. науч.-практ. конф. – Волгоград, 2008. – С. 147–148.

7. Goding J.W. Monoclonal antibodies: principles and practice// Acad. Press.– 1986, 315 p.

8. Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. J Immunol Meth. 1987;100:173–9

9. Попов С.Ф., Пивень Н.Н., Викторов Д.В., Курилов В.Я. Капсулообразование у патогенных бактерий рода *Burkholderia //* Матер.науч.-практ. конф. – Саратов, 16-18 сентября 1997 г. – Т. 2. – С. 105–106.

ОПЫТ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

Матвеичев А.В. [1], Плеханова М.В. [1], Талаев В.Ю. [1], Цыганова М.И. [1], Кузнецов К.В. [2], Коршунова Е.А. [2], Никитина З.И. [1], Мохонова Е.В. [1], Коптелова В.Н. [1], Павлова Н.П. [3]

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

[2] ГБУЗ Нижегородской области «Нижегородский областной центр крови им. Н.Я. Климовой», Нижний Новгород

[3] ФГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского»

aleksei_matveichev@list.ru

Значение вакцинации как средства профилактики инфекционных заболеваний невозможно переоценить – с помощью масштабных вакцинационных программ ликвидирована циркуляция вируса натуральной оспы, на грани ликвидации находится циркуляцияция полиовируса, ведутся работы по борьбе с многими другими тяжелыми, социально значимыми инфекциями. В то же время, будучи весьма мощным индуктором адаптивных иммунных реакций, вакцинные препараты несут потенциальный риск вызова у реципиента опасных, патологических форм ответа, прежде всего анафилактических реакций и срывы толерантности к собственным антигенам, развития аутоиммунной патологии. Оценка вероятности этого риска и его связи с индивидуальными вакцинами является весьма актуальной, но остродискуссионной задачей. Так, после

проведения массовых кампаний по вакцинации против гепатита В в Европе и странах Северной Америки рядом исследователей были опубликованы работы, описывающие повышение риска развития аутоиммунных патологий после проведения массовых вакцинационных кампаний [1, 2, 3] и данные с противоположной точкой зрения [4, 5]. Таким образом, единой точки зрения по вопросу в данный момент не выработано, также отсутствуют критерии оценки возможного риска развития связанных с вакцинацией аутоиммунных патологий у здоровых лиц. Учитывая сложившуюся ситуацию, различия в применяемых разными странами вакцинных препаратах, а также известные различия в генетических особенностях различных человеческих популяций, нами было принято решение оценить безопасность применения профилактических вакцин, используемых в Российской Федерации, с позиций возможности индукции аутоиммунных заболеваний, а также их эффективность. В данной работе нами приведен опыт оценки указанных параметров для вакцины «Регевак В».

Материалы и методы

Объектом исследования служила сыворотка крови и цельная кровь лиц, подлежащих вакцинации, либо ревакцинации вакциной «Регевак В» (n=14, группа медицинских работников). В сыворотке крови данных лиц до вакцинации и через 1 месяц после введения 1 дозы вакцины оценивали содержание гуморальных факторов аутоиммунитета: аутоантител к двухцепочечной ДНК (анти-ДНК), к кардиолипину (анти-КЛ), антител к тиреоглобулину – с помощью экспериментальных иммуноферментных тест-систем, ревматоидного фактора (РФ) – радиальной иммунодиффузией, высоко- и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – турбидиметрически. Эффективность применения вакцины оценивалась по изменению содержания в сыворотке вакцинированных лиц антител к HBsAg. Также была проведена оценка содержания в периферической крови вакцинированных FoxP3+ Т-регуляторных клеток, и способности клеток мононуклеарной фракции к продукции ИЛ-17, одного из известных медиаторов аутоагрессивных форм иммунных реакций. Оценка содержания Т-регуляторных клеток производилась цитофлюорометрически, оценка ИЛ-17 продукции – путем краткосрочного (5-6 часов) культивирования продуцентов с поликлональными активаторами – форбол-12-миристат-13-ацетатом и иономицином и последующего измерения концентраций ИЛ-17 иммуноферментным анализом.

Результаты и обсуждение

На момент включения в исследование ни один из представителей группы вакцинированных лиц не имел содержания антител к HBsAg, достаточного для защиты от инфицирования вирусом – 10 МЕ/мл. Однако, после введения уже 1 дозы вакцины 6 из 14 вакцинированных лиц ответили на вакцину развитием сероконверсии. Значения концентрации антител находились в пределах от 77 до 171 МЕ/мл, превышая минимально проективную концентрацию не менее чем в 7 раз.

Основным лабораторным критерием, подтверждающим наличие аутоиммунного процесса, является изменение содержания растворимых факторов

аутоиммунитета. В сыворотке лиц-участников экспериментальной группы нами исходно были обнаружены повышенные концентрации содержания всех исследуемых факторов. Спустя же месяц после вакцинации было установлено, что содержание анти-ДНК-IgM и анти-КЛ-IgG достоверно снизилось и опустилось к уровню, считаемому лабораторией как уровень нормы. Так, индекс содержания (отношение оптической плотности лунок с экспериментальными образцами к оптической плотности лунок контроля – среднего значения оптической плотности, рассчитанного для 100 клинически здоровых доноров) анти-ДНК-IgM снизился с 2.1±0,2 до 1,86±0,14, индекс анти-КЛ-IgG – с 2,05±0,1 до 1,61±0,12. Изменения в содержании ЦИК и ревматоидного фактора обнаружено не было. Также не было обнаружено изменений в концентрации антител к тиреоглобулину – данный маркер был выбрано нами в качестве модели оценки редких, нехарактерных аутоиммунных сдвигов, связываемых с вакцинацией (ситуация развития аутоиммунного сдвига, при котором отсутствует химическое или стерическое сходство между введенным антигеном и мишенью последующего аутоиммунного ответа), что описывалось рядом коллективов для людей и животных [6, 7].

Безопасный баланс между индукцией и регуляцией иммунного ответа в организме поддерживают несколько популяций клеток – в частности, Т-регуляторные клетки и гетерогенная группа продуцентов провоспалительного цитокина ИЛ-17. Несомненным является факт их участия в развитии не только естественно протекающих ответов, но и ответов на вакцины, поэтому мы посчитали необходимым, не ограничиваясь только серологическими исследованиями, оценить изменение численности и функции вышеуказанных популяций.

Введение вакцины против гепатита В не влияло на способность клеток мононуклеарной фракции продуцировать ИЛ-17, однако оказывало существенное влияние на содержание Т-регуляторных клеток – процент CD4+ лимфоцитов, коэкспрессирующих CD25 и FoxP3, повышался с 7,8±1,67% до, 12,85±1, 12%, $p<0.01$. Таким образом, полученные данные позволяют оценить вакцинацию против гепатита В, в частности, проведенную с применением «Регевак В», как эффективную и безопасную. В то же время, мы считаем, что в данном направлении требуется проведение исследования, включающих более крупные и разнообразные экспериментальные группы.

Литература:

1. Touze E., Gout O., Verdier-Taillefer M.H., et al. The first episode of central nervous system demyelinization and hepatitis B vaccination. Rev. Neurol., 2000, v. 156, p. 242–246.

2. Girard M. Autoimmune hazards of hepatitis B vaccine. Autoimmun. Rev., 2005, v. 4, p. 96–100.

3. Geier D.A., Geier M.R. A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization. Autoimmunity, 2005, v. 38 (4), p. 295–301.

4. Sadovnick A.D., Scheifele D.W. School-based hepatitis B vaccination programme and adolescent multiple sclerosis. Lancet, 2000, v. 355, p. 549–550.

5. Stratton K., Almario D.A., McCormick M.C., Editors. Immunization Safety Review: Hepatitis B vaccine and demyelinating neurological disorders (Free Executive Summary), 2002, доступно на http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=10393&page=1

6. Hernán Martinez J., Corder E., Uzcategui M., et al. Subacute thyroiditis and dyserythropoesis after influenza vaccination suggesting immune dysregulation. Bol. Asoc. Med. P. R., 2011, v. 103(2), p. 48–52.

7. Scott–Moncrieff J.C., Azcona–Olivera J., Glickman N.W., et al. Evaluation of antithyroglobulin antibodies after routine vaccination in pet and research dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 2002, v. 221(4), p. 515–521.

ВЛИЯНИЕ РИБОСОМАЛЬНЫХ БЕЛКОВ БАКТЕРИЙ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ

Руднева Е.И., Маянский А.Н.

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», МЗ РФ

katya_rudneva@mail.ru

Нейтрофилы являются самой многочисленной популяцией лейкоцитов крови, которые принимают активное участие в пиогенных воспалительных реакциях, защищая организм от разнообраных повреждающих факторов. Нейтрофилы – коротко живущие зрелые клетки. Активируясь в воспалительных реакциях, нейтрофилы продлевают свое существование, внося значительный вклад в развитие воспалительного процесса (2, 3).

Зрелые нейтрофилы располагают огромным количеством рецепторов, что позволяет им реагировать на многие факторы, проникающие извне или появляющиеся во внутренней среде организма. Сюда относятся рецепторы для различных цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, рецепторы для производных С3-фактора комплемента и Fcγ-фрагмента иммуноглобулина IgG, мембранные и внутриклеточные TLR и NOD рецепторы, воспринимающие сигналы врожденного иммунитета и т.д. (5). Это делает нейтрофил высоко адаптивной клеткой, участвующей во многих реакциях, развивающихся при воспалении.

Нейтрофилы принадлежат к клеткам с выраженным эффекторным потенциалом, который включает в себя адгезивные молекулы (интегрины, селектины), позволяющие нейтрофилам быстро прикрепиться к эндотелиальным клеткам и проникать сквозь них в тканевое пространство; способность к направленному движению (хемотаксису) в очаги зарождающегося воспаления; цитотоксичность; склонность к праймированию, т.е. к подготовительным реакциям, которые развиваются внешне незаметно, но, тем не менее, имеют большое значение для нейтрофильных эффектов (3). Цитотоксическая

активность нейтрофилов опосредована протеолитическими ферментами гранул и активными формами кислорода (АФК). АФК продуцируются во время респираторного взрыва, который инициируется активацией NADPH-оксидазы (1).

Вышесказанное послужило основанием для изучения влияния рибосомальных бактериальных белков, входящих в состав препарата «Рибомунил», на нейтрофилы крови человека.

Материалы и методы

Рибомунил (Pierre Fabre, Франция) взвешивали в растворе Хенкса без индикатора (ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН», Россия) из расчета 0,15 мг/мл, растворяли ультразвуком 2 мин. при частоте 22 кГц.

Взаимоотношения рибомунила с нейтрофилами цельной крови здоровых доноров (n=10) изучали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) (Виксман, Маянский). Кровь у пациентов забирали утром натощак из локтевой вены в пробирку с гепарином (конечная концентрация гепарина – 10 ед./мл). К гепаринизированной крови добавляли стимулятор и нитросиний тетразолий (Sigma, США). Негативным контролем служила кровь, в которую вместо рибомунила вносили 0,1 М изотонический фосфатный буфер (pH=7,2). Позитивными контролями были тесты с внесением взвеси грамотрицательных бактерий *Serratia marcescens* (2×10^9 клеток/мл) и неоспонизированного зимозана (10 мг/мл) (Sigma, США). Проводили инкубацию в течение 30 мин при 37°С, готовили мазки, фиксировали смесью спирт-формалин, окрашивали 2% метиловым зеленым. В мазках подсчитывали процент нейтрофилов с восстановленными гранулами нитросинего тетразолия. В ряде опытов для изучения влияния на НСТ-тест классического и альтернативного каскада комплемента использовали 0,01 М ЭДТА либо 0,01 М ЭГТА-$MgCl_2$.

Полученные данные были обработаны с помощью пакета программ Statistica 6.1 и представлены в виде M±m. Для оценки статистической значимости различий использовался U-критерий Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

В изученной группе здоровых доноров выявлено стимулирующее действие рибомунила на нейтрофилы крови (51,00±2,08% против 10,20±1,74% в контроле, p=0,000150) (табл.1). НСТ-тест с рибомунилом был полностью опосредован гуморальными факторами, к которым, относились два каскада комплемента – классический и альтернативный. Об этом говорило то, что ЭДТА и ЭГТА вызывали примерно одинаковое подавление НСТ-теста в реакциях с рибомунилом. Антитела к рибомунилу не имели решающего значения для активации классического пути, поскольку доноры, имели широкий разброс показателей антител к рибомунилу (титр составлял от 0 до 1:1600, 25-75% – 20-160) (4). Полученные данные говорят о том, что рибомунил принадлежит к сравнительно редким препаратам, которые способны напрямую взаимодействовать с первым фактором комплемента без дополнительных антител (2). В то же время рибомунил содержит компоненты, активирующие

комплемент по альтернативному пути, о чем свидетельствовало ЭДТА-подавление НСТ-теста.

Подавление рибомунильного НСТ-теста с использованием ЭГТА отличало его от позитивного контроля с неопсонизированным зимозаном, который сохранял остаточный эффект в присутствии ингибитора классического пути активации комплемента (5,5±1,59% против 22,25±4,59%, p=0,009598). Таким образом, рибомунил может использоваться как один из стимуляторов НСТ-теста.

Таблица 1

Влияние стимуляторов на фагоцитарную активность нейтрофилов крови (НСТ-тест)

Стимулятор	**M±m (%)**	**Медиана (%)**	**25% - 75% (%)**
Спонтанная реакция	10,20±1,74	8,5	7,0-10,0
S. marcescens	55,13±4,71	50,0	48,0-61,0
S. marcescens+ЭДТА	4,75±1,93	4,0	2,0-7,5
S. marcescens+ЭГТА+$MgCl_2$	2,50±1,85	1,0	0,5-4,5
Рибомунил	51,00±2,08	48,5	46-55
Рибомунил+ЭДТА	7,00±2,49	5,0	4,0-7,0
Рибомунил+ЭГТА+$MgCl_2$	5,5±1,59	4,0	4,0-6,0
Зимозан	66,5±3,57	64,5	61,0-72,0
Зимозан+ЭДТА	6,75±1,03	7,0	5,5-8,0
Зимозан+ЭГТА+$MgCl_2$	22,25±4,59	20,5	15-29,5

Следует также заметить, что рибомунил рекомендован как один из иммуномодуляторов, действие которых направлено на усиление воспалительной противомикробной защиты. Это означает, что активацию респираторного взрыва нейтрофилов, которую можно рассматривать как провоспалительный эффект, является позитивным результатом, что следует учитывать при оценке антимикробной активности рибомунила.

В целом, наши опыты говорят о том, что рибосомальные белки респираторных бактерий, входящих в состав иммуномодулирующего препарата «рибомунил», способны напрямую реагировать с классическим и альтернативным путями комплемента, оказывая опосредованное стимулирующее действие на респираторный взрыв нейтрофилов, подобное эффекту стандартных нейтрофильных раздражителей, *S. marcescens* и зимозана.

Литература:

1. Babior B.M. The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. Antioxid. Redox Signal, 4 (1). 2002. P. 35–8.

2. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. 1989. 341 с.

3. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф. 1993. 192с.

4. Руднева Е.И., Маянская И.В., Блинова Т.А., Маянский А.Н. Антитела к рибосомальным белкам респираторных бактерий в сыворотке крови у здоровых доноров и детей с различными хроническими заболеваниями. Иммунология, 5. 2012. С. 260–263.

5. Черношей Д.А., Кирильчик Е.Ю., Канашкова Т.А. Распознавание в системе врожденного иммунитета. Минск: БГМУ. 2009. 68 с.

РАЗДЕЛ 5.
ОБЩАЯ И ПОПУЛЯЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ БИОСИСТЕМ. ПРОБИОТИКИ И ЗДОРОВЬЕ

ОЦЕНКА СИНДРОМА ИЗБЫТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО РОСТА В ТОНКОЙ КИШКЕ У БОЛЬНЫХ С ХЕЛИКОБАКТЕР-АССОЦИИРОВАННОЙ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Перфилова К.М., Денисенко Т.Л., Неумоина Н.В., Неумоина М.В., Шутова И.В., Ефимова Е.И., Ларионова Т.В., Трошина Т.А.

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

micro@sinn.ru

Введение.

Важным клиническим аспектом проблемы хеликобактерной инфекции и лекарственного сопровождения проводимой при этом эрадикационной терапии является состояние микробиоценоза кишечника и, в частности, наличие синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) в тонкой кишке. Заселение тонкой кишки облигатными представителями микробиоты толстой кишки, может вызывать нарушение барьерной функции слизистой оболочки тонкой кишки и целый каскад морфофункциональных нарушений [1, 2, 3, 4, 5].

Цель исследования: анализ частоты встречаемости, характера и степени выраженности нарушений микробиоценоза верхних отделов тонкого кишечника при H.pylori–ассоциированной гастродуоденальной патологии.

Материалы и методы.

Обследовано 234 пациента с хроническими хеликобактер-ассоциированными заболеваниями: язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки, гастродуоденитом, сопутствующим обострению хронического холецистита, хронического панкреатита. Для бактериологического исследования пристеночное содержимое дистальных отделов 12-перстной кишки (аспират) забирали во время проведения ЭГДС в стерильные одноразовые «ловушки» с помощью отсоса. Материал засевали в тот же день количественным методом на плотные питательные среды – среду Эндо, 5% кровяной агар, среду Сабуро, энтерококкагар. В работе была использована бифидумсреда для выявления бифидобактерий и среда МРС-2 – для лактобацилл.

ПЦР–детекция H.pylori в биоптатах и желудочном соке на наличие ДНК H.pylori проводилась с использованием коммерческих ПЦР-тест систем в лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора (зав. лабораторией к.м.н. Н.Ф. Бруснигина).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с применением программы «STATISTICA», версия 6,0 и статистических функций программы Excel по стандартным формулам.

Результаты и обсуждение.

В аспиратах из дистальных отделов 12-перстной кишки был выявлен широкий спектр микроорганизмов в этиологически значимых количествах (от 10^5 и выше) более чем у половины обследованных пациентов (53,8%). Наиболее часто выявлялись бифидобактерии (27,4%), реже – лактобактерии (10,3%), энтерококки (8,6%), стафилококки (8,6%). Представители семейства энтеробактерий, а также стрептококки и грамотрицательные неферментирующие бактерии были выделены в единичных случаях. У 36 больных (28,6% пациентов с СИБР) высевались различные микробные ассоциации.

Известно, что среди основных причин нарушений кишечной микрофлоры важное место занимают заболевания органов пищеварения, сопровождающиеся воспалением и моторно-секреторными расстройствами [1, 6, 7, 8, 9]. Самостоятельным фактором развития СИБР является длительный прием лекарственных препаратов, влияющих на работу пищеварительных желез (в том числе, подавляющих желудочную секрецию), моторику, регенерацию эпителия пищеварительного тракта, а также антибиотиков [10]. Это согласуется с полученными нами данными: более чем у половины (53,8%) больных с хроническими хеликобактер – ассоциированными заболеваниями гастродуоденальной зоны выявлен синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке.

При видовом анализе выявленных микроорганизмов установлено, что в половине случаев (50,8%) СИБР был обусловлен избыточным ростом бифидобактерий; в 23,8% – стафилококков и в 19,1% – лактобацилл. (Рис.).

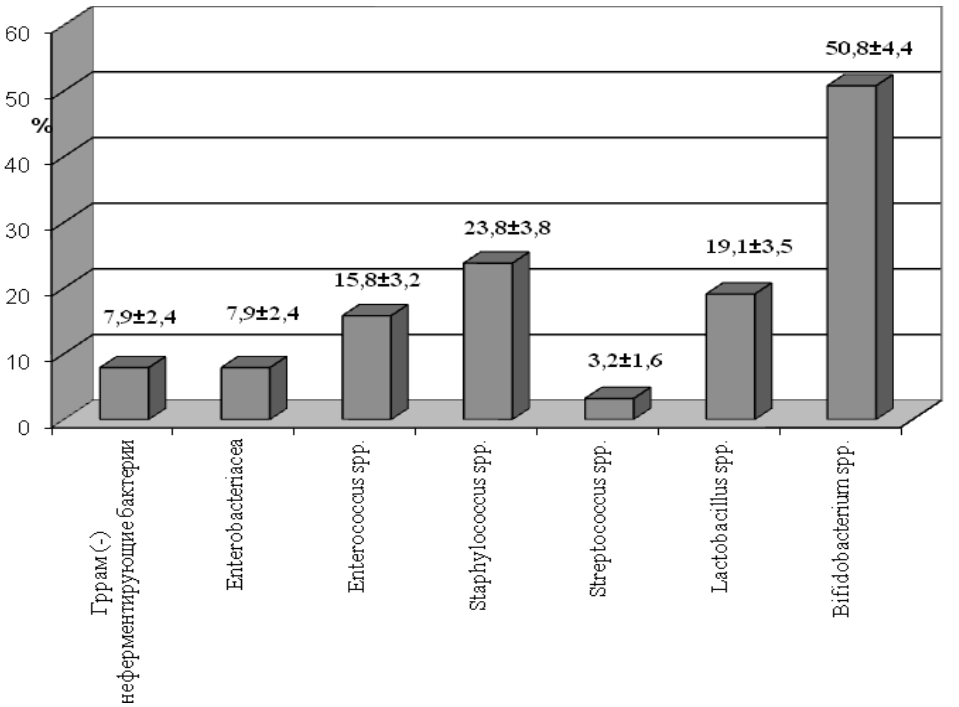


Рисунок. Спектр микроорганизмов, обусловливающих СИБР у больных Н. pylori-ассоциированной гастродуоденальной патологией (n=126)

Другие микроорганизмы были причиной СИБР реже (Enterococcus spp. – 15,8%; Enterobacter – 7,9%; грамотрицательные неферментирующие бактерии – 7,9%). Стрептококки были обнаружены у единичных больных (3,2%) с СИБР. Преобладание бифидобактерий и значительный удельный вес лактофлоры в структуре СИБР обусловлен транслокацией облигатной микрофлоры толстой кишки, что может быть следствием нарушений моторной функции желудочно-кишечного тракта, расстройством и дискоординацией секреторных процессов, изменениями внутренней среды кишечника у больных с хеликобактерной инфекцией.

Сопоставление картины микробиоты тонкой кишки с эндоскопическим диагнозом пациентов позволило выявить следующие особенности (Табл.).

Таблица.

Сопоставление нарушений микробиоценоза тонкой кишки
и эндоскопической картины

Эндоскопический диагноз	n	Частота выявления (абс.ч./%) микроорганизмов в клинически значимом титре ($\geq 10^5$ КОЕ/мл)													
		Bifidobacterium spp.		Lactobacillus spp.		Strepto-coccus spp.		Staphylo-coccus spp.		Enterococ-cus spp.		Enterobacteriaceae		Грам(-) неферментирующие бактерии	
		абс. ч	%	абс.ч	%	абс.ч	%	абс.ч	%	абс.ч	%	абс.ч	%	абс.ч	%
Гастрит антрума без признаков атрофии	76	48	63,2 ±5.5	18	23,7 ±4.8	0	-	17	22,4 ±4.7	9	11,8 ±3.7	3	3,9 ±2.2	4	5,3 ±2.5
Гастрит антрума с признаками атрофии	32	8	25,0 ±7.6	5	15,6 ±6.4	3	9,6 ±5.2	9	28,1 ±7.9	6	18,8 ±6.9	2	6,3 ±4.2	2	6,3 ±4.2
Язва желудка, 12-перстной кишки	18	8	44,4 ±11.7	1	5,6 ±5.4	1	5,6 ±5.4	4	22,2 ±9.7	5	27,8 ±10.5	5	27,8 ±10.5	4	22,2 ±9.7
всего	126	64	50,8 ±6.2	24	19,1 ±3.5	4	3,2 ±1.5	30	23,8 ±3.7	20	15,8 ±3.2	10	7,9 ±2.4	10	7,9 ±2.4

При поверхностном антральном гастрите СИБР обусловлен повышенным содержанием бифидобактерий, лактобицилл и стафилококков. При атрофическом гастрите с наибольшей частотой выявлялись стафилококки, бифидобактерии и энтерококки. При язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки СИБР был выражен за счет повышенного содержания бифидобактерий, энтерококков и энтеробактерий. Имеются сообщения об участии лактобацилл, а именно их избыточного роста, в механизмах защиты [11], снижении уровня контаминации хеликобактером слизистой желудка. Этот феномен связан с подавлением молочнокислыми бактериями продукции интерлейкина 8 [12]. Таким образом, преобладание в микробном спектре бифидо- и лактофлоры может быть связано с реализацией защитной функции нормофлоры при хеликобактер-ассоцированных заболеваниях гастродуоденальной зоны.

Выводы:

Бактериологическое исследование аспирата 12-перстной кишки является важным диагностическим методом подтверждения СИБР. Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке подтвержден бактериологически у 53,8% пациентов с хроническими хеликобактер-ассоциированными заболеваниями гастродуоденальной зоны.

Преобладание бифидобактерий в аспиратах из дистальных отделов 12-перстной кишки обусловлено преимущественно транслокацией облигатной микрофлоры толстого кишечника, что, по-видимому, связано с нарушением моторной функции желудочно-кишечного тракта, изменением внутренней среды тонкого кишечника у больных с хеликобактерной инфекцией.

Возможно, увеличение содержания в тонкой кишке представителей нормальной микробиоты кишечника выполняет защитные, адаптационно-компенсаторные функции при воспалительных изменениях гастродуоденальной зоны.

Литература:

1. Ардатская М.Д. Синдром избыточного бактериального роста и нарушение процессов пищеварения и всасывания // Поликлиника. – 2009. – № 2. – С. 69–74.

2. Барышникова Н.В., Фоминых Ю.П., Шебалина М.Н. Функциональная диспепсия, ассоциированная с Helicobacter Pylori и синдромом раздраженного кишечника // Врач. – 2012. – № 10. – С. 16–19.

3. Леонтьева Н.И., Грачева Н.М., Щербаков И.Т. Значение дисбактериоза кишечника в течении хронических заболеваний желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с Helicobacter pylori// Инфекционные болезни. – 2010. – Т. 8. – № 4. – С. 83–85.

4. Цех О.М. Этиологические и клинико-функциональные особенности хронического дуоденита, сопутствующего Helicobacter pylori-ассоциированному хроническому гастриту у детей и взрослых: автореф. дисс. … канд. мед.наук – СПб, 2011. – 24 с.

5. Чернин В.В., Бондаренко В.М., Червинец В.М., Базлов С.Н. Дисбактериоз мукозной микрофлоры эзофагогастродуоденальной зоны. М: МИА, 2011. – 146 с.

6. Авдеев В.Н. Диагностика и лечение синдрома избыточного роста бактерий в тонкой кишке // Врач. – 2010. – № 12. – С. 1–3.

7. Белоусова Е.А. Синдром избыточного бактериального роста тонкой кишки в свете общей концепции о дисбактериозе кишечника. Взгляд на проблему // Фарматека. – 2009. – № 2. – С. 78–82.

8. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. – СПб.: ИнформМед, 2009. – 276 с.

9. Кучерявый Ю.А., Оганесян Т.С. Синдром избыточного бактериального роста // РЖГГК. – 2010. – № 5. – С. 39–44.

10. Kopacova M., Bures J., Cyrany J. et al Small intestinal bacterial overgrowth syndrome // World J. Gastroenterol. – 2010. – June 28. – V. 16 (24). – P. 2978–2990.

11. Козлова Н.Н., Прокопенко В.Д. Иммунный ответ организма на инфекцию Helicobacter pylori // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2007. – № 4. – С. 58–62.

12. Zhou C., Ma F, Deng X. et al. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by Helicobacter pylori lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4 // World J. Gastroenterol. – 2008. – August 28. – V. 14 (32). – P. 5090–5095.

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ РОТОГЛОТКИ И КИШЕЧНИКА У ЧАСТО И ЭПИЗОДИЧЕСКИ БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ

Затевалов А.М. [1], Селькова Е.П. [1], Алешкин А.В. [1], Медведева Е.А. [2], Мескина Е.Р. [2], Феклисова Л.В. [2]

[1] ФБУН « Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

[2] ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирова, Москва

Введение

Комплексная оценка состояния микрофлоры ротоглотки и кишечника у часто и эпизодически болеющих детей (ЧБД и ЭБД) на фоне развития острой внебольничной пневмонии (ОВП) и острого бронхита (ОБ) необходима для адекватной терапии основного заболевания и прогнозирования его исхода.

Цель работы:

Провести комплексную оценку состояния микробиоценозов ротоглотки и кишечника у ЧБД и ЭБД на фоне развития ОВП и ОБ. Изучить особенности взаимодействия метаболизма и состояния микробиоценозов ротоглотки и кишечника на фоне антибиотикотерапии основного заболевания.

Материалы и методы: изучено состояние микробиоценоза кишечника и ротоглотки у 60 пациентов с ОВП и ОБ, а так же у 30 пациентов группы сравнения (условно здоровые дети, не болеющие в данный момент бронхитом или пневмонией). Образцы слюны, мазки с задней стенки глотки и пробы кала пациентов исследовали микробиологическим методом (качественное и количественное определение микрофлоры, определение спектра

чувствительности к антибиотикам и бактериофагам) и методом газо-жидкостной хроматографии (определение содержания летучих жирных кислот), определение иммуноглобулинов в слюне иммуноферментной реакцией.

Результаты:

При бронхите и пневмонии качественный и количественный состав микрофлоры ротоглотки соответствовал нормальному микробному пейзажу, интегральный показатель антибиотикочувствительности так же не отличался для всех подгрупп исследуемых. У всех, изучаемых, пациентов в подгруппах ЭБД не отмечалось повышенной концентрации IgG в слюне. У пациентов ЧБД выявлен повышенный уровень IgG при ОБ у 40%, а с ОВП –14%. Исследование метаболизма микроорганизмов данного биотопа указывало на достоверное увеличение структурного индекса (активность анаэробной микрофлоры) у с ОВП в подгруппе ЧБД и протеолитического индекса в подгруппах ЭБД с ОВП, что свидетельствовало об изменениях в протеолитической анаэробной части микрофлоры ротоглотки при ОВП и о сниженном иммуном ответе у ЭБД.

Микробиологический анализ кала у пациентов с ОБ и ОВП в подгруппах ЭБД и ЧБД также соответствовал принятым нормам. В 100% случаях патогенная и условно-патогенная микрофлора, выделенная у пациентов с ОБ у ЭБД была резистентна к клебсиелезному, колипротейному и стафилококковому бактериофагам, в 67% – к стрептококковому. У ЧБД с ОВП фагорезистентная микрофлора не обнаруживалась за исключением 100% клебсиелезного и 17% стрептококкового бактериофагов. У пациентов с ОБ в подгруппе ЧБД и ОВП в подгруппе ЭБД выявлена 100% фагорезистентность к колипротейному и клебсиелезному бактериофагам, а так же 67 и 75% пациентов из этих же групп были резистентны к стрептококковому бактериофагу, что требует дальнейшего исследования.

В биохимическом анализе микрофлоры кишечника у пациентов всех исследуемых групп отмечалось снижение общего уровня ЛЖК (особенно масляной кислоты), при этом структурный и протеолитический индекс не имели достоверных отличий от нормы.

Проводимая, антибиотикотерапия острых воспалительных состояний респираторного тракта приводит к снижению количественного и качественного состава микрофлоры ротоглотки, что свидетельствует о подавлении роста микрофлоры ротоглотки. В группах наблюдаемых пациентов с ОБ в подгруппе ЭБД выявлено увеличение на 20% пациентов с повышенным IgG, а группа ОВП из подгруппы ЧБД количество пациентов с повышенным IgG возросло вдвое, что может свидетельствовать об увеличении иммунного ответа организма.

У всех детей, вошедших в исследование, не обнаружено изменения количественного и качественного состава микрофлоры, а также показателя интегральной антибиотикочувствительности условно-патогенной микрофлоры кишечника. Выявлено снижение общего уровня ЛЖК, в том числе масляной кислоты, что может свидетельствовать о подавлении нормальной микрофлоры кишечника, снижении ее колонизационной резистентности.

Выводы:

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что в микрофлоре ротоглотки у пациентов с ОВП имеются структурные изменения связанные с увеличением протеолитической активности в анаэробной части. У пациентов ЧБД с острыми респираторными заболеваниями отмечается повышенный уровень IgG. Реакция микрофлоры ротоглотки и кишечника на антибиотикотерапию отличаются по характеру изменений: микрофлора ротоглотки реагирует изменением состава микроорганизмов; Кишечная микрофлора изменяет функциональную метаболическую активность.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Белова И.В. [1], Точилина А.Г. [1], Гелашвили Д.Б. [2], Соловьева И.В. [1], Пожидаева А.С. [3], Жирнов В.А. [1], Иванова Т.П. [1]

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

[2] ФГОУ ВПО «Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского»

[3]Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е.Алексеева

lab-lb@yandex.ru

Введение.

Изучение микробной эндоэкологии человека относится к одному из наиболее актуальных направлений прикладных и фундаментальных исследований в области биологии, экологии и медицины. В микробиоте человека ведущая роль принадлежит микробиоценозу кишечника, и, в частности, толстой кишки. Кишечная микрофлора рассматривается как основная детерминанта здоровья и заболевания людей.

По данным литературы известно, что колонизация кишечника человека определенным набором родов и видов микроорганизмов обуславливает этапность становления микрофлоры желудочно-кишечного тракта в онтогенезе [1]. Внутриутробно развивающийся плод не является стерильным, а получает от матери какое-то количество индигенных микроорганизмов in utero [2, 3, 4]. Далее до семидневного возраста микрофлора претерпевает три стадии становления: первая – «условно-асептическая» начинается с момента рождения; вторая – «нарастающей колонизации» наступает через 10–20 часов после родов. В этот период колонизация осуществляется гетерогенными микроорганизмами, в первую очередь аэробными и факультативно аэробными бактериями, такими как *E.coli, Staphylococcus spp., Klebsiella spp., Enterococcus spp*. и др. Третья стадия – «трансформации микрофлоры» – наступает с 5-7 дня после родов, в результате которой происходит вытеснение бифидофлорой других микроорганизмов [5, 6].

Цель работы.

Изучить закономерности формирования микробиоты толстой кишки здоровых людей различных возрастных групп, проживающих на территории промышленного мегаполиса.

Материалы и методы.

Изучен качественный и количественный состав микробиоценоза просвета толстой кишки 1 532 «здоровых» людей разных возрастных групп, всего проведено 2 895 анализов. В процессе исследования выделено 16 392 культуры, из них идентифицировано до вида 11 798 штаммов микроорганизмов, как представителей облигатной микрофлоры, так и условно-патогенных (УПМ) и патогенных микроорганизмов различных родов. Группы «здоровых» лю-дей были сформированы по критериям здоровья, определенным для каждой возрастной группы в отдельности [7,8]. Изучение микробиоценоза толстой кишки проводилось в соответствии с Методическими указаниями «Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника», по методу разра-ботанному Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской и модифицированному в ННИИЭМ [9]. Статистическая обработка материала была проведена с использованием прикладной программы STATISTICA 8.0 фирмы StatSoft и разработанной нами программы для ЭВМ «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» Свидетельство о государственной регистрации программы № 2011614233 от 30.05.2011. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью непараметрических критериев Mann–Whitney и Kruskal-Wallis [10]. Критический уровень значимости **p** принимали за 0,05. Многомерный кластерный анализ данных проведен методами Варда и К-средних с использованием поправки Бонферрони для корректировки критического уровня значимости в случае множественных сравнений [11].

Результаты и обсуждение.

Для верификации правильности и полноты разбиения исходного массива данных на возрастные категории был применен многомерный кластерный анализ, который позволил разбить и упорядочить объекты (люди) микробиологических наблюдений на непересекающиеся подмножества – кластеры, соответствующие выбранным возрастным группам.

В результате анализа данных, полученных нами в ходе проведения исследований, было отмечено, что в 93,8% дети рождаются с бактериальной флорой ЖКТ, причем в первые 24 часа жизни преобладающей флорой являются микроаэрофильные бактерии родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*, а также факультативно-анаэробные микроорганизмы родов *Staphylococcus* и *Escherichia*. Условно-патогенные формы также присутствуют в микрофлоре здоровых новорожденных, причем в 8,1% случаев в количествах $\geq 10^5$КОЕ/г. Далее, во время пребывания в родильном доме во вторую стадию «нарастающей колонизации» (1–6 суток) у «здоровых» младенцев идет активный рост как анаэробных микроорганизмов (включая бифидобактерии и микроаэрофильные лактобациллы и лактококки), так и аэробных (факультативно-анаэробных кишечной палочки, энтерококка и группы УПМ) в количествах 10^5–10^7 КОЕ/г. (рис. 1 А, Б)

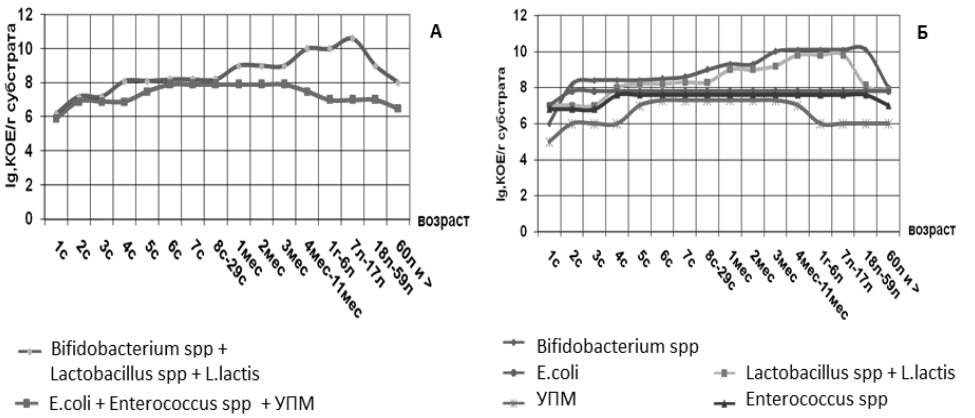


Рис. 1. Характеристика численности аэробной и анаэробной симбионтной микрофлоры толстой кишки «здоровых» людей различных возрастных групп (количество микроорганизмов приведено в усредненных значениях).

На вторые сутки до 10^8КОЕ/г увеличивается количество *E.coli*, на третьи сутки количество облигатных анаэробов, а на пятые количество УПМ. К шестым суткам, то есть к моменту выписки из родильного дома в микрофлоре устанавливается равновесие аэробной и анаэробной части флоры, далее (от 7 суток до года) происходит нарастание количества как анаэробной, так и аэробной компонент микрофлоры (рис. 1). Численность лакто- и бифидофлоры к 2 месяцам жизни ребенка достигает значений 10^9–10^{10}КОЕ/г. На таком уровне количество анаэробов сохраняется и в более старшие возрастные периоды. Снижение количества лакто- и бифидобактерий начинается ближе к 60 годам. Количество нормальной *E.coli* со вторых суток не изменяется и остается на уровне 10^8КОЕ/г на протяжении практически всей жизни человека. Падение количества УПМ начинается с трехмесячного возраста, к шести годам снижается до уровня 10^6КОЕ/г и далее не изменяется.

Частота выделения, видовое разнообразие условно-патогенных форм в значимых количествах ($\geq 10^5$КОЕ/г) и обнаружение их в ассоциациях по три, четыре и более вида нарастает в период сукцессий и достигает своего пика в возрасте от одного месяца до одного года. Бифидобактерии и лактобациллы, начиная с одного месяца жизни, встречаются в 100% случаев. Кишечная палочка выделяется у 95% детей (10^5 – 10^7КОЕ/г) в возрасте от одного месяца до года. В возрасте 7 – 17 лет частота обнаружения *E.coli* снижается до 76% (10^5 – 10^7КОЕ/г), а затем снова повышается, и достигает 100% у людей пожилого и старческого возраста. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни, и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше (рис. 2).

Анализ тенденции распределения частоты выделения представителей микробиоценоза толстой кишки в микрофлоре «здоровых» людей разных возрастных групп позволил выделить три типа распределения частоты выделения по возрастным группам. К первому типу относятся зависимости

для *Lactobacillus spp, Bifidobacterium spp* и *E. coli*, характеризующиеся нарастанием частоты выделения в первые часы и сутки с последующим насыщением, выходящим на стационарный уровень в период от одного года жизни и до 60 лет и более. Второй тип характерен для *Lactococcus spp.* Эта зависимость имеет максимальное значение частоты выделения в первые сутки жизни с последующим снижением и выходом на стационарный уровень у детей и вторичным снижением частоты выделения уже у взрослых. Наконец, третий тип характеризует возрастание частоты выделения УПМ от первых часов до одного года жизни, резким снижением в возрасте от одного года до 17 лет, с последующим переходом в стационарную фазу. Третий тип распределения частоты выделения по возрастным группам, характерный для УПМ, подчиняется одному из фундаментальных законов теоретической экологии – закону толерантности Шелфорда [12] (рис. 2).

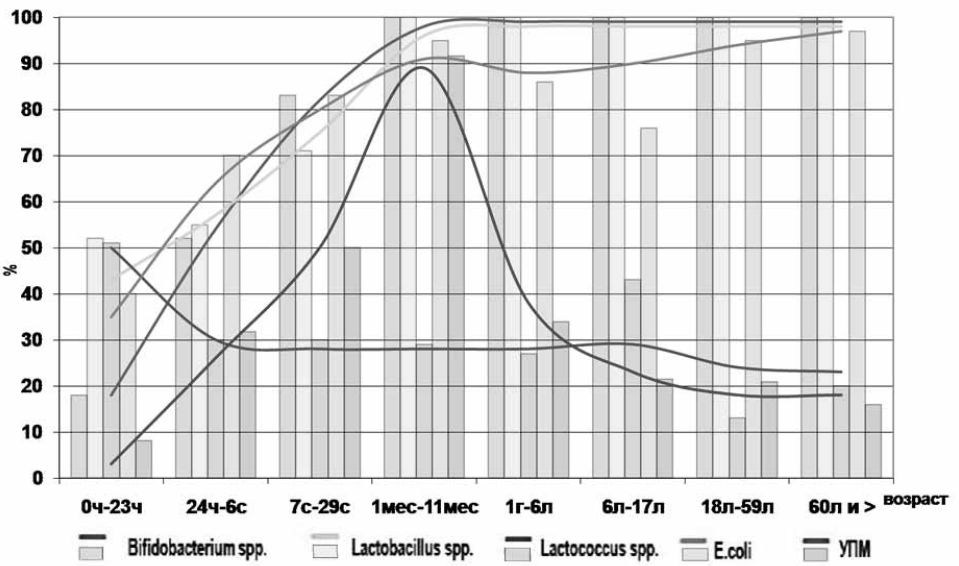


Рис. 2. Частота выделения и тенденция частоты выделения представителей кишечной микрофлоры и УПМ из кишечника «здоровых» людей разных возрастных групп

Статистический анализ видового разнообразия сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки у здоровых людей разных возрастных групп по 29 показателям не выявил значимых различий. Это можно объяснить тем, что «нормальная» микрофлора кишечника здорового человека довольно постоянна на протяжении длительных отрезков времени.

Следует также подчеркнуть, что во всех возрастных группах «здоровых» людей при увеличении видового разнообразия сообществ имбиотических микроорганизмов толстой кишки, оцениваемого по индексу Шенона, закономерно снижается доминирование (индекс Симпсона) и возрастает выравненность (индекс Пиелу). Эти факты полностью согласуются с основными положениями теоретической экологии.

Выводы.

В процессе формирования микрофлоры с первых часов жизни участвуют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы, причем в равных соотношениях. Нарастание анаэробной компоненты (лакто- и бифидофлоры) идет параллельно с ростом УПМ и кишечной палочки, минуя стадию «трансформации». Уменьшение количества УПМ в микрофлоре «здоровых» детей начинается после года. С наибольшей частотой – в 92% случаев – оппортунистические микроорганизмы в значимых количествах (> 105 КОЕ/г) выделяются в группе «здоровых» детей в возрасте от одного месяца до года. Частота обнаружения УПМ в микрофлоре толстой кишки здорового человека начинает снижаться после первого года жизни, и составляет 18% в возрастной группе 60 лет и старше. Доказано, что все экологические законы и зависимости, свойственные другим природным биотопам и популяциям, справедливы и в отношении микробиоты человека.

Литература:

1. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Ткаченко Е.И., Суворова А.Н. – СПб.: ИнформМед, 2009. – 276 с.

2. Бочков И.А. Состояние микрофлоры толстой кишки у детей раннего возраста (по материалам амбулаторных исследований) / Бочков И.А., Юрко Л.П., Юдицкая Н.М. // Инфекционные болезни. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 83–85.

3. Martin R. The commensal microflora of human milk new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics / R. Martin // Trends Food Sci. Tech. – 2004. – Vol. 15. – P. 17–21.

4. Нетребенко, О. К. Питание грудного ребенка и кишечная микрофлора / Нетребенко О.К. // Педиатрия. – 2005а. – № 3. – С. 57–61.

5. Benno Y., Sawada K., Mitsuoka T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast–fed and bottle–fed infants.// Microbiol. Immunol.– 1984.– Vol. 28. – N 9. – P. 975–986.

6. Вельтищев Ю.Е., Ветров В.П. Объективные показатели нормального развития и стстояния здоровья ребенка (нормативы детского возраста). М.: 2002. – 96 с.

7. Казин Э. М., Блинова Н. Г., Литвинова Н. А. Основы индивидуального здоровья человека: Введение в общую и прикладную валеологию: Учеб. пособие для высш. учеб. заведений. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2000. – 192 с.

8. Эпштейн-Литвак Р.В., Вильшанская Ф.А. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. Метод. рекомендации. – М., 1977. – 22 с.

9. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / пер. с англ. под ред. Леонова В.П. . – М.: Практическая медицина, 2007. – 287 с.

10. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

11. Одум Ю. Экология / Ю. Одум. – М.: Мир, 1986. – Т.2. – 376 с.

ПОПУЛЯЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ HELICOBACTER PYLORI ПРИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ ПАТОЛОГИИ

Исаева Г.Ш. [1], Селькова Е.П. [2], Алёшкин В.А. [2]

[1] ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан» Роспотребнадзора

[2] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

guisaeva@rambler.ru

По данным многочисленных исследований, *Helicobacter pylori* инфекция относится к одной из наиболее распространенных в мире, но клинические проявления развиваются далеко не у всех инфицированных. Возможно, что для развития манифестных форм необходимо взаимодействие факторов окружающей среды, иммунного ответа, генетической предрасположенности хозяина и особенностей возбудителя. Как известно, полиморфизм *H.pylori,* экспрессирующих CagA и VacA цитотоксины, может обуславливать аллельзависимый характер клинических проявлений, с чем также может быть связана различная колонизирующая способность штаммов *H.pylori* [3].

В печати последних лет появились сообщения об участии бактерий рода *Helicobacter* в патогенезе хронических воспалительных заболеваний гепатобилиарной системы (ХВЗ ГБС), но их роль окончательно не установлена [8; 10; 13; 14]. Определение связи между генотипами *H.pylori* и развитием определенных клинических проявлений имеет большой научный и практический интерес.

Целью данного исследования стало изучение генотипов изолятов *H.pylori*, выделенных от больных ХВЗ ГБС.

Материал и методы исследования.

Для обнаружения *H.pylori* в органах ГБС было исследовано 173 образца биологического материала (желчь, ткани печени, биоптаты слизистой оболочки желчного протока и желчного пузыря), отобранного от больных с диагнозами хронический некалькулезный холецистит (ХНХ) – 42 больных, хронический калькулезный холецистит (ХКХ) – 30 больных, цирроз печени (ЦП) – 11 больных. Выделение ДНК из биопроб производили с использованием набора «Хеликопол» (НПФ «Литех», г. Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию специфических фрагментов генома *H.pylori* производили по методике, предложенной НПФ «Литех» (г.Москва). Для генотипирования штаммов *H. pylori* в отношении *cagA, babA2* и *vacA*, использовали набор реагентов НПФ «ЛИТЕХ»: «Хеликопол СА» и «Хеликопол VA», «Хеликопол ВА» (Москва), согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Результаты.

В результате тестирования клинических образцов с помощью ПЦР на наличие *ureC* гена *H.pylori* был обнаружен у 31 больного, из них у 21

пациента ХНХ, 2 пациентов ХКХ и 8 пациентов ЦП. Образцы ДНК *H.pylori* были проанализированы на присутствие *vacA, cagA, babA* генов (результаты представлены в таблице 1).

Таблица 1.

Определение генов патогенности *H. pylori* в клинических изолятах, выделенных от больных с заболеваниями ГБС

Генотипы *H.pylori*	холецистит n (%)	цирроз печени n (%)	P	X^2	ГБС n (%)
n=	23	8			31
vacA m1$^+$	4(17,4)	0	0,515	0,42	4(12,9)
vacA m1$^-$	19(82,6)	8(100,0)	0,515	0,42	27(87,2)
vacA m2$^+$	10(43,5)	4(50)	0,926	0,01	14(45,2)
vacA m2$^-$	13(56,5)	4(50,0)	0,926	0,01	13(54,8)
vacAs1$^+$	16(69,6)	1(12,5)	**0,017**	5,67	17(54,8)
vacA s1$^-$	7(30,4)	7(87,5)	**0,017**	5,67	14(45,2)
vacA s2$^+$	9(39,1)	4(50,0)	0,904	0,01	13(41,9)
vacA s2$^-$	14(60,9)	4(50,0)	0,904	0,01	18(58,1)
vacAs1$^+$*/s2*$^+$	6(26,1)	1(12,5)	0,764	0,09	7(22,6)
cagA$^+$	9(39,1)	3(37,5)	0,734	0,12	12(38,7)
cagA$^-$	14(60,9)	5(62,5)	0,734	0.12	19(61,3)
babA2$^+$	5(21,7)	1(12,5)	0,960	0,00	6(19,4)
babA2$^-$	18(70,6)	7(87,5)	0,960	0,00	25(80,6)

Цитотоксичность – важнейший фактор патогенности *H.pylori*. Последние исследования показывают, что этот микроорганизм вызывает повреждение эпителиальных клеток посредством выработки цитотоксинов VacA (*vacuolating-associatted cytotoxin*) и CagA (*cytotoxin-associated gene*). Вакуолизирующий (VacA) токсин изменяет работу протонных насосов и влияет на поток ионов, вызывая при этом накопление вакуолей в клетках [12]. Уровень секреции вакуолизирующего токсина определяется мозаичной структурой *vacA* гена. Регион *vacA s* существует в двух аллельных типах: *s1 и s2*. В *s1* идентифицированы подтипы: *s1a, s1b, s1c*. Средний регион *m* существует в двух аллельных вариантах: *m1 и m2* [2]. Штаммы H.pylori, имеющие генотипы *s1m1 и s1m2*, обладают максимальным или средним уровнем секреции цитотоксина, тогда как штаммы *s2m2* проявляют незначительную токсическую активность [4].

Генотипирование выделенных изолятов от больных хроническим холециститом (ХХ) показало наличие той или иной аллели гена vacA во всех образцах. Так, vacA s1 генотип присутствовал у 16 изолятов, vacAs2 – у 9 изо-

лятов. В шести случаях был верифицирован смешанный генотип vacAs1/s2, указывающий на присутствие более чем одного штамма H.pylori.

Средний регион *m* был выявлен в обоих аллельных вариантах, но с различной частотой встречаемости: *m1* – в 4 случаях, *m2* – в 10 случаях. В обследуемой нами выборке у 69,6% больных ХХ обнаружен ген *vacAs1*. У 75% больных ЦП изоляты *H.pylori* имели *vacA* ген, при этом у большинства изолятов (50%) он был представлен *vacAs2* аллельным вариантом, поровну – по 12,5% – вариантом *vacAs1* и смешанным генотипом *vacAs1/s2*. Регион *m* был выявлен только в одном аллельном варианте *m2* .

Белок CagA является маркером присутствия *cag-PAI* (***P**athogenicity **I**sland*, остров патогенности**)**. Ген *cagA* кодирует белки IV секреторной системы *H.pylori*, функция которой состоит в транспортировке эффекторных молекул бактерии к эукариотическим клеткам [6]. Ген *cagA*, по результатам нашего исследования, обнаруживали в геноме лишь некоторых штаммов *H. pylori*. В большинстве случаев – в 60,9% при хроническом холецистите и в 62,5% случаев ЦП – изоляты были *cagA*- негативными. Белки Bab *(blood group antigen-binding adhesion* – адгезин, ассоциированный с группой крови), гены которых (*babA* и *babB*) присутствуют в виде несколько аллелей [5], обуславливают адгезию *H.pylori* с системой антигенов Lewis на эпителиальных клетках желудка. В нашем исследовании, также как и в случае с геном *cagA,* большинство изолятов являлись *babA2*- негативными: в 70,6% случаев при ХХ и в 87,5% случаев при ЦП.

Наши данные коррелируют с ранее проведенными зарубежными исследованиями. Apostolov E. и соавт. (2005) демонстрировал присутствие цитотоксинов CagA и VacA в эпителиальных клетках желчного пузыря при хроническом воспалении [1]. Stalke P. и соавт (2005) CagA штаммы в печени выявляли значительно реже, чем в желудке, и предположили возможную роль *cagA*-негативных штаммов в развитии заболеваний печени [11]. Сходные данные были получены Pirouz T. и соавт. (2009), которые обнаружили ДНК *H.pylori* в 17 образцах печени 46 больных, при этом все изоляты *H.pylori* были *cagA*-негативными [7].

Вывод.

Исследование генотипов изолятов *H.pylori*, выделенных от больных хроническими воспалительными заболеваниями ГБС, показало их гетерогенность. Но, несмотря на это, можно отметить, что в колонизации печени и желчного пузыря патогенетическое значение могут иметь штаммы *H.pylori* преимущественно *cagA, babA* – негативные, *vacA* – позитивные, но отличающиеся преобладанием *m2* аллельного варианта, имеющего незначительный уровень токсической активности.

Литература:

1. Apostolov E., Abu Al-Soud W., Nilsson I. et al. Helicobacter pylori and other Helicobacter species in gallbladder and liver of patients with chronic cholecystitis detected by immunological and molecular methods. // Scand J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 40. – P. 96–102.

2. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M.J. et al. Mosaicium in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol.28. – № 270 (30). – P. 17771–17777.

3. Bridge D.R., Merrell D.S. Polymorphism in the Helicobacter pylori CagA and VacA toxins and disease. // Gut Microbes. – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 101–117.

4. Cover T.L., Blaser M.J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from Helicobacter pylori. // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – P. 10570–10575.

5. Ilver D., Arnqvist A., Ogren J. et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. // Science. – 1998. – Vol. 279. – P. 373–377.

6. Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B. et al. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. // Science. – 2000. – Vol. 287. – P. 1497–1500.

7. Pirouz T., Zounubu L., Keivani H. et al. Detection of Helicobacter pylori in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases using the amplification method.//Dig Dis Sci. – 2009 . – Vol.54(7). – P.1456-1459

8. Shukla H.S., Tewari M. Discovery of *Helicobacter pylori* in gallbladder. // Indian J Gastroenterol – 2012. – Vol. 31. – P.55–56.

9. Silva L.D., Rocha A.M., Rocha G.A. et al. The presence of *Helicobacter pylori* in the liver depends on the Th1, Th17 and Treg cytokine profile of the patient. //Mem Inst Oswaldo Cruz. – 2011. – Vol. 106 (6). – P. 748–54.

10. Stalke P., Abu Al-Soud W., Bielawski K.P. et al. Detection of Helicobacter species in liver and stomach tissues of patients with chronic liver disease using polymerase chain reaction- denauring gradient gel electrophoresis and immunohistochemistry. // Scand. J Gastroenterol. – 2005. – Vol. 40. – P. 1032–1041.

12. Terebiznik M.R., Vazquez C.L., Torbicki K. et al. Helicobacter pylori VacA toxin promotes bacterial intracellular survival in gastric epithelial cells. // Infect Immun. – 2006. – Vol.74. – P. 6599–6614.

13. Yakoob J., Khan M.R., Abbas Z. et al. *Helicobacter pylori*: association with gall bladder disorders in Pakistan. // Br J Biomed Sci. – 2011. – Vol. 68 (2). – P. 59–64.

14. Zhou D., Yong Zhang Y., Gong W. *et al.* Are *Helicobacter Pylor*i and Other *Helicobacter Species* Infection Associated with Human Biliary Lithiasis? A Meta-Analysis. // PLoS One. – 2011. – Vol. 6 (11). – P. e273.

ДИСБИОЗ СЛИЗИСТОЙ НОСОГЛОТКИ КАК ИНДИКАТОР ФОРМИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НЕБЛАГОПОЛУЧИЯ В ОРГАНИЗОВАННОМ КОЛЛЕКТИВЕ

Кичикова В.В., Беляева Е.В., Ермолина Г.Б.
ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора
e-mail: labnikif@yandex.ru

Введение.

В организованных коллективах, особенно в период формирования, в условиях длительного и постоянного контакта, активно работающего аэрозольного механизма передачи происходит перекрестное обсеменение микрофлорой верхних дыхательных путей. Результатом такого обсеменения даже у практически здоровых людей могут наблюдаться микроэкологические нарушения биоценоза слизистых оболочек, с последующей их колонизацией условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. Интенсивность обсеменения, характер микробиоты, вегетирующей на слизистой носоглотки, особенности межвидовых взаимоотношений в определенной степени формируют представление о возможности прогнозирования вспышечной заболеваемости в условиях закрытого коллектива.

Цель исследования.

Оценить особенности функционирования бактериальных ассоциаций в микробиоценозе носоглотки новобранцев как возможный показатель формирования эпидемиологического неблагополучия.

Материалы и методы.

Обследовано 193 новобранца, призванных в 2010-2012 годах из различных регионов на воинскую службу во ВВ МВД России, на момент обследования все военнослужащие были здоровы и никаких жалоб не предъявляли. Биоматериалом служило отделяемое носоглотки. Микрофлору слизистой носоглотки исследовали согласно МУК 4.2.1887-04. Идентификацию микроорганизмов до вида осуществляли с использованием классических питательных сред, а также систем индикаторных бумажных для идентификации бактерий (НПО «Микроген») и СТРЕПТОтеста 16 («ЛАХЕМА», Чехия). С целью исследования биоценотических взаимоотношений оценивалось экологическое сродство биоциантов (коэффициент Жаккарда и коэффициент ассоциативности) [1].

Результаты и обсуждение.

В процессе исследования микрофлоры слизистой носоглотки было выделено 696 культур микроорганизмов. На долю индигенной микрофлоры в общей сложности приходилось 71,8%, на долю аллохтонной – 27,8% и транзиторной – 0,4% (табл.1).

Таблица 1.

Характеристика микробиоценоза носоглотки

	Микроорганизмы	Высеваемость, %	Удельный вес, %
Индигенная микрофлора	Neisseria spp. (N.canis, N.cinerea, N.denitrificans, N.polysaccharea, N.mucosa, N.sicca, N.subflava, N.flavescens, N.lactamica)	89,1	40,1
	Streptococcus spp. (S.oralis/mitis 1, S.bovis, S.salivarius, S.vestibularis, S.anginosus, S.mitis, S.sanguis esl, S.contellatus, S.acidominimus, S.equinus)	82,3	28,6
	Stomatococcus spp.	11,9	3,1
Аллохтонная микрофлора	β-гемолитические стрептококки (S.pyogenes, S.equi ssp. equi, S.equisimilis)	21,7	6,0
	Streptococcus pneumoniae	4,7	1,3
	Haemophilus spp. (H.influenzae, H.parainfluenzae, H.haemolyticus)	45,1	12,5
	Staphylococcus aureus	15,0	4,2
	Коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) (S.caseolyticus, S.hominis, S.lentus, S.sciuri, S.haemolyticus, S.epidermidis, S.simulans, S.capitis capitis, S.capitis urealyticus)	11,9	3,3
	Коринебактерии (C.xerosis, C. pseudodiphthericum)	1,6	0,4
	Лактобациллы	0,5	0,1
Транзиторная микрофлора	Клебсиеллы (K.pneumoniae)	0,5	0,1
	Энтерококки (E.faecalis, E.faecium)	1,0	0,3

Наибольшая частота встречаемости (процент высеваемости) была отмечена для Streptococcus oralis/mitis 1 (64,2%) в количестве 5,1±0,1 lg КОЕ/тампон, Neisseria sicca (48,7%) в количестве 4,6±0,1 lg КОЕ/тампон, N.subflava (33,7%) в количестве 4,9±0,2 lg КОЕ/тампон и Haemophilus influenzae (36,3%) в количестве 5,6±0,1 lg КОЕ/тампон.

В состав индигенной микрофлоры носоглотки здоровых лиц обычно входят представители родов Neisseria spp. и Streptococcus spp. [3]. В наших исследованиях со слизистой носоглотки солдат срочной службы нейссерии и стрептококки высевались в 89,1% и 83,4% случаев, соответственно. Среди представителей нормофлоры со стрептококками чаще всего высевались N.cinerea, N.denitrificans, N.flavescens и N.sicca, тогда как культура N.polysaccharea почти в трети случаев не ассоциировалась с α-гемолитическими стрептококками.

У 138 человек (71,5%) со слизистой носоглотки, помимо нормофлоры, высевались условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), как по одному виду, так и в ассоциациях из двух, трех и четырех видов УПМ. Среди УПМ чаще всего встречались ассоциации H.influenzae с гемолитическими культурами – S.pyogenes (19,4%) и S.aureus (16,1%), а также ассоциации S.pyogenes со стафилококками: S.aureus (9,7%) и КОС (14,5%). В 4,8% случаев наблюдались ассоциации S.pneumoniae и H.influenzae. Коагулазоотрицательные стафилококки ассоциировались с S.aureus (9,7%) и H.influenzae (8,1%).

Поскольку в микробиоценозе носоглотки лидирующие позиции занимают α-гемолитические стрептококки и нейссерии, была проведена оценка ассоциативности УПМ с этими большими группами бактерий (табл. 2). В целом, исследованные бактерии, за исключением пневмококка, показали примерно одинаково высокие значения КА как с нейссериями, так и α-гемолитическими стрептококками. Не исключено, что подобная форма ассоциаций может создавать условия для селекции патогенных микроорганизмов и возможности бактериальных осложнений. S.pneumoniae почти в три раза реже ассоциировался с другими представителями α-гемолитических стрептококков, чем с нейссериями, что может быть вызвано проявлением антагонизма между этими видами стрептококков.

Взаимоотношения микроорганизмов в ассоциациях можно охарактеризовать по наличию сопряженных связей. Для их оценки вычисляли коэффициент Жаккарда, являющийся наиболее информативным показателем экологической общности различных видов микроорганизмов.

Таблица 2.

Коэффициенты ассоциативности (%) отдельных видов бактерий с α-гемолитическими стрептококками и нейссериями.

Виды УПМ	Количество культур	Ассоциации	
		с α-гемолитическими стрептококками	с нейссериями
S.pneumoniae	9	33,3	88,9
S.pyogenes	39	89,7	89,7
H.influenzae	70	70,0	81,4
H.haemolyticus	14	92,9	92,9
S.aureus	29	86,2	89,7

О.В. Бухарин и др. [2] показали, что наибольшая сопряженность формируется у симбионтов индигенной микрофлоры, выделенных от здоровых людей. В нашем исследовании не было выявлено высокой сопряженности у симбионтов индигенной микрофлоры: одна ассоциация бактерий с умеренной сопряженностью – S.oralis/mitis 1 – N.sicca (41,5%) и две ассоциации со слабой сопряженностью – S.oralis/mitis 1 – N.subflava (25,2%), S.oralis/mitis 1 – N.cinerea (25,4%), что, по всей вероятности, говорит о нестабильности нормофлоры.

По составу выделенной микрофлоры обследованные были разделены на 4 группы с различными микроэкологическими типами биотопа: у 54 (28%) военнослужащих регистрировался нормоценоз, у 24 (12,4%) – I степень дисбиотических нарушений, у 65 (33,7%) – II степень и у 50 (25,9%) солдат III степень дисбиотических нарушений носоглотки. Как оказалось, ассоциация S.oralis/mitis 1 – N.sicca, проявлявшая себя в общем пуле как ассоциация с умеренной сопряженностью, демонстрировала гетерогенность по коэффициенту Жаккарда в зависимости от степени дисбиоза. Так, при нормоценозе и I степени дисбиоза коэффициент Жаккарда составил 50,8% (высокая сопряженность), при II – 38,2% и III степени дисбиоза – 37,8% (умеренная сопряженность). Что касается ассоциации S.oralis/mitis 1 – N.subflava, то наблюдалась такая же тенденция уменьшения сопряженности (30% при нормоценозе и I степени дисбиоза, 19,4% при II и III степени дисбиоза). Таким образом, у двух основных ассоциаций нормофлоры наблюдалась обратная зависимость показателей сопряженности от степени тяжести дисбиотических состояний. Такое нарушение сопряженных связей на фоне высоких показателей ассоциативности УПМ с представителями нормофлоры может создавать благоприятные предпосылки для формирования эпидемического неблагополучия.

Выводы.

1. У 71,5% обследованных военнослужащих со слизистой носоглотки помимо нормальной микрофлоры (стрептококков и нейссерий) высевались УПМ, чаще всего H.influenzae и гемолитические культуры S.aureus, S.pyogenes.

2. Практически все исследованные УПМ, за исключением пневмококка, показали высокие значения коэффициента ассоциативности с представителями индигенной микрофлоры.

3. Оценка сопряженных связей внутри микробиоценоза слизистой носоглотки позволила выявить три ассоциации представителей нормофлоры, способные к синергическому существованию, однако по мере нарастания тяжести дисбиоза носоглотки устойчивость связей в этих ассоциациях снижалась.

Литература:

1. Беляева Е.В., Ермолина Г.Б., Кичикова В.В., Никифоров В.А. Исследование ассоциаций бактерий в микробиоценозе слизистой носоглотки практически здоровых людей // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2012. № 2. С. 20–24.

2. Бухарин О.В., Паньков А.С., Усвяцов Б.Я., Лискова Е.В., Скачков М.В. Бактериальные ассоциации в микросимбиоценозе верхних дыхательных путей

у больных гриппом // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 6. С. 12–16.

3. Колотилова Л.В., Акишина Т.М., Загранян О.П. Нормальная микрофлора слизистой носоглотки // Антибиотики и химиотерапия. 1989. Т. 34. № 10. С. 751–755.

ПАТОГЕННЫЕ И АЛЛЕРГЕННЫЕ ГРИБЫ КАК ФАКТОРЫ РИСКА

Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Лисовская С.А., Паршаков В.Р.

ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Казань

mycology-kazan@yandex.ru

Микроскопические грибы постоянно и повсеместно присутствуют в среде обитания человека. Они неизбежно присутствуют в почве и на поверхности различных сооружений; колонизируют сельскохозяйственную продукцию, фармацевтические и косметические средства; их споры хорошо переносятся воздушными потоками, создавая «грибной аэропланктон», который попадает в организм человека в процессе дыхания. При этом грибы могут обладать опасными для здоровья человека свойствами [1]. Микроскопические грибы, присутствующие в воздухе, могут быть причиной ряда заболеваний, в том числе респираторных аллергозов, инвазивных микозов, микотоксикозов. Особую остроту эта проблема приобретает в городских условиях, где вследствие влияния антропогенных факторов микогенная контаминация как окружающей среды, так и закрытых помещений, приобретает угрожающий характер.

Проблема качества микологической обстановки жилых помещений и ее влияние на здоровье человека требует серьезного внимания, поскольку наличие пораженных грибами строительных и отделочных материалов способствует контаминации воздуха спорами и летучими метаболитами грибов, что может негативно сказаться на здоровье людей, пребывающих в этом помещении длительное время, в частности, способствуя микогенной сенсибилизации

В последнее время, микологический мониторинг офисных и жилых помещений приобрел особую актуальность. Это обусловлено, в первую очередь, поисками причин «синдрома больного здания» (sick building syndrome), одной из которых считают микогенную контаминацию помещений биоаэрозолем, включающим в себя споры грибов, их метаболиты, в т.ч. микотоксины.

Проблема грибкового поражения зданий и сооружений, традиционно, рассматривалась как неотъемлемый признак старых построек. Однако в последние годы отмечено значительное ухудшение микологической обстановки в помещениях современной постройки.

В связи с этим, представляло интерес оценить распространение потенциально патогенных и аллергенных грибов в жилых помещениях, расположенных в домах постройки 2000–2012 гг.

Материалы и методы.

Проведен анализ результатов микологического обследования 30 квартир, расположенных в различных районах г. Казани, в домах постройки 2000–2012 гг. Все квартиры были жилыми с современным ремонтом и мебелью. Практически все обследования проводили в связи с появлением ухудшения состояния здоровья членов семей, постоянно проживающих в данных квартирах.

Среди обследованных квартир 22 (73,3%) расположены на верхних этажах домов, 6 (20%) – на средних и 2 (6,7%) – на нижних. Площадь обследованных квартир варьировалась от 40 м^2 до 260 м^2. Следует отметить, что среди домов, в которых расположены данные квартиры, имелись объекты, сданные по программе ликвидации ветхого жилья и социальной ипотеке, объекты коммерческой застройки с типовыми квартирами, а также элитные жилые комплексы со свободной планировкой квартир. В большинстве случаев очаги грибковых поражений отмечались на наружных стенах в местах межпанельных швов, на откосах вокруг пластиковых окон, на потолке квартир верхних этажей. В этих местах наблюдались разноцветные пятна плесени, разрушались краски и обои.

Пробы из очагов брали с помощью мазков и соскобов с последующим высевом на среды Сабуро и Чапека. Смывы брали стерильным ватным тампоном с площади 1 дм^2, помещенным в пробирку с 1 мл стерильной дистиллированной воды. Пробы воздуха отбирали с помощью импакторного пробоотборника ПУ-1Б. Культивирование грибов проводили при 28°С в течение 7 суток [2,3]. Определение грибов проводили по общепринятым морфологическим и микроскопическим методам. Для идентификации использовали определители грибов, руководства по микологии и аллергологии [4-7]. Определение чувствительности грибов к противогрибковым препаратам проводили методами серийных разведений и диско-диффузионными методами [2].

Результаты и обсуждение.

Основным сенсибилизирующим фактором плесневых грибов являются легколетучие споры. В квартирах с очагами грибковых поражений количество спор достигало 850-2300 КОЕ/м^3 при условной норме до 500 КОЕ/м^3 [8]. При этом, наиболее высокий уровень микогенной контаминации отмечен в воздухе новых квартир, расположенных в домах постройки 2010–2011 гг., что, вероятно, связано с массовым проведением ремонтов и, как следствие, повышенным уровнем пыли. Нормальное содержание плесневых спор достигалось только после 30 минутного проветривания помещения.

Следует отметить, что в жилых помещениях без очагов биодеструкции, уровень микогенной контаминации воздуха составлял 10^2-5×10^3 КОЕ/м^3. При этом уровень микогенной контаминации воздуха снижался в помещениях с более высокой влажностью и повышался при большей запыленности помещения.

Обследование воздуха жилых помещений с очагами грибковой биодеструкции выявило преобладание различных видов рода Penicillium spp. (100%), в том числе Penicillium chrysogenum (53,3%), Penicillium tardum (40%), Penicillium funiculosum (20%). Потенциально патогенные грибы рода Aspergillus были обнаружены в 80% квартир, причем чаще всего отмечалось присутствие в воз-

духе Aspergillus terreus (43,3%) и Aspergillus niger (50%). Следует отметить, что выявление Aspergillus niger в воздухе явно коррелировало с результатами обследования очагов биодеструкции. Виды Aspergillus fumigatus и Aspergillus flavus в воздухе были выявлены в единичных случаях, хотя на поверхности очагов они обнаруживались значительно чаще. Также, в воздухе 23,3% квартир отмечено присутствие Alternaria alternata, с той же частотой встречались виды рода Fusarium, несколько реже выявляли Rhizopus nigricans (16,7%) и Neurospora sitophyla (10%). Следует отметить, что в очагах биодеструкции виды Rhizopus nigricans и Alternaria alternata встречались значительно чаще, а Fusarium spp. и Neurospora sitophyla – реже. В единичных случаях в воздухе были выявлены виды Acremoniella atra, Cladosporium herbarum и Trichoderma viride.

Плесневые грибы родов Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Fuzarium, вносят наибольший вклад в развитие микогенной сенсибилизации [9], поэтому их присутствие в воздухе жилых помещений в значительном количестве может способствовать возникновению микогенной сенсибилизации и вызывать обострение аллергических заболеваний. Помимо этого, представители рода Aspergillus – A. niger, A. terreus, A. fumigatus, A. flavus – могут быть причиной «вторичных» микозов, вызывая заболевания легких и ЛОР-органов.

Однако до настоящего времени, четких критериев определения безопасного уровня присутствия микромицетов в среде обитания человека не существует. В качестве одного из возможных показателей в региональном отчете ВОЗ за 1990 год был предложен порог содержания грибов в 500 КОЕ/м^3 в воздухе, превышение которого может привести к развитию приступов бронхиальной астмы [10]. В настоящее время в США, по данным Американского Национального Аллергологического Бюро, для жилых помещений средним признают уровень концентрации спор в воздухе 900-2500 КОЕ/м^3 [10].

Европейские нормы контаминации клетками грибов воздуха в жилых и неиндустриальных производственных помещениях (проект ECA COST 613 19930), несколько строже. Так, средним считают уровень контаминации менее 1000 КОЕ/м^3 в жилых, и менее 500 КОЕ/м^3 – в неиндустриальных производственных помещениях [2]. В России единые стандарты оценки уровня микогенной контаминации жилых помещений также отсутствуют, хотя большинство авторов определяют «безопасную» степень контаминации на уровне 500-1000 КОЕ/м^3 [8,10].

Выработка единых для всех людей нормативов представляется затруднительной, поскольку механизмы патогенного воздействия грибов на человека и степень чувствительности к ним у разных людей различны. В то же время, отсутствие таких стандартов создает ряд проблем при оценке рисков для человека. В связи с этим, может быть уместна разработка нормативов микогенной контаминации для групп людей, учитывая их сенсибилизацию к аллергенам грибов и состояние иммунитета.

Таким образом, контроль микогенной контаминации жилых помещений является одним из средств обеспечения биологической безопасности среды обитания человека, позволяя снизить риск возникновения микогенной сенсибилизации и микозов, и способствуя защите населения.

Литература:

1. Simon-Nobbe B. The spectrum of fungal allergy / Simon-Nobbe B., Denk U., Poll V. et al. // Allergy and Immunology. 2008. 145: 58–86.

2. Аравийский Р.А., Климко Н.Н., Васильева Н.В.. Диагностика микозов. СПб., 2004, 185 с.

3. Мюллер Э., Леффлер В. Микология. Пер. с нем. М., Мир. – 1995. – 343 с.

4. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. – М., Бином. 2003. – 439 с.

5. Паттерсон Р. Аллергические болезни. М.: Гэотар медицина. 2000. 733 с.

6. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М.. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. Пер. с англ. М.Мир. – 2001. – 468 с.

7. Лугаускас А.Ю., Микульскене А.И., Шляужене Д.Ю. Каталог микромицетов-биодеструкторов полимерных материалов. М.: Наука. 1987. 340 с.

8. Васильева Н.В., Елинов Н.П. Микроорганизмы-контаминанты и патогены – индукторы процессов старения больничных зданий и помещений медицинского назначения, а также возбудители некоторых заболеваний людей. СПб.: Коста, 2009. 224 с.

9. Bush, R.K. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases / Bush R.K., Portnoy J.M.//J. Allergy Clin Immunol. – 2001. – Vol. 107, n. 3: P. 430-440.

10. Желтикова Т.М. К вопросу о допустимом уровне микромицетов в воздухе помещений./ Желтикова Т.С. // Пробл.мед.микологии. – 2009. – Т.11, № 2. – С. 41–43.

СВОЙСТВА СПОРООБРАЗУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВЫ СКОТОМОГИЛЬНИКА В НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Шишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Московской обл.

e-mail: mokrievich@obolensk.org

Микробные культуры, выделенные из разных источников (от больных людей и животных, из объектов внешней среды и от биопробных животных), подвергают дальнейшим исследованиям по оценке биологических свойств с целью идентификации, которая для возбудителя сибирской язвы до настоящего времени остается сложной, трудоемкой и длительной процедурой.

Затруднения в первую очередь связаны с широким распространением в природе группы спорообразующих сапрофитных аэробов, очень схожих по ряду морфологических, тинкториальных и культуральных признаков с возбудителем сибирской язвы.

Разработка методов идентификации возбудителя сибирской язвы является одним из важнейших методических вопросов микробиологии этой болезни

со времен Коха до наших дней. К настоящему времени разработано и предложено значительное количество методов идентификации сибиреязвенного микроба, многие из которых представлены в виде последовательных схем. Но при использовании методов должен быть соблюден основной принцип – создание условий, обеспечивающих дифференциацию возбудителя сибирской язвы от других спорообразующих аэробных микроорганизмов [1]. По замечанию Груз Е.В. [2], невозможно выбрать какой-либо один из методов для дифференциальной диагностики выделенной вирулентной культуры от ослабленных сибиреязвенных бацилл и сапрофитов, так как ни один из них не отвечает основным требованиям, а именно – абсолютной достоверности в сочетании с экспрессностью. Поэтому вопрос остается актуальным и до настоящего времени, так как существующие методы являются трудоемкими, громоздкими, сложными, длительными и, что самое главное, не всегда высокоэффективными. Задача заключается в разработке методов, позволяющих максимально повысить точность и надежность идентификации выделенного микроорганизма в наиболее практически возможные короткие сроки. Однако при идентификации во всех случаях на первом месте должна стоять точность, а затем – скорость получения результатов [3].

Из старого скотомогильника в Кстовском районе Нижегородской области произведен отбор 100 образцов проб почвы, которую исследовали в соответствии с Методическими указаниями № 4.2.2413-2008 [4] по существующим методам [5].

Культуры из подозрительных колоний (розового цвета) на дифференциально-диагностической питательной среде с фенолфталеинфосфатом натрия, а также культуры, выделенные от биопробных животных, подвергли исследованиям с целью видовой идентификации.

В мазках из 24–48 ч агаровых культур из подозрительных колоний при окраске по Граму вегетативные клетки имели форму Грам-положительных палочек, расположенных длинными и короткими цепочками из 2-3 члеников. Одновременно в мазках, приготовленных через 48 ч культивирования, присутствовало значительное количество круглых спор, расположенных как отдельно, так и внутри бактериальной клетки. В мазках-отпечатках от биопробных животных также были обнаружены крупные Грам-положительные бескапсульные палочки, по две-три в цепочках.

Микробные палочки не обладали подвижностью.

При выращивании в МПБ наблюдался придонный рост культуры, легко разбивающийся и вызывающий помутнение среды.

Через 24 ч культивирования на дифференциально-диагностической питательной среде вырастали крупные (диаметром до 5 мм) колонии с неровными краями и слегка вдавленной серединой с пуговкой, которые в присутствии раствора аммиака приобрели малиновую окраску разной интенсивности, что указывает на наличие у исследуемых культур фосфатазной активности.

На агаре Хоттингера, в который добавляли лецитин в концентрации 0,4 %, вокруг выросших колоний через 24–48 ч наблюдалась широкая беловатая прозрачная зона, что свидетельствует о наличии незначительной лецитиназной активности.

На LB-агаре с 5% крови через 24 часа наблюдалась обширная зона гемолиза.

В посевах культур на бикарбонатно-сывороточный агар с инкубацией в атмосфере CO_2 через 24–48 ч выросли шероховатые серые сухие колонии R-формы. В мазках из них выявлены только бескапсульные палочки.

Для определения чувствительности к сибиреязвенным бактериофагам использовали «Фаг-тест-набор «ОболенскR1», бактериофаги диагностические сибиреязвенные Гамма А-26 и FahВНИИВВМ. 7 культур из проб почвы тела скотомогильника дали положительный результат – наблюдался лизис культуры разной степени выраженности. Фаг Гамма А26 образовывал, как правило, стерильное пятно или дорожку, а с фагом ОболенскR1 наблюдалось легкое помутнение и, иногда, вторичный рост в зоне лизиса.

При подробном изучении выделенных культур у образца № 55 был обнаружен собственный фаг, который лизировал исходный 55 штамм, а также сибиреязвенные культуры.

На рисунке представлены две чашки с культурами *B. anthracis* 71/12 и B. sp. 55, обработанными фагами Гамма А26 и FahВНИИВиМ, а также фагами культур №№ 55 и 771, выделенными из лизогенных штаммов близкородственных бактерий. В центре чашек помещен диск с ампициллином.

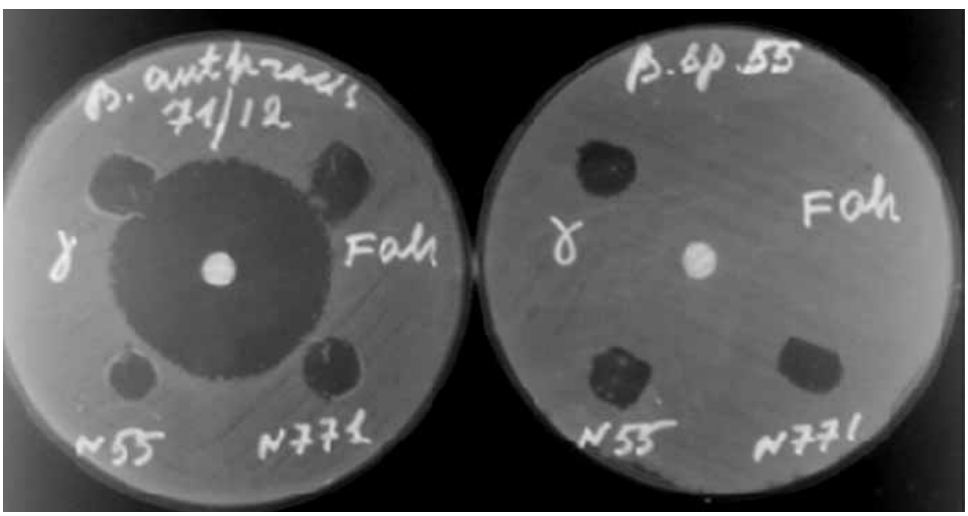


Рисунок. Рост культур B. anthracis 71/12 и B. sp. 55, обработанных фагами

Из представленного рисунка следует, что обе культуры – *B. anthracis* 71/12 и B. sp. 55 – лизируются специфическими сибиреязвенными фагами (штамм *B. anthracis* 71/12 – фагом Гамма А26 и фагом FahВНИИВиМ), а штамм 55 лизируется только фагом Гамма А26. Одновременно обе культуры лизируются фагами 55 и 771, выделенными из штаммов близкородственныз бактерий. Что касается чувствительности к пенициллину, то штамм *B. anthracis* 71/12 чувствителен, а штамм B. sp. 55 устойчив к данному антибиотику. Все подозрительные культуры дали отрицательный тест «жемчужного ожерелья». При проверке чувствительности к пенициллину диско-диффузионным методом

у исследуемых культур отсутствовала зона задержки роста или была не более 3мм, тогда как у контрольного штамма *B. anthracis*71/12 она составила 28 мм.

В заключение определили патогенность культур, выделенных из образцов почвы (9 культур, из них 7 лизируются специфическими бактериофагами), путем заражения нелинейных белых мышей. В качестве контроля использовали культуру штамма *B. anthracis* 71/12. Через 24 ч пала одна контрольная мышь, через 48 ч – еще две мыши с клинической картиной, характерной для сибирской язвы. Среди опытных мышей падежа не было при наблюдении в течение 10 дней – отклонений от нормального состояния у них не выявили.

Антигенные особенности культур выделенных штаммов исследовали в реакциях Асколи и РДП с преципитирующей сибиреязвенной сывороткой. У 7 из 9 исследованных культур наблюдалась положительная реакция Асколи и выраженная полоса преципитации.

Для идентификации культур использовали ПЦР с помощью Тест-системы ПЦР «ГенСиб», а также с разработанными в ГНЦ ПМБ праймерами на капсульную плазмиду и на компоненты сибиреязвенного токсина – протективный антиген, летальный и отечный факторы. При использовании Тест-системы ПЦР «ГенСиб» с ДНК культур, выделенных от биопробных животных и из подозрительных колоний с чашек с дифференциально-диагностической питательной средой, не выявлено ДНК B. anthracis. В исследуемых образцах фрагментов ДНК, соответствующих генам протективного антигена и капсулы сибиреязвенного микроба, не обнаружено. Использование ПЦР для идентификации не позволило отнести выделенные культуры к возбудителю сибирской язвы.

Таким образом, из образцов почвы выделено 9 подозрительных культур, изучение свойств которых показало отсутствие подвижности, продукции капсулы на сывороточно-бикарбонатном агаре; отрицательный тест «жемчужного ожерелья»; отсутствие зоны подавления роста вокруг диска с пенициллином; наличие слабой фосфатазной и лецитиназной активностей; наличие положительных реакций Асколи и РДП; отсутствие патогенности для белых мышей. В проведенных исследованиях впервые выделены культуры, лизирующиеся тремя сибиреязвенными бактериофагами, но по остальным показателям они не могут быть отнесены к возбудителю сибирской язвы. Выделенные из почвы скотомогильника штаммы занимают промежуточное место между *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus.*

Полученные нами результаты подтвердили сведения литературы о выделении из почвы спорообразующих сапрофитов, имеющих некоторые сходства с возбудителем сибирской язвы [6].

Литература:

1. Коротич А.С. Сибирская язва / Коротич А.С., Погребняк Л.И. // Киев, «Урожай», 1976. – 160 с.

2. Груз Е.В. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac. anthracis*. Автореф. дис. канд. мед.наук. – Одесса, 1965. – 19 с.

3. Steel K.H. Microbial identification // J. Gen. Microbiol. – 1965. – V. 40. – N. 1. – P. 143–148.250.

4. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК № 4.2.2413-2008. – 69 с.

5. Маринин Л.И. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы (Учебно-методическое пособие) / Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Под ред. Л.И. Маринина и И.А. Дятлова – М.: «ГИГИЕНА». – 2009. – 304 с.

6. Егорова И.Ю. Сравнительная характеристика почвенныхизолятов группы *Bacilluscereus* / Егорова И.Ю., СеляниновЮ.О., Лягоскин И.В. // Ж. Ветеринария. – 2008. – № 6. – С. 29–33.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ КОНЦЕПЦИИ «ПРОБИОТИКИ»

Шендеров Б.А.

ФБУН «Московский научно исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

e-mail: shenderof@yandex.ru

Организм человека – это «суперорганизм», симбиотическое сообщество эукариотических, прокариотических клеток, включая архибактерии, и вирусов. В нем присутствует свыше 100 триллионов бактерий и квадриллион вирусов, что в 10-100 раз превышает общее число соматических и зародышевых клеток человека. В ДНК человека идентифицировано 23 000, в микробиоме – более 10 млн генов. Количество видов, обнаруживаемых у человека колеблется от 3–5 до 10–30 тыс; штаммов – до 70 тыс. Видовой состав относительно стабилен у конкретного человека и имеет выраженный индивидуальный характер, как на видовом, так и на штаммовом уровне. Содержание бактерий и количество видов между отдельными индивидуумами может различаться в 12–2200 раз. Свыше 90% кишечных бактерий принадлежат к филам *Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria;* здесь же присутствует также более 1200 видов вирусов. Фекальные бактерии по жизнеспособности различаются: 30%- мертвые; 50%-живые и 20%- поврежденные. По соотношению *Bacteroides, Prevotella* и *Ruminococcus* большинство людей делят на три «энтеротипа»; у городских и сельских жителей России выявлены некоторые особенности подобных «энтеротипов» (Nature Communication 2013. – URL: Doi: 10.1038/ncomms3469/www.natyre.com/naturecommunications). Симбиотическая микробиота оказывает прямо или опосредовано свои эффекты практически на все физиологические функции, иммунные, биохимические, поведенческие и регуляторные реакции человека; является тем эндогенным многофакторным сигналом, который обеспечивает здоровье и риск заболеваний человека с момента его рождения и до глубокой старости. Основные функции симбиотической микробиоты, схожие с таковыми взрослого человека, начинают проявляться со 2-го жизни, достигая полного развития к 10–14 годам. Различные биотические и абиотические факторы и агенты могут стабильно или обратимо

модифицировать микробную экологию человека, что сопровождается нарушением структуры и функций метагенома, метаэпигенома, метаболизма, обмена межклеточной информацией и риском многих хронических заболеваний. С начала 50-х годов для профилактики и лечения заболеваний, связанных с дисбалансом сибиотической микробиоты, в мире разработано и индустриально производится более 150 различных средств; наиболее известными являются пробиотики, пребиотики и синбиотики. Их позитивные эффекты на макроорганизм обусловлены продукцией множества микробных низкомолекулярных соединений различной химической природы (аутоиндукторы, хемокинины, модулины, эффекторы, сигнальные молекулы). По мере развития рынка средств, улучшающих состояние микробной экологии, возникали новые и модифицировались известные подходы к их конструированию и использованию. Происходила детализация механизма действия, обнаруживались дополнительные мишени для известных и новых пробиотиков (антиоксидантная, противовоспалительная, антимутагенная активности, влияние на психический статус, эпигенотип, кворум-сенсинг и т.д.), велась селекция пробиотических штаммов среди доминирующих видов и тех, которые постоянно присутствуют в небольших количествах в том или ином биотопе, создавались симбиотические пробиотики на основе штаммов, одновременно участвующих в реализации определенной физиологической функции, биохимической или поведенческой реакции или их обогащение наночастицами низкомолекулярных соединений («функциональные» пробиотики). Пробиотики стали дифференциировать на те, которые предназначались для большинства человеческой популяции и для специфических контингентов, включая для персонального использования. Накапливаемые научно-экспериментальные данные послужили основой для использования известных пробиотиков в качестве стартерных культур в биотехнологии для промышленного производства субстанций с биологической и/или фармакологической активностью. Со временем спектр пробиотических средств начал пополняться генно-инженерными пробиотиками с внедрением в их геном генов, ответственных за синтез антимикробных, иммуномодулирующих или иных субстанций. Появились сообщения о разработке и внедрении в медицинскую практику приемов трансплантации фекального содержимого. Одновременно выявились и ряд негативных моментов при использовании пробиотиков на основе живых микроорганизмов. Оказалось, что в ряде случаев невозможно четко определить оптимальное количество бактерий для оказания пробиотического эффекта; нередко назначение пробиотиков осуществляется без достаточно четких знаний механизмов и мишеней их приложения; у многих пробиотиков заявленный позитивный эффект кратковременен, отсутствовал или не ясно выражен. Появились сообщения, что пробиотики не являются полностью безопасными для человека даже, если они принадлежат к *Lactobacillus* или *Bifidobacterium* видам. Ситуация становится еще более сложной, если пробиотические штаммы принадлежат к *Enterococcus, Streptococcus, Escherichia, Bacillus, Bacteroides* или другим родам. Оказалось также, что некоторые штаммы пробиотических микроорганизмов способны в определенных условиях вызывать оппор-

тунистические инфекции, аллергические осложнения, аутоиммунные нарушения, аггрегацию тромбоцитов, модифицировать экспрессию генов в бактериях и клетках, осуществлять перенос генов антибиотикорезистентности ивтрудентности. В качестве альтернативы были предложены пребиотики (пищевые ингредиенты, селективно стимулирующие рост и/или активность(и) одного или ограниченного количества представителей рода(ов)/вида в кишечной микробиоте, которые оказывают позитивные эффекты на организм хозяина). К настоящему времени спектр пребиотиков достиг внушительных размеров и включает несколько десятков спиртов, олигосахаридов, полисахаридов, ферментов, пептидов, растительных и микробных экстрактов и т.д. Объемы их производства достигли сотен тысяч тонн ежегодно. Помимо пребиотиков, дальнейшей эволюцией концепции пробиотиков стало внедрение в медицинскую практику так называемых метабиотиков (структурные компо-ненты пробиотических (симбиотических) микроорганизмов и/или их метаболиты и/или сигнальные молекулы, способные оптимизировать физиологические функции, регуляторные, метаболические и/или поведенческие реакции через модификацию активности индигенной микрофлоры или эукариотических клеток хозяина). В перспективе в спектр метабиотиков могут войти десятки и сотни соединений микробного происхождения. Пребиотики и метабиотики могут назначаться как самостоятельно, так в качестве обогащающих добавок к известным или новым пробиотическим средствам (синбиотики, метапробиотики, метапребиотики, метасинбиотики). Метабиотики имеют ряд преимуществ. Они имеют известную химическую структуру, более четкие мишени приложения, их лучше дозировать и контролировать на безопасность; они имеют более длительный период сохранности, лучше абсорбируются, метаболизируются, распределяются по организму, тканям и органам, быстрее и в большей степени элиминируются из организма. В последние годы активно ведется поиск пробиотиков и метабиотиков, поддерживающих стабильность генома, микробиома, антиоксидантного и/или нейрогормонального гомеостаза и/или репарирующих структурные нарушения в ДНК и РНК; идет поиск модуляторов эпигеномной регуляции фенотипической экспрессии генов, активаторов или ингибиторов информационного обмена прокариотических, эукариотических клеток и между ними. В плане развития концепции пробиотиков создаются национальные криогенные банки микробиоценозов человека для долговременного сохранения биоразнообразия его микробиоты при низких температурах (от -80° до -196°С); на их базе предполагается конструировать аутопробиотики с целью назначения последних тем лицам, чьи фекальные трансплантанты были помещены в криобанки. Поскольку программа развития человека формируется в первые тысячу дней его жизни, и в процессах программирования участвуют соединения как пищевого, так и микробного происхождения, несомненно актуальным и целесообразным становится искусственное формирование симбиотической микробиоты матери и ребенка. В настоящее время у микроорганизмов, в том числе симбиотических, выявлено более 500 генов, детерминирующих патогенный их потенциал и около двухсот генов, ответственных за резистентность к

различным антимикробным соединениям, включая антибиотики и другие лечебно-профилактические лекарственные средства. Появились сообщения о возможности при разработки новых типов пробиотиков использовать также приемы новой области человеческих знаний (синтетической биологии), которые позволяют удалять или добавлять в штаммы потенциальных пробиотиков большие или малые по размеру генетические фрагменты, повышающие эффективность данных корректоров микробной экологии и придающие им целевую безопасность. Речь идет даже о разработки новых биологических систем, в том числе тех, которые ранее никогда не обнаруживались в природе. С учетом потенциальной обратимости эпигенетических изменений начинают разрабатываться пробиотики/метабиотики, которые, могут активировать или ингибировать соответствующие эпигенетические процессы и сигнальную трансдукцию. Предполагается, что таким образом удастся повысить устойчивость человека к негативным средовым воздействиям, и позволит эффективно бороться с патологиями, возникающими, как результат эпигеномных или информационных нарушений. Любые антимикробные соединения всегда рассматривались как негативные факторы, в отношения целостности структуры и функций микробиоты. Между тем в последнее время для коррекции микроэкологических нарушений вновь стали рекомендовать некоторые неабсорбируемые в кишечнике антимикробные соединения (фаги; бактериоцины, другие антимикробные пептиды, новые антибиотики и т.д.), которые направленно ингибируют рост или элиминируют в конкретном биотопе несвойственные ему микроорганизмы, в первую очередь, оппортунистические патогены. Для лучшего понимания взаимодействия человека и его микробиоты в экспериментальные и клинические исследования все шире внедряются современные ОМИК-технологии (геномика и ее разновидности патогеномика, пробиогеномика, транскриптомика и ее разновидность РНКомика, протеомика и ее разновидность интерактомика, метаболомика и ее разновидность флуксомика, эпигеномика, феномика), а также различные экспериментальные модели (безмикробные животные и гнотобионты различного рода, в том числе инокулированные симбиотической микробиотой, взятой от людей различного возраста, пола, расы и т.д.). В ближайшие десятилетие нам будут лучше понятны молекулярные и клеточные механизмы взаимодействия человека и его симбиотической микробиоты у здоровых и больных людей, что позволит разрабатывать более эффективные пробиотические биологически активные добавки, лекарственные препараты и продукты функционального и персонального питания для профилактики и лечения многих метаболических заболеваний, ассоциированных с микроэкологическими нарушениями, изменениями микробного эпигенетического ремоделирования хроматина, ДНК и белков.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛАКТОСОДЕРЖАЩИХ ПРОБИОТИКОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

Леонтьева Н.И. [1], Щербаков И.Т. [1], Грачева Н.М. [1], Хренников Б.Н. [2], Соловьева А.И. [1]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора;

[2] Клиническая инфекционная больница № 1, Москва

leonteva-nina@yandex.ru

Известно, что при хеликобактерной инфекции всегда поражается слизистая оболочка в гастродуоденальной зоне желудочно-кишечного тракта [1].

Для эрадикации пилорического хеликобактера практикующие врачи используют эрадикационные схемы утвержденные и получившие дальнейшее развитие в Маастрихтских соглашениях 2000–2005 гг. [2].

Используемые в этих эрадикационных схемах антибиотики широкого спектра действия оказывая санирующий эффект, негативно влияют на состояние микрофлоры слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) и ее морфофункциональное состояние, ухудшая качество жизни пациентов [4, 5].

Цель исследования.

Изучить клинико-лабораторную эффективность лактосодержащих пробиотиков в составе комплексной терапии на течение хронических заболеваний ЖКТ, ассоциированных с Helicobacter pylori (Hp).

Материал и методы исследования.

После подписания информированного согласия каждым пациентом в исследование было включено 215 больных с хроническими заболеваниями верхних отделов ЖКТ (ВО ЖКТ), ассоциированных с Hp (хронический гастрит, хронический гастродуоденит и др.), в возрасте от 18 до 76 лет (средний возраст 57,2 года), мужчин – 70, женщин – 145. В зависимости от проводимого лечения были сформированы 3 рандомизированных группы. Все наблюдавшиеся больные основной группы и группы сравнения наряду с пробиотиками получали антибактериальную эрадикационную терапию I линии (ЭТ I линии) в течение 10 дней, включающую омез 20 мг 2 р/день, кларитромицин 0,5 2 р/день, амоксициллин 1000 мг 2 р/день. Пациентам основных групп с первого дня эрадикационной терапии был назначен линекс по 2 капсулы 2 раза в день и лактобактерин 5 доз 2 раза в день на 20 дней. После окончания эрадикационной терапии все больные продолжали прием омепразола 20 мг в сутки в течение 3 недель.

Критерии включения больных в исследование: наличие хронических заболеваний гастродуоденальной зоны и выявление Hp всеми использованными в работе методами, отсутствие в анамнезе указаний на прием в течение 6 месяцев, предшествующих данному исследованию, препаратов, нормализующих микробиоценоз кишечника.

Критериями исключения больных из исследования являлись осложненная язвенная болезнь, оперативные вмешательства по поводу язвенной болезни,

беременность, лактация, прием антисекреторных и антибактериальных средств более чем 5 дней в течение 4 недель, а также больные, получавшие ранее антихеликобактерную терапию, предшествующих первому осмотру.

Всем больным наряду с общепринятыми клинико-лабораторными тестами проводилась эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) с биопсией слизистой оболочки тела и антрального отдела желудка, а также луковицы и дистальных отделов двенадцатиперстной кишки для оценки ее состояния и морфометрической характеристики гастродуоденальной зоны (ГДЗ). Для выявления Нр использовались цитологический, гистологический и быстрый уреазный тест (Хелпил-тест и Хелик-тест), которые выполнялись по общепринятым методикам. Интерпретация результатов эндоскопического и гистологического исследования базировалась на критериях Сиднейской системы. Микробиологическое исследование фекалий с качественной и количественной оценкой состояния микробиоценоза кишечника проводилось по общепринятым методикам.

Полученные результаты.

При бактериологическом исследовании микрофлоры кишечника у 105 пациентов, получавших ЭТ I линии, были выявлены нарушения состава облигатной, факультативной и остаточной микрофлоры толстой кишки, которые характеризовались в 100% случаев снижением количества бифидо- и лактобактерий, и соответствовали ДКI – 57,1% и ДКII – 42,9 %.

В микрофлоре кишечника выявляли кишечную палочку с измененными свойствами – лактозонегативную, гемолизирующую (7 чел.), энтерококки (6 чел.), золотистый стафилококк (2 чел.), повышенное содержание клостридий и грибов рода Candida (7 чел.).

Проведенные исследования показали значительный положительный эффект лактосодержащих пробиотиков (ЛСП) на сроки купирования основных клинических симптомов: улучшения самочувствия, нормализации стула, исчезновения явлений интоксикации, абдоминальных болей, диспептических явлений ($p<0,001$). Кроме этого было выявлено положительное влияние на микробиоценоз кишечника, что проявлялось уменьшением числа пациентов с ДКIII и увеличением числа лиц с нормальными и слабо выраженными дисбиотическими нарушениями (норма и ДКI) (табл.1).

Таблица 1.

Состояние микрофлоры кишечника у больных с Нр-ассоциированными заболеваниями ВО ЖКТ, получавшими в комплексной терапии линекс

Степень кишечного дисбиоза	Количество больных						
	Основная группа (ЭТ + линекс) (n=40)			Группа сравнения (ЭТ) (n=105)			
	до лечения	после лечения	p	до лечения	После лечения	P_1	P_2
норма	–	12,5*	P=0,00040	–	–	–	
I	37,5	62,5*	p=0,01241	57,1	–	p<0,001	
II	47,5	20,0*,**	p=0,00081	42,9	71,4*	p=0,00768 p<0,01	p<0,001
III	15,0	5,0*,**	p=0,02534	–	28,7		

Примечание: M±m- *p<0,05 по сравнению показателей с группой нормы; **p< 0,001 по сравнению показателей исследуемых групп до и после лечения.

Включение ЛСП в комплексную терапию хеликобактериоза оказывало стимулирующее влияние на рост представителей индигенной микрофлоры (бифидо- и лактобактерий, полноценных эшерихий) относительно группы сравнения (p<0,05), а также выраженность воспалительных изменений в слизистой оболочки толстой кишки (СОТК). Морфологическая картина СОТК у исследуемых групп представлена в табл.2.

Таблица 2.

Состояние слизистой оболочки толстой кишки у больных хеликобактериозом до и после эрадикационной терапии и терапии с включением лактосодержащих пробиотиков

№	Морфометрические показатели	норма n=6	до лечения n=26	ЭТ n=8	Лактобактерин n=11	линекс n=10
1.	Толщина СОТК, мкм	427±27	528±31 [1]	517 ±64	497±56	619±124
2	Глубина крипт, мкм	407±25	474±32,5	489±69	442±54	519±71
3	Высота ПЭ, мкм	34,4±3,8	28,9±0,6	30,8±2,3	26,7±2,5	29,6±2,1
4	Высота ЭК, мкм	26,1±0,7	24,2±0,7	24,4±1,2	26,0±0,9	27,5±1,9
5	Мукоциты ПЭ, %	12,5±1,6	13,9±0,5	11,7±1,6	15,3±1,2	15,1±2,0
6	Мукоциты ЭК, %	37,7±2,4	40,6±1,6	36,4±2,8	42,4±3,3	46,0±2,3 [2]
7	Лимфоциты ПЭ, %	10,5±1,8	16,2±0,4[1]	11,3±1,1[1]	13,8±0,7 [1]	12,5±0,8 [1]
8	Лимфоциты ЭК, %	11,1±1,0	11,5±0,6	11,1±0,6	12,9±0,5 [2]	11,3±0,4 [3]
9	Эозинофилы ПЭ,%	0,2±0,2	1,15±0,2[1]	1,0±0,2[2]	0,5±0,2 [1]	0±0 [1, 2, 3]
10	Эозинофилы ЭК, %	0±0	0,5±02[1]	1,0±0,3[2]	0,7±0,2 [3]	0±0 [1, 2, 3]
11	Нейтрофилы ПЭ,%	0,2±0,2	0,85±0,2[1]	0,7±0,2	0,3±0,1 [1]	0±0 [1, ,2, 3]
12	Нейтрофилы ЭК,%	0±0	1,4±0,07 [1]	0,6±0,1[1, 2]	0,5±0,1 [1, 3]	0±0 [2, 3]
13	Митозы ЭК, %	1,2±0,2	1,3±0,1	1,3±0,2	1,2±0,08	1,3±0,1
14	ЕС-клетки ЭК, %	0,9±0,1	0,4±0,09[1]	0,3±0,1[2]	0,6±0,1 [2 3]	1,7±0,2[1, 2, 3, 4]
15	Плотность инф., на 1мм^2	6780±239	10997±251[1]	12019±1350[2]	11682±389[3]	8866±515[1, 2, 3, 4]

16	Лимфоциты инф., на 1мм^2	2465±227	3666±110[1]	4206±365[2]	4032±365[3]	2862±228[1, 2, 3]
17	Плазмоциты инф., на 1мм^2	1275±74	2349±72[1]	2578±383[2]	2165±281[3]	1722±188[1, 2, 4]
18	Макрофаги инф., на 1мм^2	318±32	799±59[1]	542±77 [1, 2]	877±69[2]	616±91[3, 4]
19	Фибробласты инф., на 1мм^2	1319±45	1761±81[1]	1832±173[2]	2017±207	1509±105[3]
20	Фиброциты инф., на 1мм^2	1058±69	1766±94[1]	2071±433[2]	1840±143	1477±178
21	Эозинофилы инф., на 1мм^2	23±19	314±25[1]	432±81[2]	312±67	157±28[1, 2, 3, 4]
22	Нейтрофилы инф., на 1мм^2	0±0	70±5[1]	153±36[1. 2]	240±24[1]	9±6[1, 2, 3]
23	Лаброциты инф., на 1мм^2	508±43	399±16[1]	306±45[2]	352±27	490±52[2, 3]

Примечание: верхний индекс указывает номер графы, с показателями которой имеются достоверные различия ($p<0,05$).

В СОТК у больных хеликобактериозом до лечения была выявлена картина хронического катарального и катарально-геморрагического колита с умеренной и выраженной активностью патологического процесса, без атрофии кишечных желез. При этом от нормы отличались 65,2% учитываемых морфометрических показателей СОТК. Отмечалось увеличение толщины СО. В поверхностном эпителии содержание межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов было повышенным. В эпителиальном пласте кишечных желез также было увеличено содержание эозинофилов и нейтрофилов, но снижено количество серотонинпродуцирующих эндокриноцитов (ЕС-клеток). В собственной пластинке СОТК возрастала плотность воспалительного клеточного инфильтрата ($p<0,001$) за счет увеличения лимфоцитов, плазмоцитов, макрофагов, фибробластов и фиброцитов, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, тогда как число лаброцитов было ниже физиологической нормы.

После курса ЭТ (через 8–14 дней) в колонобиоптатах СОТК пациентов группы сравнения оставались морфологические признаки хронического постэрадикационного катарального и катарально-геморрагического колита, чаще с выраженной активностью процесса. По сравнению с исходным состоянием, несколько ($p>0,05$) снижалось содержание МЭЛ в поверхностном эпителии СОТК и количество нейтрофильных гранулоцитов в эпителии кишечных желез, уменьшалось количество макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов в воспалительном инфильтрате собственной пластинки.

Включение ЛСП в схемы ЭТ вызывало уменьшение инфильтрации поверхностного эпителия МЭЛ, эозинофильными и нейтрофильными грануло-

цитами. В поверхностном и железистом эпителии СОТК уменьшалось содержание межэпителиальных эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов ($p<0,001$); в эпителии кишечных желез снижалось содержание МЭЛ и более значительно возрастало число ЕС-клеток; в собственной пластинке СОТК уменьшалось количество клеточных элементов, и снижалась плотность клеточного инфильтрата за счет лимфоцитов, макрофагов, фибробластов, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов и увеличивалось содержание лаброцитов. Морфометрические исследования выявили более выраженный эффект при включении линекса в схемы комплексной терапии. Так после курса лечения ЛБ, эпителиальный пласт кишечных желез инфильтрирован эозинофилами; в собственной пластинке СОТК на фоне высокой плотности воспалительного клеточного инфильтрата количество нейтрофильных гранулоцитов даже увеличивалось ($p<0,001$). В эпителии кишечных желез сохранялась инфильтрация эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами, а количество ЕС-клеток – сниженным. В собственной пластинке СОТК сохранялась на высоком уровне плотность воспалительного клеточного инфильтрата за счет увеличения содержания лимфоцитов и плазмоцитов.

Таким образом, проведенные комплексные исследования у больных с хроническими заболеваниями ГДЗ, показали выраженный терапевтический эффект на характер и выраженность дисбиотических нарушений в микрофлоре кишечника. Морфологические исследования позволили выявить у больных хеликобактериозом на фоне ЭТ утяжеление степени активности хронического колита, а включение в комплексную терапию ЛСП оказывало положительное влияние на процессы репарации в СОТК, снижая в ней выраженность воспалительных изменений, подтвержденных результатами морфометрического исследования. При этом под влиянием линекса более значимо снижалась плотность клеточного инфильтрата в собственной пластинке СОТК, отмечалось уменьшение в нем числа плазмоцитов и повышалось количество макрофагов и эозинофильных гранулоцитов.

Литература:

1. Аруин Л.И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л.И. Аруин, Л.Л. Капуллер, В.А. Исаков. – Москва: Триада-Х, 1998.

2. Исаков В.А., Доморадский И.В. «Хеликобактериоз». М. – ИД «Медпрактика», 2003, 412 с.

3. Циммерман Я.С. Клиническая гастроэнтерология: избранные разделы / Я.С. Циммерман. – М.,: Гоэтар – Медиа, 2009, 416 с., илл.

4. Чернин В.В. Болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки: Руководство для врачей / В.В. Чернин. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2010. – 528 с.

5. Калинин А.В. Гастроэнтерология и гепатология: диагностика и лечение. Под ред. Калинина А.В. и Хазанова А.И. Руководство для врачей. М., Миклош – 2007, гл.6, с. 59–70.

АЛГОРИТМ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА В ПОПУЛЯЦИОННОМ БИОТОПЕ ЧЕЛОВЕКА

Лахтин М.В.[1], Лахтин В.М.[1], Афанасьев С.С.[1], Байракова А.Л.[1], Беликова Е.В.[1], Агапова Ю.В.[1], Алешкин В.А.[1], Афанасьев М.С.[2], Караулов А.В.[2]

[1] ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского;

[2] ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»

lakhtinv@yandex.ru

Взаимоотношения между пробиотическим и условно патогенным компартментами микробиоценоза определяют баланс в биотопах, их устойчивость к инфекциям. Лактобациллы и кандиды представляют собой сенсорную количественно выраженную в урогенитальном биотопе (УБ) систему, чувствительную к антибиотикам [1].

Данное исследование посвящено разработке алгоритма прогнозирования взаимоотношений лактобацилл, кандид и антибиотиков в УБ.

Штаммы микроорганизмов были изолированы из УБ пациентов городской популяции, проходивших осмотр в КДЦ при МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Исследовали идентифицированные штаммы лактобацилл *L. acidophilus* 106, 124, 183а; *L. casei* 124б, 183; *L. brevis* 104, 109, 143; кандид (в скобках – резистентность к антибиотикам, обозначения смотри ниже) *C. albicans* 3 (Амф), 23 (Ит, Фл), 26 (Амф), 45 (Амф), 116, 147, 161, 320 (Амф); *C. krusei* 5 (Амф, Ит), 60 (Амф, Ит), 125 (Амф, Ит), 135 (Амф), 185 (Амф, Ит, Кло), 309 (Амф, Ит, Ке, Фл); *C. tropicalis* 97, 112, 144, 162, 417 (Амф, Кло, Фл), 433, 438, 897 (Амф, Кл, Фл). Исходные суспензии штаммов микроорганизмов в физрастворе с мутностью 1 ед (по шкале МакФарланда) смешивали попарно (лактобациллы + кандиды) в среде MRS в лунках полистироловой микропанели в оптимизированном соотношении (40 + 40 + 170 = 250 мкл) и инкубировали 2 суток при 37°С. Лунки промывали водой и фиксировали этанолом, биопленки (БП) обрабатывали виолетовым красителем (10 мин, комнатная температура), избыток красителя удаляли, лунки промывали водой и БП фотографировали и сканировали. Краситель экстрагировали 30% раствором уксусной кислоты, экстракты переносили в новые микропанели и измеряли поглощение при 620 нм. Использовали стандартные диски с антибиотиками: азитромицином (Аз), амоксициллином (Амо), амфотерицином (Амф), гентамицином (Ге), доксициклином (До), итраконазолом (Ит), кетоконазолом (Ке), кларитромицином (Кла), клиндамицином (Кли), клотримазолом (Кло), нистатином (Ни), флюконазолом (Фл), цефалексином (Це) и ципрофлоксацином (Ци). Метаболизм лактобацилл исследовали с помощью ANAEROtest 23 (PLIVA-Lachema). Результаты усреднены не менее чем по трем измерениям.

Результаты и их обсуждение.

1. Штаммы лактобацилл типировали по выраженности БП. Типы включали (БП в % от максимального поглощения экстракта из пленки лактобацилл; *достоверные отличия [P < 0.05] от шт. 124 и между шт. 143 и 109): I (75–100%, выраженные БП) – шт. 183 [0.286*±0.031; 100%], шт. 143 [0.236* ±0.069; 83%]; II (25–75%, умеренные БП) – шт. 183а [0.139*±0.015; 49%], шт. 109 [0.102* ±0.014; 36%], шт. 106 [0.100*± 0.012; 35%], шт. 104 [0.084* ±0.005; 29%]; III (0–25%, слабые и не регистрируемые БП) – шт. 124б [0.068* ± 0.005; 24%], шт. 124 [0.058±0.006(22); 20%]. Лактобациллы типов I и II могут служить источниками поверхностно клеточных лектинов, а III – секретированных в среду лектинов. Штаммы *L. acidophilus* 106 и *L. brevis* 104 уменьшали БП мультиантибиотикорезистентных штаммами *C. krusei* 185 (также действовали *L. acidophilus* 124 и *L. brevis* 143) и *C. tropicalis* 897. В целом, выявленные антимикотические штаммы лактобацилл обладали повышенным ингибирующим БП кандид действием в отношении штаммов *C. albicans* и *C. tropicalis* (ингибирование 60–80%) по сравнению со штаммами C. krusei (ингибирование 40–60%).

2. Ранжировано снижение выраженности БП лактобацилл: а) у монокультур: 183>143>183а>106, 109>104>124б >124; б) у смесей (влияние на каждый штамм лактобацилл пула кандид): 124б>124>183>143>183а>106>109 >104. Штаммы *L. acidophilus* 124 и *L. casei* 124б – лидерные: их удаление приводит к идентичности обеих указанных выше последовательностей. Оба эти штамма сцеплены с метаболизмом пула кандид, обладают потенциальным пробиотическим действием. Выраженность БП наиболее сильно варьировала у штаммов *C. albicans* (меньше – у *C. tropicalis*). Ранжировано снижение выраженности БП кандид: а) у монокультур: 438>23>144>116>135>5>897>97>147>309 >3> 162 >26>320; б) у смесей (влияние на каждый штамм кандид пула лактобацилл): 23>309>320>147>144>135>97>5>438>897>162, 116>3, 26. Пул лактобацилл больше всего влиял (достигался максимальный разброс позиций в последовательностях «а» и «б») на антибиотикорезистентные штаммы *C. albicans* 320 и, в меньшей степени, *C. krusei* 309. Можно прогнозировать, что в БП смесей с этими штаммами лактобациллы сильно выражены, что значительно снижает патогенный потенциал биопленки (замещение БП повышенного риска на БП меньшего риска развития инфекции).

3. На фоне повышенной чувствительности видов лактобацилл к Аз, Ам, Ге, До, Кла, Кли, Це и Ци наблюдалась сниженная чувствительность штаммов лактобацилл к Аз (шт. 106 и 124), Ге (шт. 104, 106, 124, 183а) и Кли (шт. 104, 106, 124, 183а). Наблюдалась сравнительная устойчивость шт. 106 и 124 к Кла/Кли > Ге, а шт. 183а к Кли > Ге, а также устойчивость к Кли у *L. acidophilus* > *L. brevis*. Таким образом, при использовании Аз, Кли и/или Ге в терапии можно ожидать в УБ существенного антимикробного действия лактобацилл *L. acidophilus* (имеющихся в биотопе или привнесенных туда в составе мультипробиотиков; при этом могут быть снижены терапевтические дозы антибиотиков). Кандиды УБ характеризовались снижением чувствительности к каждому типу антимикотика в ряду (в скобках – число резистентных

штаммов): Ни (0) > Ке (1) > Кло (3) >Фл (4) > Ит (6) > Амф (12). Амф проявлял свойства универсального маркера резистентности исследованного пула рода кандид, а Ни – универсального маркера чувствительности пула кандид. Чувствительность видов к Кло снижалась в последовательности *C. albicans* > *C. krusei* > *C. tropicalis*. Кло проявлял свойства внутриродового межвидового переключателя в пределах функциональной группы «*C. albicans* + *C. tropicalis*». Внутривидовая чувствительность кандид к антимикотикам снижалась (в скобках – диаметры зон без роста, мм): *C. albicans* (8 штаммов): Ке (21.4) >> Кло (16.9) ≥ Фл (16), Ни (16) >> Ит (12.0) >> Амф (6.5); *C. krusei* (6 штаммов): Ни (18.0) >> Ке (14.3) > Фл (12.0), Кло (11.7) >> Ит (2.0) >> Амф (0); *C. tropicalis* (8 штаммов): Ке (23.8) >> Ни (19.0) >> Фл (14.3) > Ит (12.8) > Амф (11.3) > Кло (10.0). Во всех внутривидовых последовательностях присутствовала характерная для рода последовательность Ке > Фл > Ит > Амф. Таким образом, Ни и Кло проявляли свойства лидерных (сцепленных с метаболизмом кандид; вместе с лидерными лактобациллами – двойной прессинг в отношении регуляции кандидного пула) антибиотиков (максимально варьирующих в видовых последовательностях УБ). Результаты демонстрируют возможности исследования антибиотиков как переключателей внутримикробиоценозных таксонов УБ.

Метаболическая видоспецифичная активность лактобацилл снижалась в ряду (в скобках – утилизируемые углеводы, индикаторные реагенты): *L. brevis* [галактоза, манноза, лактоза, раффиноза, эскулин] > *L. casei* [сахароза, мальтоза, эскулин] > *L. acidophilus* [раффиноза, эскулин]. Таким образом, лидерные штаммы *L. acidophilus* 124 и *L. casei* 124б (тип III) характеризуются менее выраженным разнообразием ферментов углеводного обмена на фоне присутствия более выраженных протеолитических и оксидоредуктазных систем (показано ранее нами) по сравнению с *L. brevis*. С другой стороны, видоспецифичная метаболическая активность кандид снижается в ряду: *C. tropicalis* [мальтоза, ксилоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза] > *C. albicans* [мальтоза, ксилоза, сахароза] > *C. krusei* [уреаза]. У кандид и лактобацилл при наличии одинаковых субстратов имеются возможности переключения на альтернативные (особенно в условиях усиления разнообразия на уровне ди- и олигосахаридных мишеней). Группа *«C. tropicalis + C. albicans»* сориентирована на углеводы, в отличие от кандид *C. krusei*. Таким образом, модельная система противопоставленных и кофункционирующих видов является метаболически взаимодополняемой, охватывающей широкую метаболическую сеть биотопа, заметно влияющую на биотопный баланс. Способность антибиотиков (например, Кло) к межвидовому переключению, по-видимому, будет облегчена вкладом локально возникающего дисбаланса между близкими видами в борьбе за субстраты. При этом метаболиты лактобацилл (ингибиторы гидролаз, лектины, прочие антигрибковые вещества) создают дополнительный прессинг на пул кандид, усиливая видовой дисбаланс и действие лидерных антибиотиков.

Таким образом, прогностический алгоритм состояния ПУБ включает:

1. Выявление новых антимикотических штаммов микробов (лактобацилл *L. brevis, L. casei* и *L. acidophilus* [штаммы 104, 106, 124, 183а со

сниженной антибиотикочувствительностью], супрессирующих БП антибиотикорезистентных штаммов кандид *C. albicans, C. tropicalis* и *C. krusei*). 2. Выявление лидерных штаммов среди пулов лактобацилл и кандид и панели антибиотиков. 3. Выявление других метаболических особенностей противостоящих сторон. 4. Предложение антимикробных стратегий и основанных на них процедур и режимов использования антибиотиков (как регуляторов микробных таксонов в дисбалансированном биотопе), антибиотиков и лактобацилл (перераспределение мишеней) для профилактики, лечения болезней (главных и сопутствующих), достижения ускоренной и полной реабилитации (в условиях антибиотико- и химиотерапии, постхирургической).

Алгоритм может быть использован в конструировании антимикробных мультиконсорциумов**.** Результаты обосновывают перспективы прогнозирования состояний популяционных биотопов в рамках развития популяционной медицинской микробиологии/ биотехнологии/эпидемиологии.

Резюме.

Предложен алгоритм прогностической оценки взаимоотношений лактобацилл, кандид и антибиотиков в биотопе на примере УБ. Выявлены противогрибковые штаммы лактобацилл. Установлены лидерные штаммы взаимовлияния между пулами лактобацилл и кандид. Дана оценка антибиотикам как регуляторам переупорядочивания таксонов (видов) условно патогенных микробов (дрожжеподобных кандид) в дисбалансированном биотопе. Прогностическая оценка позволяет предложить для конкретного популяционного биотопа (УБ) конкретные пути усиления пробиотикоподобного и ослабления условно патогенного компартментов, выработать конкретные антимикробные стратегии, в зависимости от профилактической и/или терапевтической задачи.

Литература:

1. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Bajrakova A.L., Afanasiev S.S. *Candida albicans*: New aspects of pathogenicity, interaction to antifungals, biofilms and preventive anti-*Candida* strategies – The overview of own works // In the Book: *«Candida albicans*: Symptoms, Causes and Treatment Options*»* . Eds L.A. Dietrich and T.S. Friedmann. New York: Nova Science Publishers, 2013. – P. 145–152. ISBN: 978-1-62808-882-3.

ЗНАЧЕНИЕ НУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА-kB И МИТОГЕН-АКТИВИРОВАННЫХ КИНАЗ В РЕГУЛЯЦИИ АДГЕЗИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БУККАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИОЦИТОВ С CANDIDA ALBICANS

Лукова О.А., Александрова Н.А., Заславская М.И.

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород

olga_domracheva@bk.ru; maya_zaslav@rambler.ru

Candida albicans являются одними из наиболее распространенных возбудителей оппортунистических инфекций [1, 2]. Значительный вклад в антикандидозную защиту вносят различные механизмы резистентности слизистых оболочек, в частности, реактивность эпителиальных клеток [3, 4]. Контакт микроорганизмов с эпителиоцитами слизистых оболочек приводит к активации последних и трансляции регоносцировочного сигнала на генетический аппарат клетки. Передачу сигналов от внеклеточных стимулов внутрь клетки обеспечивают нуклеарный фактор NF-*κ*B – система внутриклеточных белков-регуляторов генной транскрипции [5] и группа митоген-активированных киназ (MAP-киназ) – ферментов, активирующихся по каскадному механизму [6]. При участии данных сигнальных путей осуществляется продукция клетками цитокинов, адгезивных молекул межклеточного взаимодействия, внутриклеточных ферментов и пр. [7, 8, 9]. В то же время, недостаточно изучен их вклад в регуляцию контакта эпителиальных клеток с микроорганизмами. В связи с этим, целью нашей работы было определение возможности участия нуклеарного фактора NF-*κ*B и митоген-активированных киназ ERK1/2 и p38 в реализацию адгезивных взаимодействий буккальных эпителиоцитов человека с *C. albicans.*

В работе использовали *C. albicans* штамм 601 из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии Нижегородской государственной медицинской академии. Культуру *C. albicans* получали в дрожжевой фазе на агаре Сабуро (24 часа, 37°С). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), отмывали и ресуспендировали в концентрации 10^7 кл/мл в ЗФР. Буккальные эпителиоциты получали от здоровых доноров 18–20 лет, отмывали ЗФР и готовили взвесь с концентрацией 10^6 кл/мл.

Для изучения адгезивных взаимодействий в системе «буккальные эпителиоциты – *C. albicans»*, равные объемы взвеси клеток человека и кандид инкубировали в течение 30 мин при 37°С, затем эпителиоциты отмывали ЗФР от неприкрепившихся кандид. Из осадка клеток готовили мазок, который, после фиксации метанолом, окрашивали 0,25% раствором азура А («Sigma», США). Определяли индекс адгезии (усл. ед.) как среднее количество кандид в пересчете на один эпителиоцит (учитывали 100 клеток).

Для изучения вклада NF-*k*B и MAP-киназ в процесс взаимодействия эпителиоцитов человека с *C.albicans*, проводили исследования в режиме ингибирования транскрипционного фактора NF-kB или блокирования MAP-

киназ. Для этого, клетки предварительно инкубировали (90 мин, 37°С, 100 μМ) с ингибитором протеасом – ALLN (N-acetyl-leucinyl-leucinyl-norleucinal), тормозящим активацию NF-*κ*B [10]. В качестве специфического ингибитора ERK1/2 использовали U0126 (Sigma, США) [6], ингибитора p38 MAP-киназы – SB203580 (Sigma, США) [11] в конечной концентрации 20 мкМ. Перед проведением эксперимента, клетки человека инкубировали (1 час, 37°С) с раствором ингибитора МАР-киназ. Контролем служили пробы без ингибиторов. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы STADIA 4.10.

Участие сигнальных путей в регуляции адгезии в системе «буккальные эпителиоциты – кандиды» оценивали по количеству *C. albicans*, прикрепившихся к эпителиальным клеткам после обработки последних ингибиторами NF-*k*B или МАР-киназ. Было установлено, что блокада NF-*k*B приводила к снижению адгезии кандид на эпителиоцитах в 1,7 ± 0,6 раза, которая составляла 6,6 ± 1,3 усл. ед. в контроле и 4,14 ± 0,87 усл ед. в экспериментах с ингибитором протеасом ALLN ($p< 0,05$). Ингибирование p38 киназы в буккальных эпителиоцитах не вызывало значимых изменений адгезивности эпителиальных клеток и показало 7,81 ± 1,03 усл. ед в опыте и 6,24 ± 0,64 усл. ед. в контроле ($p>0,05$); сходные результаты были получены и в экспе-риментах с ингибитором ERK1/2-киназ – 3,86±0,55 усл.ед и 3,89± 0,65 усл.ед соответственно ($p> 0,05$).

Таким образом, было установлено, что активация нуклеарного фактора NF-*k*B способна усиливать адгезивность эпителиальных клеток человека в отношении *C. albicans*. В то же время, внутриклеточные сигнальные пути, связанные с активацией p38 МАР-кины и ERK1/2-киназ, не сопряжены с регуляцией адгезивного аппарата эпителиоцитов, участвующего в контактах с *C.albicans*.

Литература:

1. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. М.: Триада – Х, 2001. – 472 с.

2. Симбарская М.Л., Долго-Сабурова Ю.В., Мирзабалаева А.К., Шабашова Н.В., Учеваткина А.Е. Иммуномодулирующая терапия в комплексном лечении рецидивирующего кандидозного вульвовагинита // Проблемы медицинской микологии, 2012. – № 3. – С. 32–37.

3. Cannon R.D., Holmes A.R., Mason A.B., Monk B.C.. Oral candida: clearance, colonization, or candidiasis? J. Dent. Res. 1995, 74(5): 1152–1161.

4. Гасанова Ф.М., Караев З.О. Естественная резистентность слизистых оболочек полости рта у больных оральным кандидозом и кандидоносителей // Проблемы медицинской микологии, 2008. – т. 10, № 2. – 11–13.

5. Barnes P.J., Karin M. Nuclear Factor-B - A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. New Engl. J. Med. 1997, 336 (15): 1066-1071.

6. Tian W., Zhang Z., Cohen D. M. MAPK signaling and the kidney // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 593–604.

7. Tato C.M., Hunter C.A. Host-Pathogen Interactions: Subversion and Utilization of the NF-kB Pathway during Infection // Infect. Immun. 2002. – Vol. 70, No. 7. – P. 3311–3317.

8. Zarubin T., Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway // Cell Research. – 2005. – Vol. 15. – № 1. – P. 11–18.

9. Pastore S, Mascia F, Mariotti F, Dattilo C, Mariani V, Girolomoni G. ERK1/2 regulates epidermal chemokine expression and skin inflammation // J. Immunol.-2005. – Vol.174. – No 8. – P. 5047–5056.

10. Dahan S., Busuttil V., Imbert V., Peyron J.-F., Rampal P., Czerucka. D. Enterohemorrhagic Escherichia coli Infection InducesInterleukin-8 Production via Activation of Mitogen- Activated Protein Kinases and the Transcription Factors NF-B and AP-1 in T84 Cells. Infect. Immun. 2002. – Vol. 70, No. 5 – P. 2304–2310.

11. Jiang Y., Chen C., Li Z., Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38b) // Biol Chem. – 1996. –Vol.271.– P. 17920–17926.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ УСТОЙЧИВОСТИ STAPHYLOCOCCUS AUREUS К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ (ПО РЕЗУЛЬТАТМ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ОБЗОРА)

Саперкин Н.В., Сидорова Н.Н., Алебашина Л.А.

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», Нижний Новгород

saperkinnv@mail.ru

В настоящее время проводится значительное количество исследований по изучению активности антимикробных средств. В то же время довольно часто оказывается нелегкой задачей получить доступ к достоверным результатам и доказательным данным о степени резистентности бактерий к антисептикам и дезинфектантам. Взаимосвязь между устойчивостью *in vitro* и неэффективностью дезсредства, по мнению некоторых исследователей, остается дискуссионным вопросом. В последнее время официальные документы всё чаще призывают по возможности сокращать использование биоцидов, улучшать политику их применения, оптимизировать инфекционный контроль и разрабатывать инновационные дезинфицирующие средства. В этой связи существенную роль играет грамотно организованный мониторинг устойчивости микроорганизмов к различным биоцидам.

Целью исследования является обобщение и критический анализ различных данных о наличии и распространенности устойчивости *S. aureus* к действующим веществам дезинфектантов и антисептиков путем проведения систематического обзора публикаций соответствующих оригинальных исследований. Указанный микроорганизм был избраны как одни из ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в ЛПО различного профиля и важный компонент госпитальной микрофлоры.

Методология поиска.

В период с декабря 2013 по февраль 2014 года проведен поиск информации в электронных базах данных *PubMed* и метапоисковой системе *TRIP*, без ограничений по дате публикации и языку.

Критерии отбора.

В работу включались все описательно-оценочные исследования, касающиеся информации представленной ниже:

– наличие и распространенность генов резистентности к биоцидам (в частности, генов *smr*, *qacA*,*B*,*C*,*G*,*H* для четвертичных аммониевых соединений);

– результаты сравнения значений минимальных ингибирующих концентраций (МИК) изучаемых культур с таковыми для тест-штаммов микроорганизмов;

– количественная оценка устойчивости штаммов к ДС среди изучаемых культур (в абсолютных числах и процентах).

Были определены следующие ***критерии исключения***: повторные публикации, содержащие сходные данные; публикации исследований, представляющие информацию только о резистентности *S.aureus* к антибиотикам; документы, в которых приводилось только оценка методов определения чувствительности к дезинфектантам на основе тест-штаммов микроорганизмов. Критериями качества исследований, включенных в настоящий систематический обзор, являлись четкое описание методики определения чувствительности бактерий к дезинфектантам, а также наличие в тексте необходимых цифровых данных, а именно точное указание на объем выборки, количество чувствительных и устойчивых культур и т.п. Понятие устойчивости микроорганизмов определялось как свойство микробов противостоять повреждающему действию механических, физических и химических факторов. Учитывалось, что устойчивость может быть и естественной, и приобретенной, возникающей в результате фенотипической или генотипической изменчивости. При выполнении поиска использовались следующие термины (одиночные и в сочетании с другими терминами): bacterial resistance, susceptibility, biocide, disinfectant, resistance gene, distribution of genes, minimal inhibitory concentration, antiseptic, staphylococcus aureus, chlorhexidine, triclosan, quaternary ammonium compound, benzalkonium chloride. Объектами исследования послужили культуры *S. aureus* (включая MRSA и MSSA), изолированные от пациентов и из внешней среды. Необходимо отметить, что в настоящий момент систематический обзор исследований в отношении других актуальных возбудителей ИСМП, в том числе ESKAPE-патогенов, продолжается. Просмотр результатов исследований и извлечение данных проводились независимо двумя авторами. Структура поисковых запросов информации была выстроена по следующему принципу:

– в поисковой системе *TRIP*: (resistance biocide staphylococcus aureus).

– в базах данных *PubMed*: ((resistance[ti] AND («disinfectants» [Pharmacological Action] OR «disinfectants» [MeSH Terms] OR «disinfectants» [All Fields] OR «biocide» [All Fields])) AND («staphylococcus aureus» [MeSH Terms] OR («staphylococcus» [All Fields] AND «aureus» [All Fields]) OR «staphylococcus aureus» [All Fields])) AND «staphylococcus aureus» [MeSH Terms]

Результаты и обсуждение.

Прежде всего необходимо отметить, что использованные нами базы данных содержали достаточно ограниченное число описаний оригинальных исследований, посвященных изучаемой проблематике. Наряду с тем, что несколько публикаций не соответствовали критериям включения, ряд ссылок

и URL-адресов оказались на момент проведения нашего исследования недействительными, хотя и были проиндексированы в использованных нами биомедицинских базах данных. Хронологические рамки публикаций, вошедших в настоящее исследование по изучению устойчивости *S. aureus* – 1960–2013 гг. В данный систематический обзор вошло всего 25 работ, посвященных изучению стафилококка, удовлетворявших условиям поиска. Отобранные публикации объединили суммарно 919 культур *S.aureus*. В разные периоды подходы исследователей к оценке устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам и стиль представления данных менялись: количественная оценка резистентных штаммов (в абсолютных числах и % от общего числа культур), изучение минимальных ингибирующих и минимальных бактерицидных концентраций, выявление и оценка распространенности генов устойчивости к дезинфицирующим и антисептическим средствам. Спектр биоцидных средств, с которыми производились эксперименты, отличает большое разнообразие. В то же время данные по чувствительности/устойчивости бактерий к ним весьма гетерогенны. Преобладали публикации, в которых рассматривались вопросы изучения резистентности стафилококка к хлоргексидина биглюконату и бензалкония хлориду: 14 и 8 работ соответственно. Триклозан был объектом изучения в меньшем числе исследований (3 работы). Все указанные дезинфицирующие широко используются в различных медицинских организациях, входят в рецептуры многих торговых марок, поэтому интерес исследователей к ним вполне очевиден.

Одним из первых зарубежных сообщений об устойчивости *S. aureus* (n=16) к дезинфицирующим средствам можно считать исследование, проведенное McNeil E. с соавт. в 1960 году. Бактерицидная активность алкилдиметиламмония хлорида авторами оценивалась путем обработки образцов ткани, а именно марли и муслина. Установлено, что только 82,2% (106/129) образцов марли и 89,1% (90/101) образцов муслина оказались обеззараженными полностью. Эффективность выбранного исследователями ЧАС весьма изменялась при разных концентрациях. Кроме того, Wille B. (1976) сообщил о наличии устойчивости у 5 изученных культур к растворам формальдегида и хлорамина80.

Выявление устойчивости к дезинфектантам у стафилококков неразрывно связано с изучением механизмов формирования такой резистентности, что представляется особенно важным, учитывая более достоверные данные по механизмам антибиотикорезистентности. В работах Kaulfers P.M. (1995) имеются указания на плазмидный механизм формирования устойчивости стафилококков, в частности, к ионам некоторых тяжелых металлов, гескахлорофену, формальдегиду, бензалкония хлориду и хлоргексидина биглюконату. Влияние эффлюксных систем ЧАС *S. aureus* на формирование устойчивости исследовано DeMarco C.E. с соавт. (2007). Авторами показано, что 49,1% изученных штаммов имели соответствующие системы. Причем к этидия бромиду они присутствовали у 100% культур, а к хлоргексидина биглюконату – у 96%.

Особо необходимо отметить работы, посвященные изучению распространенности генов резистентности к дезинфектантам. В частности, нами

определено 8 публикаций, касающихся *qac,* 5 работ – гена *smr*. Имелся разброс показателей, а именно: по данным разных авторов, гены *qacA/B* суммарно (т.к. этим генам присуща выраженная гомология) выявлялись в 0,7-94,6% *S.aureus*. В отношении только штаммов MRSA от 2,1 до 94,6% штаммов были носителями подобных генов. Есть основания говорить о гетерогенности показателей: от полного отсутствия (*qacG*) до наличия на высоком уровне. Распространенность гена *smr* находилась на уровне 3,6-44,2% стафилококков. Отмечалась также широкая распространенность *qacA* (0,6–33,7%), хотя показатели существенно варьировали. Более низкой она была для *qacC* (5,3–10,8%), *qacH* (3,3–7,1%) и *qacB* (1,5%).

В ряде работ устойчивость *S. aureus* рассматривалась применительно к биопленкам. При изучении влияния трех разных дезсредств, применяемых в медицинских учреждениях, на биопленки MRSA установлено, что в рекомендуемых концентрациях все они были неэффективны в отношении биоленок: до 11% микробных клеток MRSA выживали после воздействия дезсредств (Smith K., Hunter I.S., 2008).

В 4 исследованиях наличие устойчивости у стафилококка к дезинфектантам было изучено путем определения МИК. В эксперменте Zhang Y.H. с соавт. (2004) продемонстрировано, что у 5,3% штаммов MRSA для иодофоров и хлоргексидина биглюконата МИК была в 2 раза, а у 28,9% – в 1,5 раза по сравнению с тест-штаммами. Сравнительную оценку устойчивости штаммов MRSA и MSSA находим у Suller M.T., Russel A.D. (1999). МИК для средств, содержащих ЧАСы, являлась более высокой (в 2–4 раза) относительно показателей для хлоргексидина и триклозана (в 1,5–2). Резистентность MRSA к хлоргексидину на высоком уровне (МИК более 100 мкг/мл) обнаружена у 13,3% культур (Takesue Y.c соавт., 1991). В исследовании Smith K.c соавт.

Указания на количественную оценку устойчивости штаммов к ДС среди всех изученных культур содержались в отношении бензалкония хлорида 6,0–52,3%; бензетония 14–72%; хлогексидина биглюконата 7,0–13,3%; акрифлавина 52,3%; повидон-йода 7,1%, а также цетилтриметиламмония бромиду 3–55%. Кроме того, в одной публикации содержалась подобная информация по воздействию дезинфектантов, содержащих ионы тяжелых металлов. Минимальная доля устойчивых культур фиксировалась к ртуть-содержащим средствам (2–10%), максимальная – к кадмий-содержащему средству (49–50%) и иону AsO_4^{3-} (49–51%).

Выводы.

Для объективной оценки устойчивости микроорганизмов к биоцидам необходимо осуществлять систематические обзоры не только по антибиотикорезистентности, но и устойчивости к дезинфицирующим и антисептическим средствам. Ряд вопросов, касающихся проблемы резистентности *S.aureus* к дезинфектантам, применяемым в практическом здравоохранении, остаются изученными не в полном объеме. Это во многом связано с ограниченным числом исследований, результаты которых отличаются существенной гетерогенностью. Это является основанием для проведения молекулярно-генетического мониторинга устойчивости к дезинфектантам, внедрение унифицированной методики изучения чувствительности микроорганизмов к биоцидам.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ЭНТЕРОКОККОВ И СТАФИЛОКОККОВ НА МЕЖКЛЕТОЧНУЮ АДГЕЗИЮ В СИСТЕМЕ «CANDIDA ALBICANS – БУККАЛЬНЫЕ ЭПИТЕЛИОЦИТЫ»

Александрова Н.А., Махрова Т.В., Заславская М.И.

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава России, Нижний Новгород

natalyuskova@rambler.ru

Адгезия *Candida albicans* на эпителиоцитах является первым и обязательным этапом развития кандидоза [1, 2]. На реализацию адгезивного потенциала кандид могут влиять различные факторы, в том числе и бактерии нормальной микрофлоры [3, 4]. Целью настоящей работы было изучение действия метаболитов *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermitidis* на адгезивные взаимодействия *Candida albicans* к буккальными эпителиоцитами человека.

Материалы и методы.

В работе использовали 3 штамма *E. faecium,* 4 штамма *E. faecalis,* 4 штамма *S. aureus* и 3 штамма *S. epidermitidis* и штамм *C. albicans № 601* из коллекции кафедры микробиологии и иммунологии НижГМА. Стафилококки культивировали (24 ч, 37°С) на среде ДМЕМ, энтерококки – в бульоне для выращивания стрептококков (24ч, 37°С). Супернатанты отделяли от бактериальных клеток центрифугированием при 1000g. Культуру *C. albicans* в дрожжевой фазе получали на агаре Сабуро (24ч, 37°С). Посевы смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР; рН 7,2–7,4), трижды отмывали и ресуспендировали в концентрации 10^7 кл/мл. Клетки *C. albicans* и супернатанты бактериальных культур смешивали в равных объемах и инкубировали (60 мин, 37°С). В контроле вместо супернатантов использовали стерильные среды с рН, соответствующей экспериментальным пробам. Кандиды трижды отмывали ЗФР от среды и метаболитов, доводили до концентрации 10^7 кл/мл. В ряде экспериментов, после инкубации с супернатантом, клетки *C. albicans* обрабатывали 0,1% раствором додецилсульфата натрия (ДДС) для удаления нековалентно связанных молекул, затем отмывали и ресуспедировали в ЗФР. Буккальные эпителиоциты получали от доноров 18–20 лет, дважды отмывали ЗФР (40g ,5 мин), готовили взвесь с концентрацией 10^6 кл/мл. Равные объемы взвеси эпителиоцитов и кандид (обработанных в различных режимах) инкубировали в течение 30 мин при 37°С в растворе Хенкса без фенолового красного, встряхивая каждые 5 мин. Эпителиоциты трехкратно отмывали ЗФР от неприкрепившихся кандид (40g, 5 мин), из осадка клеток готовили мазок, который, после фиксации этанол-эфирной смесью, окрашивали 0,25% раствором азура А (Sigma). Определяли индекс адгезии, т.е. среднее количество кандид в пересчете на один эпителиоцит (учитывали 100 клеток).

Результаты и обсуждение.

В работе использовали супернатанты суточных культур энтерококков и стафилококков. Было выявлено, что метаболиты в супернатантах различных штаммов *E. faecium, E. faecalis u S.aureus* угнетают способность *C. albicans* к адгезии на буккальных эпителиоцитах ($p<0,05$) (таб. 1). При этом, наибольший ингибирующий эффект (в 2.59 ± 0,07 раза) был отмечен при действии супернатанта *S.aureus* штамм 86м. В то же время, обработка кандид метаболитами различных штаммов *S. epidermitidis* не изменяла адгезивной способности кандид в системе с эпителиоцитами.

Таблица 1.

Изменение показателей адгезии в системе «*C.albicans*- буккальные эпителиоциты» под действием метаболитов стафилококков и энтерококков

Штаммы бактерий	адгезия *C.albicans* на эпителиоцитах после инкубации с метаболитами соответствующих штаммов бактерий	
	индекс адгезии относительно контроля -100% (%)	кратность снижения индекса адгезии (количество раз)
E.faecium L3	52,4 ± 4,3*	1,95 ± 0,6*
E. faecium 2482	70,39 ± 11,2*	1,40 ± 0,1*
E. faecium 651	86,02 ± 13,7*	1,16±0,3*
E. faecalis 682	73,29 ± 7,4*	1,36 ± 0,9*
E. faecalis 179-2	68,65 ± 5,9*	1,47±1,1*
E. faecalis 6671	84,65 ± 12,2*	1,70±1,4*
E. faecalis 173-5	95,49 ± 5,3*	1,15±0,1*
S.aureus 86м	38,6 ±1,1*	2,6 ± 0,1*
S.aureus 66м	53,5 ± 15,4*	2,1 ± 0,9*
S.aureus 7n	62,4 ± 6,1*	1,6 ± 0,2*
S.aureus 1971	45,7 ± 16,2*	2,3 ± 0,9*
S.epidermitidis 51-1	115,7 ±11,95	0,96 ± 0,3
S.epidermitidis 310-2	100,1 ±3,5	1,0 ± 0,1
S.epidermitidis 178	104,2 ±3,2	0,96 ± 0,1

*– достоверность различий при $p<0,05$

Изучение механизма снижения адгезии *C. albicans* проводили в серии экспериментов с *E. faecium* L3 и *S. aureus* 86м. После инкубации с супернататами исследуемых штаммов кокков, кандиды обрабатывали раствором ДДС для удаления нековалентно связанных молекул. Однако, это не приводило к восстановлению адгезивной активности *C. albicans* до исходного уровня и дало основание заключить, что рецепторы кандид не экранировались, а необратимо модифицировались под действием бактериальных метаболитов.

Эксперименты показали, что метаболиты всех изучаемых нами кокков не влияли на адгезивные свойства буккальных эпителиоцитов в системе с *C. albicans* ($p>0,05$). Это, возможно, объясняется отсутствием специфических мишеней на эпителиоцитах для ферментов данных бактерий, а также спо-

собностью эпителиальных клеток к быстрой регенерации своего адгезивного аппарата.

Таким образом, продукты метаболизма *E. faecium*, *E. faecalis* и *S.aureus* способны повреждать адгезины *C.albicans* для прикрепления к эпителиоцитам, не затрагивая рецепторный аппарат буккальных клеток.

Литература:

1. Сергеев А.Ю. Кандидоз / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – М: Триада-Х, 2001. – 472 с.

2. Cannon R.D., Chaffin W.L. Oral colonization by Candida albicans // Crit. Rev. Oral. Biol. 1999. Vol. 10, № 3. P. 359–383.

3. Ishijima S.A., Hayama K., Burton J.P., Reid G., Okada M., Matsushita Y., Abe S. Effect of Streptococcus salivarius K12 on the in vitro growth of Candida albicans and its protective effect in an oral candidiasis model // Appl. Environ. Microbiol., 2012. – 78 (7). – P: 2190-9.

4. Hogan D.A., Kolter R. Pseudomonas-Candida interactions: an ecological role for virulence factors // Science., 2002. Vol.21. P. 2229–2232.

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ UREAPLASMA UREALYTICUM И MYCOPLASMA HOMINIS, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН НИЖНЕГО НОВГОРОДА

Бруснигина Н.Ф., Колесникова Е.А.

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

e.mail:mazepavn@mail.ru

Формирование резистентности к антибактериальным препаратам у микроорганизмов является общепризнанной проблемой, так как существенно снижает эффективность терапии, способствует развитию серьезных осложнений и летальности, удлиняет сроки пребывания больного в стационаре и повышает стоимость лечения. Клиницисты, назначая пациентам антимикробные препараты, часто не обладают достаточной информацией об этиологическом агенте, а также о спектре и степени его резистентности к лекарственным препаратам. Это приводит к назначению малоэффективных антибактериальных препаратов, усиливает селективное давление антибиотиков на популяцию микроорганизмов, способствует возникновению и распространению множественно резистентных штаммов среди населения и в лечебных учреждениях [1, 4, 7, 8] .

Бактерии родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* – мембранные паразиты – представляют собой уникальную группу трудно культивируемых микроорганизмов, ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Биологические особенности микоплазм и уреаплазм, такие как

отсутствие клеточной стенки, способность к персистенциии на мембране клеток организма хозяина, малый размера генома, высокая скорость фенотипической и генетической изменчивости, ограниченность метаболических путей, слабая иммуногенность, с одной стороны, обусловливают сложность их идентификации, а с другой – ослабление иммунного статуса населения, стрессовый прессинг способствуют возрастанию роли этих микроорганизмов в развитии патологии мочеполовой и репродуктивной систем человека [1, 2, 3].

По данным литературы на долю *U.urealyticum* приходится 40–60%, а *M. hominis* 15–35% случаев воспалительных заболеваний урогенитального тракта (УГТ) [1, 5, 6]. Доказана этиологическая роль *M. hominis* и *U. urealyticum* при уретрите, вагините, цервиците, фоновых заболеваниях шейки матки, эндометрите, сальпингоофорите, а также при нарушениях функции репродукции у женщин [1, 2, 3]. Длительная персистенция микоплазм и уреаплазм в организме, низкая антигенная нагрузка, а также эмпирический выбор антибактериального препарата с целью их элиминации способствуют частому переходу инфекции в рецидивирующее течение.

Информация о спектре и степени резистентности возбудителей различных воспалительных заболеваний, в частности, заболеваний урогенитального тракта, должна служить основой для назначения эффективных противомикробных препаратов, что позволит избежать серьезных осложнений, сократить сроки реабилитации и пребывания больного в стационаре.

Целью работы являлось изучение спектров и уровней антибиотикорезистентности *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*, выделенных от женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта и нарушениями функции репродукции.

Материалы и методы исследования.

В период с 2006 по 2013 гг. изучена резистентность к антибактериальным препаратам 9008 культур *U. urealyticum* и 1353 культур *M. hominis*, выделенных в клинически значимых титрах (10^4 КОЕ/мл) от женщин с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта и нарушениями функции репродукции (уретрит, оофорит, кольпит, вагинит, цервицит, эрозия шейки матки, бесплодие) – пациенток женских консультаций № 1, 3, 5; МСЧ ГАЗ; родильных домов № 1 и 7; медицинских центров «Аист», «Элегра» и «Медисон» г. Нижнего Новгорода. Индикацию, определение спектров и уровней антибиотикорезистентности *M.hominis* и *U.urealyticum* осуществляли с использованием жидких дифференциально-диагностических сред производства Клиники акушерства и гинекологии им. А.С. Снегирева.

Изучали чувствительность изолятов *U. urealyticum*, *M. hominis* к 11 антибактериальным препаратам: доксициклину (Dc), эритромицину (Em), рокситромицину (Rm), офлоксацину (Of), клиндамицину (Clm), джозамицину (Jm), кларитромицину (Krm), ципрофлоксацину (Cf), гентамицину (Gm), азитромицину (Az), мидекамицину (Mm).

Статистическую обработку данных проводили на компьютере с использованием программ Microsoft Office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0. Достоверность различий определяли общепринятым

методом расчета ошибки среднего (m) и показателя существенности и вероятности (t).

Результаты и обсуждение.

Проведенные исследования позволили выявить высокую частоту распространения антибиотикорезистентных штаммов *U. urealyticum*. 92,2% выявленных культур *U. urealyticum* оказались устойчивыми к действию 1 и более антибактериальных препаратов. Чувствительные ко всем препаратам составили 7,8% *U. urealyticum*. Структура антибиотикорезистентности *U.urealyticum* представлена в таблице 1. Наибольшее количество культур U. urealyticum характеризовалось устойчивостью к 1-2 препаратам (78,5%), полирезистентные штаммы (устойчивые к 3 и более препаратам) составили 13,7%. Однако, следует отметить нарастание в последние годы (2011–2013 гг.) числа культур *U. urealyticum*, обладающих полирезистентностью.

Таблица 1

Частота выявления антибиотикорезистентных культур *U.urealyticum* (n=9008)

Устойчивость	Частота выявления антибиотикорезистентных уреаплазм (%)
К 1 антибиотику	32,7±0,5
К 2 антибиотикам	45,8 ±0,5
К 3 антибиотикам	12,3±0,4
К 4 антибиотикам	1,2±0,1
К 5 антибиотикам	0,2±0,1
Всего	92,2±0,3

Резистентность *U. urealyticum* к отдельным атибиотикам представлена в таблице 2. Среди 9800 культур *U. urealyticum* выявлена устойчивость к ципрофлоксацину (87%), офлоксацину (84,5%), клиндамицину (82,7%), эритромицину (14,5%), доксициклину (5,8%). Высокой активностью в отношении уреаплазм обладали кларитромицин (0,2% резистентных культур), джозамицин (0,2%), рокситромицин (1,2 %), мидекамицин (1,4%). Анализ спектров резистетности уреаплазм показал большое разнообразие комбинаций детерминант устойчивости, выявлено 20 вариантов. Преобладали культуры *U. urealyticum*, содержащие детерминанты устойчивости к 2–3 антибактериальным препаратам.

При определении уровней резистентности уреаплазм к антибиотикам установлено, что минимальные подавляющие концентрации (МПК) доксициклина, мидекамицина, азитромицина составили 2–4 мкг/мл, ципрофлоксацина 2–16 мкг/мл, офлоксацина 1–4 мкг/мл, рокситромицина 4 мкг/мл, джозамицина 1–2 мкг/мл, эритромицина 4-8 мкг/мл, кларитромицина 1-2 мкг/мл.

Таблица 2

Резистентность *U. urealyticum* и *M. hominis* к отдельным атибиотикам.

Наименование антибактериального препарата	Частота резистентных (в%)	
	U. urealyticum	M. hominis
Доксициклин	5,8±0,3	4,2±0,6
Кларитромицин	0,2±0,1	НО
Азитромицин	0,7±0,1	НО
Эритромицин	14,5±0,4	НО
Джозамицин	0,2±0,1	0,8±0,2
Ципрофлоксацин	87,0±0,4	2,5±0,4
Офлоксацин	84,5±0,4	НО
Рокситромицин	1,2±0,1	НО
Мидекамицин	1,4±0,1	0,8±0,2
Клиндамицин	82,7±0,4	5,0±0,6
Гентамицин	НО	3,4±0,5

Примечание:

НО – чувствительность не определялась в связи с природной резистетностью.

Полученные результаты об уровнях и спектрах антибиотикорезистентности клинических изолятов *U.urealyticum* совпадают с данными литературы, подтверждающими высокий уровень их устойчивости [4, 8]. Формированию антибиотикорезистентности уреаплазм способствует наличие у них широкой вариабельности мембранных белков и наличие плазмид резистентности. Микоплазмы оказались более чувствительными к антибиотикам, чем уреаплазмы. При определении их резистентности к 7 препаратам (доксициклину, клиндамицину, мидекамицину, джозамицину, ципрофлоксацину, гентамицину, офлоксацину) устойчивые культуры составили 15,3% (таблица 3). Анализ спектров резистетности к антибиотикам показал, что устойчивость микоплазм, как правило, наблюдалась к 1–2 препаратам и редко была множественной. Лишь 2,5% культур *M. hominis* обладали устойчивостью к 2–3 антибиотикам.

Таблица 3

Структура резистентности к антибиотикам *M.hominis* (n=1353)

Резистентность	Частота выявления антибиотикорезистентных микоплазм (%)
К 1 антибиотику	12,8±0,9
К 2 антибиотикам	1,7±0,4
К 3 антибиотикам	0,8±0,3
Всего	15,3±0,9

Резистентность к различным антибиотикам *M. hominis* представлена в таблице 2. Полученные результаты свидетельствуют о том, что все 7 препаратов могут быть использованы при лечении микоплазмозов, но предпочтительнее мидекамицин и джозамицин. Спектры резистентности *M. hominis* были менее разнообразными, чем *U. urealyticum*, выявлено всего 5 вариантов комбинаций детерминант устойчивости, что свидетельствует о высокой степени чувствительности микоплазм к антибиотикам, применяемым для их элиминации.

Определены уровни резистетности *M. hominis* к антибактериальным препаратам. Установлено, что минимальные подавляющие концентрации доксициклина варьировали от 0,5 до 4, 0 мкг/мл, джозамицина от 0,5 до 1,0 мкг/мл, клиндамицина от 0,2 до 0,5 мкг/мл, ципрофлоксацина и офлоксацина от 1,0 до 2, 0 мкг/мл, гентамицина и мидекамицина от 2 до 4 мкг/мл.

Многолетний (с 2006 по 2013 гг.) мониторинг антибиотикорезистентности уреаплазм и микоплазм, выделенных от женщин с воспалительными заболеваниями УГТ, зарегистрировал появление в 2013 г. культур *U.urealyticum*, устойчивых к азитромицину, а также увеличение частоты обнаружения культур, устойчивых к доксициклину (в 2 раза), к эритромицину (в 4 раза), к кларитромицину (1,5 раза), к мидекамицину (в 1,2 раза).

Выводы:

1. На основе изучения резистентности к антибактериальным препа-ратам 10 361 культур уреаплазм и микоплазм, выделенных от женщин с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта и нарушениями функции репродукции, показано, что 92,2% культур *U. urealyticum* и 15,3% *M. hominis* устойчивы к одному или нескольким антибиотикам.

2. На фоне устойчивости к наиболее принятым к применению в терапии урогенитальной патологии антибиотикам (ципрофлоксацин, офлоксацин, клиндамицин) высокой активностью в отношении *U. urealyticum* обладают рокситромицин, джозамицин, кларитромицин, мидекамицин. Препаратами выбора при лечении заболеваний, ассоциированных с *M. hominis,* являются джозамицин, мидекамицин.

3. Осуществление мониторинга антибиотикорезистентности *U. urealyticum* и *M. hominis*, ассоциированных с разнообразными заболеваниями органов урогенитального тракта, позволяет разрабатывать оптимальные схемы специфической терапии, контролировать ее эффективность и при необходимости вносить коррективы.

Литература:

1. Козлова В. И. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий / В. И. Козлова, А.Ф. Пухнер // – М. – 2003. – 440 с.

2. Прилепская В.Н. К вопросу о роли микоплазм в урогенитальной патологии / В.Н. Прилепская, В.И. Кисина, Е.В. Соколовский, В.А. Гомберг // Ж. Гинекология. – 2007. – Т. 9 – № 1. – С. 20–27.

3. Фофанова И.Ю. Роль микоплазменной инфекции в акушерстве и гинекологии. // Ж. Гинекология. – 2008. – Т. 6 – № 3. – С. 4–9.

4. Прохоренков В.И. Уреаплазменная инфекция: современное состояние чувствительности и резистентности к антибиотикам / Прохоренков В.И., Шапран М.В. // Ж. Гинекология. – 2005. – №1. – С. 37–38.

5. Савичева А.М. Роль микоплазм в урогенитальной патологии женщин и их половых партнеров. / А. М. Савичева, В. Н. Прилепская, Е. В. Соколовский, В. И. Кисина, А. Е. Гущин, К. И. Забиров// Ж. Журнал акушерства и женских болезней. – СПб. - 2008. - том LVII. - №1. – С. 11-22.

6. Zhou Y. Detect ion and the antibiotic susceptibility analysis of mycoplasma and chlamydia in urogenital tract infections of 327 cases patients with tubal infertility / Y. Zhou , X. L. Xu, C. P. Wang // Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 2011. Vol. 25(3). P. 201–204.

7. Garcias C.M. Difference in biofilm development and antibiotic susceptibility among clinical U.urealyticum and U.parvum isolates./ C.M. Garcias, M.I. Morosini, F. Baquero //J.Antimicr.Chemoter. – 2008. № 8. – P. 112–116.

8. Degrange S. Tetracyclin resistance in Ureaplasma spp. and M.hominis./ S. Degrange, H. Renaudin // Antimicrob. Agents and Chemoter. – 2008. – V. 2. – P. 234–239.

РАЗДЕЛ 6.
БИОТЕХНОЛОГИЯ СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ, ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И СРЕДСТВОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.

РЕАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПОДХОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ДИЗАЙНА ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БИОЧИПОВ

Солнцев Л.А. [1,3], Старикова В.Д. [1], Уткин О.В. [1, 2]

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

[2] ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» МЗ РФ;

[3] ФГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

utkino2004@mail.ru

Программируемая гибель клеток (ПГК) играет важную роль в созревании клеток иммунной системы и реализации их эффекторного потенциала. В инициации ПГК принимают участие представители белкового семейства «рецепторов смерти». У человека идентифицировано 6 «рецепторов смерти» (TNF-R1, CD95, DR3, DR4, DR5, DR6). Структурно-функциональный

полиморфизм рецепторов смерти и молекул внутриклеточных сигнальных каскадов, обусловленный механизмами альтернативного сплайсинга, определяет тонкий баланс в системе регуляции процессов ПГК и пролиферации [1]. Совокупный паттерн экспрессии таких молекул с одной стороны, определяет функциональное состояние иммунокомпетентных клеток, а с другой, является его отражением, что может использоваться для мониторинга иммуноопосредованных заболеваний человека, оценки эффективности и адекватности корригирующей терапии.

Для изучения динамических особенностей транскриптома рецепторопосредованного сигналинга ПГК перспективным подходом, позволяющим осуществлять многопараметрический анализ показателей, является технология биологических микрочипов (биочипов). Кандидатными для включения в биочип явились сплайсированные варианты мРНК «рецепторов смерти», элементов сигнальных каскадов и их регуляторов, компоненты сплайсосомы и факторы регуляции сплайсинга, референтные гены, характеризующиеся стабильной экспрессией вне зависимости от функционального состояния клетки, а также другие молекулы.

Одним из основных этапов конструирования биочипов является подбор дискриминирующих зондов, выявляющих специфические кДНК, синтезированные на матрице сотен и тысяч сплайсированных вариантов мРНК ключевых участников сигнальных каскадов, опосредованных «рецепторами смерти». Быстрое решение задач такого уровня невозможно без применения автоматизированных подходов в области биоинформатики.

Таким образом, целью работы явился анализ возможностей и ограничений применения подходов биоинформатики в разработке дизайна биочипов для выявления сплайсированных вариантов основных участников сигналинга, опосредованного «рецепторами смерти».

Подбор зондов для проведения исследований с использованием биочипов в общем смысле является тривиальной задачей. Формируя определенные критерии селекции, из общего перечня потенциально возможных кандидатов выбираем только тех, которые полностью удовлетворяют условиям поиска. В качестве условий традиционно выступают следующие параметры: длина зонда, температура плавления, процентное содержание GC, образование шпилек, отсутствие гомоповторов длиной более 3 нуклеотидных оснований (н.о.). В зависимости от задач исследования перечень необходимых критериев отбора может варьировать.

Мультиплексный процесс селекции зондов осуществляется в автоматическом режиме. Для этого могут применяться программы, предназначенные для подбора праймеров, в дальнейшем используемых для проведения реакций в формате ПЦР и ПЦР в реальном времени. Существует большой класс программ, как коммерческих, так и находящихся в свободном доступе в сети Internet («DNASTAR», «Primer Express», «Vector NTI» и другие). У большинства из них имеется общий недостаток, являющийся критическим для решения наших задач. Такие программы ориентированы на подбор праймеров (зондов) к одной нуклеотидной последовательности и исходно базируются на макси-

мально возможном перечне параметров селекции. В ряде случаев и в частности в нашей работе, перед исследователем стоит задача выбора дискриминирующих зондов, выявляющих определенную нуклеотидную последовательность из целой группы (например, зонды для дифференциальной детекции сплайсированных вариантов мРНК «рецепторов смерти»). Кроме того, важным аспектом является контроль за процессом селекции, включающим возможность очередности применения определенных критериев отбора. Всё вышеперечисленное приводит к необходимости создавать собственные алгоритмы подбора зондов, используя тот или иной язык программирования.

В нашей работы использовались алгоритмы, реализованные в среде «Matlab» (Mathworks, США) с использованием расширения Bioinformatics toolbox, которое специально ориентировано на решение задач биоинформатики. В частности, в данной среде штатно реализованы функции определения температуры плавления олигонуклеотидной последовательности по нескольким алгоритмам, оценка возможности формирования димеров и шпилек, функции поиска вхождений подстроки в строку (в том числе и поиск подстроки в наборе строк). Причём большинство функций оптимизированы для выполнения исследований в многопоточном режиме, что значительно сокращает время вычислений при наличии соответствующего аппаратного обеспечения. В своей работе мы используем следующую конфигурацию: 2 x INTEL XEON e2640, 128GB RAM. При работе алгоритмов, требующих высокой скорости чтения/записи, используется SSD. Также компьютер укомплектован видеокартой NVIDIA K5000.

Кроме того, в рамках «Matlab» реализованы функции для загрузки нуклеотидных последовательностей с портала NCBI на основании их регистрационного номера. При этом исследователь получает информацию не только о первичной структуре нуклеотидной последовательности, но и ее аннотацию в базе GenBank. Такая особенность позволяет вести обработку данных в автоматическом режиме без необходимости визуального контроля.

Отдельно стоит отметить встроенную функцию поиска гомологов по алгоритмам BLAST. Такая функция позволяет непосредственно из программы формировать запрос на сервер NCBI с возможностью получения результатов в одном из общепринятых форматов (простой текст, таблица, XML), не открывая браузер. Такой подход является эффективным при необходимости проверки целого набора праймеров (зондов). Поиск гомологов также можно осуществлять локально. В этом случае перед исследователем открываются возможности поиска гомологов в любой базе данных (база данных в формате BLAST может быть сформирована средствами самого «Matlab»). Наличие соответствующей аппаратной поддержки (многоядерные процессоры, видеокарты расчётов на GPU) дополнительно позволяет оптимизировать время работы. Так выполнение поиска нуклеотидных последовательностей в базе данных ДНК человека (база refseq_genomic) локально оказывается в ряде случаев на порядок быстрее, чем на сервере NCBI.

Таким образом, среда «Matlab» является тем инструментом, который сочетает в себе целый спектр специализированного программного обеспечения

и web-сервисов, а также полностью позволяет контролировать алгоритм поиска. К недостаткам программ, написанных на языке «Matlab», относится меньшая скорость выполнения по сравнению с аналогами, сгенерированными с помощью компилируемых языков C++ или C#. Этот недостаток компенсируется простотой реализации алгоритма в среде «Matlab» и богатым набором встроенных функций, позволяющих осуществлять многопоточные вычисления. Кроме того, критические по времени выполнения участки кода могут быть переписаны в виде функций на разных языках программирования и встроены в общий алгоритм.

В рамках нашего исследования на первом этапе осуществлялась селекция дискриминирующих зондов, детектирующих сплайсированные варианты мРНК основных участников рецептор-опосредованного сигналинга ПГК на основе физико-химических свойств. К ним относятся: температура плавления в диапазоне от 59 до 61°C, содержание GC в интервале от 30 до 70 %, отсутствие G на расстоянии менее 5 н.о. от 5’ и 3’ концов, отсутствие шпилек и гомоповторов длиной более 3 н.о. Такой подход оказался неудачным, не позволив подобрать уникальные зонды к значительному числу сплайсированных вариантов мРНК молекул, участвующих в инициации, трансдукции и регуляции ПГК. В итоге стратегия поиска претерпела изменения. На втором этапе работы формировался пул нуклеотидных последовательностей, включающий все возможные сплайсированные варианты конкретной молекулы в рамках сигналинга ПГК (например, набор олигонуклеотидов для 14 вариантов мРНК DR3). Такой пул протозондов длиной от 24 до 30 н.о. проверялся на специфичность, то есть на способность выявлять только определенный сплайсированный вариант мРНК среди других изоформ.

В дальнейшем проводился анализ на уникальность зондов, то есть на предмет выявления совпадений более 10 н.о. подряд у разных олигонуклеотидов. В том случае, если зонды, направленные на идентификацию разных сплайсированных форм мРНК, имели общий участок такой длины, они исключались из дальнейшей работы. Результирующий пул проверялся на предмет соответствия физико-химическим условиям, используемым на первом этапе работы.

Параллельно производился поиск зондов, позволяющих выявлять определенные группы сплайсированных форм мРНК. Комбинированный подход, оперирующий групповыми и индивидуальными зондами, позволяет идентифицировать сплайсированные варианты мРНК даже при отсутствии технической возможности селекции зондов, специфичных в отношении конкретной изоформы, а также нивелирует зависимость реализации авторских алгоритмов от возможностей программных продуктов. То есть любой из этапов анализа (поиск, выравнивание последовательностей, расчёты параметров) реализуется самостоятельно, исходя из условий задачи.

Таким образом, для решения задач настоящего исследования стратегия поиска дискриминирующих зондов с использованием большинства программных пакетов практически не реализуема (или реализуема с большими затратами времени и сил). Преимуществом нашего подхода является полная прозрачность и контролируемость всех этапов анализа. Кроме того, отсутствует

лимитирующий фактор в виде недостатка вычислительных мощностей (доля процессорного времени, выделяемая каждой задаче на web-сервисах, весьма незначительна).

В настоящее время с использованием предложенного нами биоинформационного подхода разработан дизайн биочипа, позволяющего вести синхронную и дифференциальную детекцию сплайсированных вариантов мРНК ключевых участников сигналинга, опосредованного «рецепторами смерти».

Литература:

1. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Усп. Совр. Биол. 2012. Т. 132. № 4. С. 381–390.

МЕМБРАННО-КОНЬЮГАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Вачаев Б.Ф., Яговкин Э.А., Твердохлебова Т.И., Юрьева И.Л., Алешукина А.В.

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

e-mail:rostovniimp@mail.ru

В системе противоэпидемической защиты населения важное значение имеют медицинские иммунобиологические препараты (МИБП). Качество и эффективность МИБП во многом определяются технологическими инновационными решениями при их разработке и производстве.

Государственная стратегия устойчивого развития Российской Федерации определяется успехами в области критических технологий федерального уровня где, по мнению академика Н.А. Платэ, особое место занимают мембранные технологические процессы. Российская наука достигла значительных успехов мирового уровня по данному направлению, особенно в области использования мембран для очистки воды, промышленных стоков, воздушной среды. Мембранные технологии широко применяются в пищевой, фармацевтической промышленности, в том числе при производстве медицинских иммунобиологических препаратов, в основном на биотехнологических процессах, связанных с осветлением, стерилизацией и концентрированием биологически активных веществ. В основном используются методы тупиковой фильтрации на различного вида пластинчатых мембранных фильтрах.

Данные методы фильтрации не позволяют выделять и очищать вещества с учетом молекулярных параметров. Недостаточностью тупиковых технологий фильтрации является создание вторичной мембраны и уменьшение скорости потока жидкости через фильтрующую поверхность мембран, что значительно снижает эффективность фильтрации.

Принципиально новые подходы и решения в области производства МИБП открываются при использовании мембранных технологий, позволяющих разделить вещества по молекулярным параметрам с применением тангенциальных потоков фильтрации. Отечественной наукой и промышленностью разработаны фильтрующие модули, содержащие полиамидные и полисульфоновые ультрафильтрационные полые волокна, которые позволяют разделить вещества по молекулярным параметрам от 10^6 до 10^3 дальтон при создании тангенциального потока фильтрации.

Применение мембранных технологий с использованием полых волокон позволяет получать очищенные биологические компоненты (белки, полисахариды, пептиды), проводить концентрирование различных веществ и корпускул, получать диализабельные среды культивирования для бактерий. Используя мембранные технологии на полых волокнах, институтом разработана и производится новая высокоэффективная очищенная концентрированная поливалентная лептоспирозная вакцина для иммунизации людей. В отличие от ранее выпускаемой, новая вакцина представляет собой концентрированный корпускулярный, очищенный от чужеродного кроличьего белка иммунобиологический препарат. В вакцине использованы производственные штаммы лептоспир групп: L. icterohaemorhagiae, L. pomona, L. grippotyphosa, L. sejroe, которые соответствовали наиболее распространенным на тот период в Российской Федерации и странах СНГ штаммам. Повышение вакцинирующих доз и количественная стандартизация клеток лептоспир позволили не только поднять иммунобиологическую эффективность вакцины, но и снизить дозы и кратность вакцинации (однократная вакцинация в дозе 0,5 м). Отсутствие в препарате кроличьего белка позволило сократить число ограничений на его применение и осуществлять вакцинацию детей. С 1999 года в Российской Федерации для профилактики лептоспироза применяется только новая концентрированная очищенная поливалентная вакцина. После применения новой вакцины в Южном и Северо-Кавказском региональных округах наблюдается статистически значимое снижение уровня заболеваемости людей лептоспирозом – в 2,8 раза (до вакцинации среднегодовой показатель заболеваемости за 7 лет составил 3,77 на 100 тыс. населения, а с применением новой вакцины среднегодовой показатель за 11 лет снизился до 1,34) [1].

В Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии развернуто производство лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл (ЛГ) для лечения и профилактики острых кишечных заболеваний у детей.

Лактоглобулины представляют собой иммуноглобулиновую фракцию иммунной молозивной сыворотки коров, получаемые методом неполного спиртового фракционирования по Кону. Данная технология спиртового фракционирования позволяет получать только высокомолекулярную фракцию молозивной лактосыворотки. Низкомолекулярные биологически активные компоненты, в том числе низкомолекулярные пептиды молозивной сыворотки, удаляются как отходы производства. Среди этих низкомолекулярных пептидов (НМП) молозивной сыворотки наиболее известен «фактор переноса», который

обладает уникальной иммуномодулирующей активностью [2]. В молозиве также содержатся витамины, гормоны, ферменты, цитокины, дефенсины, обладающие разнообразным регуляторным действием на нервную, пищеварительную, сердечно-сосудистую систему. По мнению ряда исследователей, препараты, содержащие НМП, в ближайшее время войдут в число ведущих на рынке фармакологических препаратов. Уже в настоящее время за рубежом созданы и стали применяться, в том числе и в России, биологически активные добавки (БАД), содержащие в своем составе НМП, содержащие трансферфакторные белки.

Используя технологии с применением мембранной ультрафильтрации на полых волокнах, была получена высокомолекулярная фракция иммуноглобулинов. Сравнительные характеристики препаратов лактоглобулина, полученных с использованием спиртового фракционирования и мембранной фильтрации на полых волокнах, показали, что они практически не отличались по основным параметрам, заложенным а ФСП 42-0425662705, а именно – содержание белка и наличие антител к возбудителям кишечных инфекций в обоих вариантах определялось в одинаковом количестве. В отличие от технологии спиртового фракционирования методом последовательной ультрафильтрации на полых волокнах с различным размером пор впервые был получен препарат молозивных низкомолекулярных пептидов (до 15000 дальтон), который у экспериментальных животных стабилизировал микробиоценоз кишечника через механизм активации цитокиновой системы на локальном уровне.

Проблема повышения иммунологической активности низкоиммуногенных антигенов является актуальной проблемой в области создания вакцинных препаратов как против инфекционных, так и соматических заболеваний. В большинстве случаев низкоиммуногенными антигенами особенно для детского населения являются антигенные композиции, содержащие полисахариды или пептиды. Одним из перспективных направлений является разработка коньюгированных вакцинных препаратов. Коньюгационные технологии в производстве иммунобиологических препаратов позволяют модернизировать В-зависимые антигены (полисахариды, пептиды) в Т-зависимые антигены, что обеспечивает их высокую иммунобиологическую активность, особенно у детей младших возрастных групп. В настоящее время в мировой практике коньюгационными технологиями создаются новые высокоэффективные вакцины против инфекционных и соматических заболеваний. Применение конъюгированных вакцинных препаратов позволяет увеличивать число заболеваний, которые возможно контролировать методами вакцинопрофилактики. Одной из таких вакцин является вакцина против гемофильной тип b инфекции. Начиная с 1985 г. в большинстве промышленно развитых стран мира борьба с этим заболеванием носит профилактический характер с помощью коньюгированных вакцинных препаратов, в которых основной капсульный полисахарид гемофильного микроба ковалентно связан с Т-зависимым белком (столбнячный, дифтерийный анатоксины).

В Ростовском НИИ микробиологии и паразитологии в рамках Федеральной целевой программы «Вакцинопрофилактика» были начаты работы по

созданию отечественной коньюгированной гемофильной тип b вакцины. Используя мембранные технологии на полых волокнах разработаны жидкие полусинтетические питательные среды, не содержащие сывороточных чужеродных белков и методы получения очищенного капсульного антигена гемофильного тип b микроба из культуральной жидкости. Чистота и подлинность получаемого антигена подтверждена методом ядерно-магнитного резонанса.

Учитывая, что наибольшей иммуногенностью обладают полисахариды, коньюгированные с белком, активизирующим Т-клеточную систему иммунитета, проведена работа по связыванию капсульного полисахарида со столбнячным анатоксином. На основе полученного коньюгата изготовлена вакцина гемофильная тип b сухая и отработаны методы ее контроля, в том числе на стадиях производства.

Вакцина прошла все необходимые контролируемые испытания в опытах на экспериментальных животных и добровольцах всех возрастных групп с учетом необходимых официальных требований. Данные клинических испытаний свидетельствовали о низкой реактогенности, безвредности иммунологической активности отечественной коньюгированной вакцины, не уступающей зарубежным аналогам [3, 4]. Полученные результаты клинических испытаний позволили зарегистрировать коньюгированную гемофильную тип b вакцину в Российской Федерации, что способствовало введению в официальный Российский календарь детских прививок вакцинацию детей против гемофильной тип b инфекции.

Описанные в данной статье технологические решения получения МИБП с использованием мембранно-коньюгационных технологий запатентованы и находятся в реестре патентов Российской Федерации. Данные технологии можно отнести к инновационным, т.к. их применение дает существенный экономический эффект и может представлять интерес для инвестиций.

Литература:

1. Вачаев Б.Ф., Яговкин Э.А., Ананьина Ю.В., Юрьева И.Л., Саяпина Л.В., Кондратенко В.Ф. Перспективы применения и совершенствования лептоспирозной вакцины для людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2012, – № 4 – С. 68–72.

2. Хэннен Уильям Дж. «Трансферфактор – плюс идеальная комбинация биологически активных веществ для оптимального иммунитета // Под ред. Ю.П. Гичева и Э. Огановой – Новосибирск – 2001 – 73 с.

3. Павлова Л.И., Вачаев Б.Ф., Русанова Л.А., Горбунов М.А., Яговкин Э.А. и др. Результаты клинических испытаний отечественной вакцины против гемофильной тип b инфекции. // Биопрепараты – 2007 – № 4 – С. 12–15.

4. Вачаев Б.Ф., Юрьева И.Л., Яговкин Э.А. и др. Разработка отечественной вакцины против гемофильной тип b инфекции // Актуальные вопросы инфекционной патологии – Сборник докладов – Юбилейная научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии – Ростов-на-Дону – 23–24 сентября 2009 г. – С. 247–251.

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ A/H5N1

Василенко Н.Ф.[1], Заревина Л.И.[1], Жарникова И.В.[1], Юркина И.В.[1], Коготкова О.И.[1], Зуенко А.А.[1], Шестопалов А.М.[2], Золотых С.И.[2], Марченко В.А.[2], Игнашкина М.Б.[2]

[1] ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь;

[2] ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Новосибирской области

nfvasilenko@mail.ru

Эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка последних лет по гриппу продолжает вызывать нарастающую тревогу в мире. Она по-разному обосновывается и прогнозируется с позиций существующих альтернативных гипотез резервации возбудителей этой пандемической инфекции в биосфере. Опасность развития массовых эпизоотических вспышек в популяциях домашней птицы и угроза трансформации циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа в пандемический вариант требуют постоянного наблюдения за ситуацией [3, 4, 6]. Актуальность проблемы экспресс-диагностики гриппа птиц (ГП) определяется реальной опасностью заноса возбудителя этой болезни и формирования очагов инфекции во многих регионах Российской Федерации, возникновения эпизоотий среди домашней птицы и заражения человека.

Мониторинг инфекционных болезней является одной из наиболее важных составляющих комплекса мер по предотвращению и борьбе с эпидемиями. Один из пунктов мониторинга – сбор, доставка и лабораторное исследование полевого материала – необходим как для прямого обнаружения компонентов возбудителя (антигенов или фрагментов генома), так и для последующей изоляции и идентификации инфекционного агента. Однако часто низкие концентрации возбудителя инфекции и его компонентов в полевом материале, а также огромное количество примесей не позволяют обнаруживать антигены вирусов или их генетический материал непосредственно в пробах полевого материала (вода из водоемов, образцы почвы, птичий помет и др.). Одним из приоритетных направлений в лабораторной диагностике и в санитарно-эпидемиологическом надзоре является разработка и внедрение в практику высокоэффективных методов выявления патогенов в исследуемом материале с последующей детекцией их антигенов. Эффективность экспресс-диагностики и индикации возбудителя могут существенно повысить магнитоуправляемые сорбенты, способные осуществлять на своей поверхности селективное концентрирование исследуемого патогена с последующим выявлением методом иммуноферментного анализа [1].

Целью данного исследования явилась разработка производственной биотехнологии изготовления магноиммуносорбентной тест-системы для

выявления вируса ГП методом иммуноферментного анализа в биологическом материале от павших и больных птиц и пробах, полученных из объектов внешней среды (вода, почва, птичий помет).

Биологическим материалом для конструирования тест-системы служили концентрированный антиген вируса ГП A/H5N1, полученный из штамма A/Common gull/Chany/2006, инактивированный β-пропиолактоном, и иммунная кроличья сыворотка. В реакции гемагглютинации гемагглютинирующий титр антигена составил 20480 ГАЕ/мл, титр иммунной кроличьей сыворотки в РТГА – 1:640 ГАЕ/мл. Специфические иммуноглобулины класса G (IgG) для приготовления иммунопероксидазного конъюгата и магноиммуносорбента (МИС) выделяли фракционированием каприловой кислотой. Иммунопероксидазный конъюгат получали методом перйдатного окисления. Для конструирования магносорбента (МС) в качестве матрицы использовали алюмосиликат с оксидом железа, модифицированные 6% раствором полиглюкина, с последующим ковалентным связыванием IgG на поверхности МС и получением МИС. В экспресс-анализах МИС выступают в качестве твердой фазы, значительно увеличивая специфичность и чувствительность анализов за счет селективной концентрации возбудителя на своей поверхности.

Разработанная нами тест-система представляет собой набор, состоящий из следующих компонентов: 10% взвеси МИС против вируса ГП; конъюгата иммунопероксидазного иммуноглобулинового против вируса ГП; антигена вируса ГП A/H5N1 с концентрацией 500 мкг/мл (положительный контроль); фосфатно-солевого буфера; бычьего сывороточного альбумина; твина-20; тетраметиленбензидина; 4 N раствора серной кислоты (стоп-реагента); планшета полистиролового плоскодонного для ИФА однократного применения с объемом лунки 0,4 мл.

В основу метода положена схема прямого иммуноферментного анализа. При постановке ИФА антиген вируса гриппа птиц, содержащийся в исследуемом материале, специфически взаимодействует с IgG против вируса ГП, иммобилизованными на МИС. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют с помощью иммунопероксидазного конъюгата, катализирующего расщепление тетраметиленбензидина.

При определении диагностической ценности тест-системы в качестве материала для установления чувствительности был использован антиген вируса гриппа птиц A/H5N1 (инактивированный) с концентрацией белка 500 мкг/мл, раститрованный до 100 нг/мл. Для проверки специфичности использованы антигены вируса гриппа типа А (H1N1,H3N2) и типа В (препарат «Гриппол»). Отрицательным контролем служил МИС, не контактировавший с антигеном вируса ГП A/H5N1.

В результате проведенных лабораторных испытаний установлено, что в классическом ИФА («сэндвич»-варианте) антиген вируса ГП A/H5N1 выявлялся в концентрации 4,8 мкг/мл, а при использовании магноиммуносорбентной тест-системы чувствительность метода составила 100 нг/мл (выше в 48 раз), специфичность – 100%. Продолжительность ИФА с применением МИС составляет 50–60 мин, а в полистироловых планшетах, учитывая 18-часовую сенсибилизацию – 20–21 ч. Применение лабораторной установки для се-

лективного концентрирования проб на МИС позволило выявить вирус ГП в концентрации 10 нг в пробе воды объемом 5000 мл.

Таким образом, сочетание МИС с ИФА позволяет ускорить детекцию возбудителя гриппа птиц в исследуемых пробах и повысить чувствительность анализа за счет селективного концентрирования, исключения предварительных этапов очистки проб. Магнитные ловушки с иммобилизованными иммуноглобулинами адсорбируют возбудитель инфекции, а окончательная его идентификация возможна как в полевых, так и в стационарных лабораториях.

Для работы с МИС созданы компактные, мобильные опытные образцы приборов «Аквадиамаг» для использования при проведении мониторинга открытых водных объектов на наличие патогена, обеспечивающие в автономном режиме прокачивание исследуемой жидкости (несколько сот литров) через магнитные ловушки с фиксированным МИС. В дальнейшем возбудитель выявляют с помощью ИФА или других лабораторных методов. Прибор «Аквадиамаг» обладает высокой эффективностью, надёжностью и возможностью его использования для селективного концентрирования возбудителей особо опасных инфекций, в т.ч. и вируса гриппа птиц, на поверхности МИС из большого объёма жидкости (сотни литров), что повышает вероятность выявления микроорганизмов, присутствующих в водной среде в низкой концентрации, даёт возможность исследовать широкий диапазон проб, в том числе и сильно загрязнённых, осуществлять тщательную отмывку проб от загрязнений, мешающих проведению индикационных реакций [2]. Все это способствует проведению оперативного санитарно-эпидемиологического надзора и формированию своевременных медицинских и ветеринарных мероприятий, направленных на профилактику гриппа птиц.

Литература:

1. Ефременко В.И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях. Изд-во «Ставрополье». Ставрополь, 1996; 131 с.

2. Ефременко В.И., Василенко Н.Ф., Жарникова И.В. и др. Магнитоуправляемые диагностические тест-системы в мониторинге возбудителей опасных бактериальных и вирусных инфекций. В кн.: Матер. международной науч.-практ. конф.: Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней (14-15 мая 2006, Новосибирск, Россия). Новосибирск, 2009; 92–95.

3. Львов Д.К. Значение вновь возвращающихся инфекций. Вопр. Вирусол. 2002; 5:4-7.

4. Матросов А.Н., Слудский А.А., Чекашов В.Н. и др. Эпизоотологический мониторинг за гриппом птиц в природных условиях. В кн.: Матер. VII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ (3-5 окт. 2006, Оболенск, Московской обл., Россия). Оболенск, 2006; 50-51.

5. Онищенко Г.Г. Борьба с инфекционными болезнями – приоритетная тема председательства Российской Федерации на саммите Группы Восьми в 2006 г. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 7: 3–7.

6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д. и др. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92(2): 5–9.

ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОЙ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НОВЫМ СПОСОБОМ И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ТЕЛ К НЕЙ

Захарова Т.Л., Михеева Е.А., Осина Н.А., Смирнова Н.И.

ФКУЗ « Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Заметное ухудшение эпидемической ситуации по холере в мире обусловливает актуальность исследований, направленных на получение эффективных холерных вакцин, вызывающих образование у человека напряженного иммунитета. Одним из наиболее сильнодействующих иммуногенов является холерный энтеротоксин [1], имеющий субъединичную структуру. Его молекула состоит из пяти идентичных В-субъединиц с молекулярной массой 11,6 кДа и одной А-субъединицы с молекулярной массой 27,2 кДа [2]. В-субъединица холерного токсина является основным фактором, обеспечивающим формирование антитоксического иммунитета при холере. Поэтому перспективным подходом к созданию эффективных вакцин против холеры является использование её в качестве иммунизирующего агента. [3, 4]. Не обладая токсической активностью, она способна специфически адсорбироваться на поверхности тонкого кишечника и стимулировать локальный иммунный ответ [3]. При иммунизации холерным токсином токсиннейтрализующие антитела образуются преимущественно к В-субъединице [4, 5]. Вследствие сильных иммуногенных свойств В-субъединицы, живые холерные вакцины конструируют на основе штаммов, содержащих лишь структурный ген ctxB, контролирующий синтез В-субъединицы холерного токсина, а к убитым вакцинам добавляют очищенную В-субъединицу [6]. Очищенная В-субъединица используется также для получения антитоксических сывороток, высокоспецифических иммуноглобулинов и диагностических тест-систем. Новые требования к качеству антигенных препаратов, к их безвредности и чистоте, предполагают разработку совершенных технологических методов их выделения. В связи с этим очевидна необходимость разработки эффективных методов выделения и очистки В-субъединицы холерного токсина – важнейшего холерного протективного антигена.

Традиционные методы очистки В-субъединицы, такие как разделение холерного токсина гельфильтрацией на Sephadex G-75 с последующей ренатурацией субъединиц [7], или очистка аффинной хроматографией с использованием колонки лизо-GM_1-ганглиозида [8], являются трудоемкими многоэтапными процессами, требующими наличия дорогостоящих реактивов и оборудования. Кроме того, препараты В-субъединицы, полученные этими способами, обладают остаточной токсичностью из-за присутствия в них примесей А-субъединицы. Следует отметить также, что указанные способы подразумевают предварительное получение очищенного холерного токсина.

Это не требуется при предлагаемом нами использовании рекомбинантного штамма, продуцирующего вместо холерного токсина только его В-субъединицу, благодаря чему выделяемый препарат не обладает остаточной токсичностью, так как в нем полностью отсутствует примесь субъединицы А холерного токсина.

Целью данной работы являлась разработка экономичного и эффективного способа получения высокоочищенной нативной иммуногенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней.

Ранее нами было описано получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма – продуцента, лишенного продукции субъединицы А, при котором основная стадия очистки осуществляется с помощью ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой [9]. Недостатком метода является то, что только небольшая часть от исходной концентрации В-субъединицы связывается с катионообменником в процессе хроматографии, а большее количество антигена утрачивается.

В данной работе мы предлагаем использовать метод колоночной гельпроникающей хроматографии, который обладает высокой механической стабильностью и обеспечивает высокоскоростное выделение антигена при минимальном разведении образца. Таким образом, достигается максимальный выход очищенной В-субъединицы из общей белковой фракции. Преимуществом метода гель-проникающей хроматографии по сравнению с ионообменной является также относительная простота исполнения. Предлагаемый способ был отработан опытным путём, в процессе которого после каждого этапа колоночной гель-хроматографии на TSK HW-60 чистоту образца анализировали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле, в результате чего выяснили, что трех ступеней очистки достаточно для получения лишенного примесей препарата В-субъединицы холерного токсина.

В работе был использован штамм не О1 серогруппы *V.cholerae* КМ93 (депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб»), содержащий гибридную плазмиду pIEM3 с клонированными генами *vctB*, детерминирующими синтез В-субъединицы холерного токсина. Источником В-субъединицы служил фильтрат бульонной культуры указанного штамма, выращенного в реакторе методом глубинного культивирования. Из фильтрата осаждали общую белковую фракцию при комнатной температуре и перемешивании в течение 2 часов в присутствии 0,25% гексаметафосфата натрия при pH 4,0. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 0,1М фосфатном буфере pH 7,0. Затем препарат диализовали против 50 объемов 0,007 М фосфатного буфера pH 7,0, в течение 24 ч и удаляли нерастворимые примеси центрифугированием. Полученный образец подвергали гель-проникающей хроматографии на колонке с TSK HW-60 в три ступени, элюцию осуществляли фосфатным буфером (0,007М) при pH 7,0, Собранные фракции подвергали спектрофотометрированию при 280 нм и анализировали в реакции иммунодиффузии (РИД) [10] с антисывороткой к В-субъединице холерного токсина. На первом этапе очистки В-субъединица обнаруживалась в начальной половине второго пика профиля элюции. Фракции, содержащие В-субъединицу,

объединяли, концентрировали и вновь наносили на колонку. Процедуру повторяли до тех пор, пока В-субъединица не сходила с колонки одним самостоятельным пиком. Для этого потребовалось три этапа очистки на TSK-геле HW-60. Полученный препарат диализовали против 0,9% хлорида натрия, разливали по 1 мл в ампулы и лиофильно высушивали. Выход очищенной В-субъединицы от общего количества белка в исходном препарате составил 25%. В препарате содержится 200 мкг/мл белка (по методу Лоури). По данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в конечном препарате обнаруживается одна белковая полоса, идентичная по расположению полосе коммерческой В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой 58 кДа, отсутствуют другие примеси, что является свидетельством гомогенности и чистоты. По титру специфической активности в реакции иммунодиффузии по Оухтерлони [10] полученный препарат также не отличается от коммерческой В-субъединицы и от В-субъединицы, выделенной нами ранее из целого токсина методом Lai C.Y.[7]. В кожной пробе Крейга на остаточную токсичность очищенная предлагаемым способом В-субъединица не вызывала образование инфильтрата, что указывает на полное отсутствие в ней фактора кожной проницаемости – субъединицы А.

Иммунологическая активность очищенной В-субъединицы была подтверждена получением моноклональных антител. Для этого с помощью гибридомной технологии [11] были получены и отобраны диагностически значимые гибридомы-продуценты моноклональных антител к В-субъединице ХТ. При культивировании клонов in vivo асцитообразование происходило в одни и те же сроки (на 9–10 день). Независимо от числа пассажей в мышах BALB/c титры моноклональных антител в иммуноферментном анализе находились на одном уровне от 2432±405 до 2688±944. В среднем объем иммуноасцитической жидкости от одной мыши составил 6,5–7,0 мл при концентрации клеток 7–8×106 м.к. в 1 мл. Стабильность антителопродукции после длительной криоконсервации гибридом не снижалась.

Эти данные свидетельствовали о возможности использования полученных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к В-субъединице холерного токсина, для конструирования различных вариантов иммунодиагностических тест-систем на их основе, для детекции токсигенных штаммов холерного вибриона.

Литература:

1.Lycke N., Holmgren J. Strong adiuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antibodies // Immunology. – 1986. – V. 59. – P. 301–308.

2. Nursin S., Khan Y.K., Bhuiyan N.A. et al. Diverse CTX phages among toxigenic Vibrio cholerae O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholerae is endemic in Bangladesh // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, № 12, – P. 5854–5856.

3. Янишевский Н.В., Гинцбург А.Л., Вертиев Ю.В. и др. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез В-субъединицы холерного токсина //Молекул. генетика. – 1987. – N 4. – С. 26–32.

4. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. et al. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin //Infect. Immun. – 1987. – V.5. – P. 1116–1120.

5. Finkelstein R.A. The cholera enterotoxins and the cholera toxin-related enterotoxins: from the beginning to the present //Bacterial Protein Toxins, Zbl.Bakt. Suppl. – 1992. – V.23. – P. 161–171.

6. Taylor D.N., Cardenas V., Sanchez J.L. et al. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholerae vaccine in Peru // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 181. – P. 1667 – 1673.

7. Lai C.Y., Mendez E., Chang D. Chemistry of cholera toxin: the subunit structure/ J.Infect. Dis. – 1976. – V.133. – S23-S30.

8. Dertzbaugh M.T., Macrina F.L., Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structure and functional analysis of the chimeric protein// Infect. Immun. – 1990. – V.58.N1 – P. 70–79.

9. Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма Vibrio cholera// Биотехнология. – 2003. – № 5. – С. 53–56.

10. Ouchterlony O. Antigens antibody reactions on gels // Act. Pathol. Microbiol. Scand. – 1949. V. 26. – P. 207–212. 11. G.Galfré. Antibodies to major histocompat ibility antigens produsedby hybrid cell lines / // Nature. – 1977. – Vol. 266. – P. 550

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА

Новикова Л.И., Волков А.В., Алешкин В.А, Матвеевская Н.С., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Синчугова Т.В.

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, Москва

novikova414@bk.ru

Иммуноглобулиновые препараты применяются в медицине с середины прошлого века для профилактики и лечения ряда заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии. Большинство подобных препаратов представляет собой лекарственную форму иммуноглобулина G. Препаратов, содержащих другие изотипы иммуноглобулинов – IgA или IgM – на фармацевтическом рынке немного, причем это, как правило, импортные лекарственные средства. Необходимо также отметить, что подавляющее большинство иммуноглобулиновых препаратов отечественного и иностранного производства, использующихся в инфектологии, предназначены для парентерального (внутримышечного или внутривенного) применения, т.е. воздействия, в первую очередь, на системный иммунитет. В то же время известно, что входными воротами большинства инфекций являются слизистые оболочки (желудочно-кишеч-

ного тракта (ЖКТ), верхних дыхательных путей (ВДП) и т.д.), местный иммунитет которых представляет первую линию противоинфекционной защиты. В связи с этим представляется очевидным использовать иммуноглобулиновые препараты непосредственно на слизистых оболочках, помогая местному иммунитету справиться с инфекцией.

Комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП), разработанный в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и внедренный в практику здравоохранения с 1991 г., представляет собой пероральное лекарственне средство, содержит в своем составе три основных изотипа иммуноглобулинов (G, A и M) и предназначен для местного применения в ЖКТ с целью профилактики и терапии кишечных инфекций вирусной и бактериальной этиологии. При местном применении на слизистой желудочно-кишечного тракта антитела одной специфичности, но различных изотипов, содержащиеся в КИП, способны к агглютинации и преципитации энтеропатогенных инфекционных агентов, обеспечивая нейтрализацию патогенетических механизмов инфекции. За более чем 20-летний период клинического применения КИП зарекомендовал себя как надежное противоинфекционное средство, эффективное не только как элемент комплексной терапии, но и как самостоятельный препарат.

Комплексный иммуноглобулиновый препарат получают из пула донорской крови, в связи с чем в нем в соответствии с особенностями популяционного иммунитета содержатся разнообразные антитела, в том числе и антитела к респираторным патогенам, в первую очередь, вирусной природы. Имеются IgG- и IgA-антитела к вирусам гриппа (A+B) и респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ), IgG-антитела к вирусу парагриппа 2, а также антитела разных изотипов к ряду бактерий, которые могут обсеменять носоглотку (например, золотистому стафилококку). Это явилось основанием для проведения исследований, направленных на расширение сферы местного применения КИП и создание лекарственной формы, предназначенной для действия на других слизистых оболочках, например, на слизистой ВДП. Известно, что при местном применении иммуноглобулинов на слизистой респираторного тракта, наряду с активным действием антител всех изотипов на поверхности слизистой, полимерные иммуноглобулины (IgA, IgM) могут попасть из просвета дыхательных путей внутрь эпителиальных клеток благодаря трансэпителиальному транспорту и способствовать нейтрализации вирусов внутри зараженных клеток [4].

Исследования по разработке новой лекарственной формы КИП (препарата «КИП назальный»), предназначенного для профилактики и терапии респираторных инфекций, проходили в несколько этапов и заключались в модификации существующей технологии получения КИП, конструировании готовой формы препарата, получении экспериментально-производственных серий и их иммунохимическом изучении, испытании интраназальной формы препарата на безвредность на животной модели (приматы), доклинических исследованиях препарата на людях (добровольцы из числа авторов).

Коммерческий препарат КИП (лиофилизат для приготовления раствора для приема внутрь) получают из осадка Б, являющегося побочным продуктом промышленного выделения альбумина из донорской крови [3], по известной технологии, заключающейся в осаждении примесных липопротеинов

хлороформом, а целевых иммуноглобулинов – полиэтиленгликолем. Эта технология была взята за основу и несколько модифицирована (особенности приготовления раствора полиэтиленгликоля, включение в технологию дополнительных стадий центрифугирования и ультрафильтрации). Исследования по подбору стабилизаторов и других вспомогательных веществ завершились включением в готовую форму глицина (не более 2%) и глицерина (не более 5%).

С помощью разработанной технологии были приготовлены три экспериментально-производственные серии препарата «КИП назальный», представляющего собой раствор, предназначенный для закапывания в нос. Серии препарата были проконтролированы согласно ФСП 42-0194695405 на «Иммуноглобулиновый комплексный препарат (КИП)», а также проанализированы методом ИФА с помощью соответствующих тест-систем фирмы «Euroimmun» (Германия) на содержание антител IgG-, IgA-, IgM-классов к ряду респираторных патогенов вирусной и бактериальной природы. Характеристика серий представлена в таблице 1. Таким образом, модифицированная технология позволяет получать новую – жидкую – форму КИП, с содержанием белка 3,0–3,5%, нейтральным значением pH, содержанием основных классов иммуноглобулинов – 60–70% IgG, 10–20% IgA и около 20% IgM, специфической активностью в отношении этиологически значимых патогенов.

Таблица 1.

Иммунохимическая характеристика
экспериментально-производственных серий препарата «КИП назальный»

Наименование параметра		Значение параметра		
		Серия 1	Серия 2	Серия 3
Содержание белка		35,6 мг/мл	31,2 мг/мл	31,7 мг/мл
		7,09	7,30	7,27
Соотношение основных классов иммуноглобулинов		IgG – 70,5%, IgA – 10,0%, IgM – 19,5%	IgG – 63,6%, IgA – 18,2%, IgM – 18,2%	IgG – 62,8%, IgA – 17,4%, IgM – 19,8%
IgG-антитела	Вирусы гриппа A+B	113 Ед/мл	148 Ед/мл	155 Ед/мл
	РСВ	152 Ед/мл	175 Ед/мл	178 Ед/мл
	M.pneum.	не определяли	30 Ед/мл	31 Ед/мл
	S.aureus	1:10240	не определяли	не определяли
	Дифт. токсин	не определяли	0,74 МЕ/мл	0,72 МЕ/мл
IgA-антитела	Вирусы гриппа A+B	R=1,34	R=1,2	R=1,1
	РСВ	R=1,13	не определяли	не определяли
	M.pneum.	не определяли	R=2,4	R=2,1
	S.aureus	1:2560	не определяли	не определяли
IgM-антитела	S.aureus	1:160	не определяли	не определяли

Примечание: антитела к белково-полисахаридному антигену стафилококка определяли в лаборатории иммунологических методов исследования ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова» РАМН.

В рамках доклинического изучения полученные экспериментально-производственные серии препарата «КИП назальный» были испытаны на безвредность (переносимость) на приматах (макаки резус) на базе ФГБУ «НИИ медицинской приматологии» РАМН (г. Сочи-Адлер). Испытания продемонстрировали хорошую переносимость препарата. Не было отмечено негативного влияния на поведение и общее состояние животных, не зафиксировано повышение температуры, изменение массы тела, наличие каких-либо катаральных, диспептических явлений или симптомов интоксикации.

Были проведены также исследования фармакокинетики новой лекарственной формы КИП при интраназальном введении здоровым добровольцам. Для этого препарат был помечен биотином, а для выявления биотинилированных иммуноглобулинов трех основных классов в составе КИП или в биологическом образце были сконструированы соответствующие иммуноферментные тест-системы [1]. Испытуемый получал препарат 3 раза в день в течение 5 дней (предполагаемый курс приема). Ежедневно в течение 5 дней приема КИП и 10 дней после приема проводили сбор образцов слюны. Было продемонстрировано, что биотинилированные молекулы иммуноглобулинов всех исследованных изотипов стабильно обнаруживаются в слюне через 15 минут после каждого приема препарата в течение всех 5 дней курса. Кроме этого, биотинилированные молекулы IgG, IgA и особенно IgM обнаруживались в слюне и в более поздние сроки наблюдения (через 1 ч.). Отмечалось наличие следов биотинилированного IgM в слюне даже через 2-8 дней по окончании приема препарата. Вероятно, при интраназальном введении препарата какая-то часть иммуноглобулиновых молекул сорбируется на эпителии носовых ходов, а в слюну попадает значительно позже. В целом же, на следующий день по окончании пятидневного курса приема препарата и в остальные дни исследования биотинилированные молекулы иммуноглобулинов в слюне уже не обнаруживались. Они попадают в пищеварительный тракт и их дальнейшая фармакокинетика напоминает фармакокинетику перорально введенных иммуноглобулинов, продемонстрированную нами ранее [2]. Выявлено также, что на фоне ежесуточных колебаний в слюне концентрации иммуноглобулинов содержание общих IgG, IgA и IgM возрастает после интраназального введения КИП.

Таким образом, на базе модифицированной технологии получения КИП разработана его новая лекарственная форма – «КИП назальный» – и проведены исследования по доклиническому изучению препарата.

Литература:

1. Новикова Л.И. Конструирование иммуноферментных тест-систем для анализа биотинилированных форм комплексного иммуноглобулинового препарата / Новикова Л.И., Алешкин В.А., Зуева М.М., Борисова И.В., Панурина Р.Л. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные представления об иммунокоррекции». – Пенза, 2008. – с. 80–82.

2. Новикова Л.И. Изучение фармакокинетики комплексного иммуноглобулинового препарата при пероральном введении / Новикова Л.И., Зуева М.М., Алешкин В.А., Борисова И.В., Панурина Р.Л. //International journal on immunorehabilitation. – 2010. – т. 12, № 2. – с. 236–237.

3. Русанов В.М., Левин И. Лечебные препараты крови. – М.:ИД МЕДПРАКТИКА-М, 2004. – 284 с.

4. Weltzin, R. Intranasal antibody prophylaxis for protection against viral disease/ Weltzin, R., Monath T.P. // Clin. Microbiol. Rew. – 1999. – vol. 12, № 3. – p. 383–393.

ТЕХНОЛОГИЯ ВЫСУШИВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ВХОДЯЩИХ В СОСТАВ ПРЕПАРАТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДНК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Степанов А.В., Майоров Н.В., Осина Н.А., Матвеева Ж.В., Никифоров А.К.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

sgdp@rambler.ru

Чума, холера, сибирская язва и другие опасные болезни продолжают оставаться наиболее влиятельными факторами, нарушающими стабильность мирового сообщества, приводящими к существенному экономическому ущербу, вызывая чрезвычайные ситуации и играть важную роль в качестве возможных агентов биологического терроризма [1, 2].

Специфическая экспресс-индикация патогенных биологических агентов (ПБА) осуществляется посредством таких методов, как бактериоскопия, метод флуоресцирующих антител (МФА), серология, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР). К настоящему времени ПЦР является одним из наиболее совершенных диагностических методов лабораторной диагностики. Реакция позволяет в короткий срок с высокой достоверностью обнаруживать ДНК возбудителей опасных инфекций, что может послужить сигналом к своевременному началу противоэпидемических мероприятий, а также определить характер их проведения.

РосНИПЧИ «Микроб» является центром по генной диагностике особо опасных инфекций Российской Федерации. Институт разрабатывает, изготавливает и обеспечивает лаборатории центров Госсанэпиднадзора зарегистрированными генодиагностическими препаратами для индикации и идентификации ДНК возбудителей особо опасных болезней.

В лаборатории генодиагностических препаратов производятся зарегистрированные ПЦР-тест-системы с коммерческими названиями «ГенПест», «ГенХол», «ГенСиб» и «ГенБру» [3, 4, 5, 6]. С 2003 года в лаборатории налажена и внедрена в практику здравоохранения технология твердофазного фосфорамидитного синтеза олигонуклеотидов [7]. Существующая схема

синтеза позволяет получать праймеры в виде водных растворов, которые входят в состав изготавливаемых препаратов.

К основному недостатку большинства выпускаемых в настоящее время препаратов для генной диагностики следует отнести транспортировку и хранение в условиях так называемой «холодовой цепи». Это создает ощутимые неудобства их использования, особенно при чрезвычайных ситуациях. Поскольку большинство генодиагностических препаратов содержит реагенты в жидкой форме, сохраняется опасность их контаминации окружающей микрофлорой. Это явление, не имеющее внешних признаков, может привести к снижению диагностической эффективности препарата. Для исключения таких осложнений растворы ингредиентов фильтруют или добавляют в них бактериостатики. Однако это полностью не решает проблемы, поскольку бактериальное загрязнение может возникнуть в процессе работы, а бактериостатики, являясь ингибиторами ПЦР, снижают специфическую и аналитическую активность препарата.

С учётом изложенного, нами была поставлена задача – провести исследования направленные на разработку вариантов генодиагностических препаратов для детекции особо опасных патогенов, не требующих особых условий хранения и транспортировки.

Эксперименты было решено начать с разработки технологии, позволяющей сохранять растворы олигонуклеотидов без потери аналитических и специфических характеристик. На основании результатов проведенных нами исследований по оптимизации технологии синтеза олигонуклеотидов [8], в качестве объекта изучения были выбраны праймеры ctx2 и ctx3, входящие в состав изготавливаемого коммерческого препарата «ГенХол» [4].

Вначале мы сосредоточили усилия на лиофилизации. Высушивание водных растворов олигонуклеотидов осуществляли на настольной лиофильной установке Martin Christ (Германия). Растворы праймеров в объеме 0,3 мл замораживали при минус 50°С и высушивали в открытых 1,5 мл полипропиленовых пробирках при минус 49–54°С. Отрицательное давление поддерживали на уровне 200–170 мторр. В качестве криопротектора использовали сахарозу в концентрациях: 0,5; 1; 3 и 6%. Полное высушивание занимало 6 часов. К полученным вариантам добавляли воду до исходного объёма, определяли оптическую плотность и изучали в ПЦР.

В результате установлено, что лиофилизация растворов олигонуклеотидов без криопротектора приводила к потере продукта – от 50 до 70%. При добавлении сахарозы 0,5 и 1% потери составляли – 11 и 5% соответственно. При содержании сахарозы 3 и 6% – потерь не отмечалось, однако 6% концентрация – снижала специфическую активность препарата на порядок – с $1x10^3$ до $1x10^4$ м. кл./мл.

Несмотря на достигнутые результаты было решено отказаться от лиофилизации в связи с высокими затратами ресурсов оборудования, рабочего времени и электроэнергии.

В дальнейшем, учитывая прочную химическую структуру олигонуклеотидов, их устойчивость к нагреванию и высушиванию, было решено продолжить исследования с использованием вакуумного концентратора Eppendorf 5301.

Вакуумный концентратор представляет собой центрифугу с предустановленной скоростью вращения 1400 об/мин, в которой при повышенной температуре и отрицательном давлении происходит испарение входящей в состав препарата жидкости.

Высушивание праймеров в вакуумном концентраторе проводили в объеме 300 мкл в открытых 1,5 мл полипропиленовых пробирках при 30, 45 и 60°С и отрицательном давлении 20 мБар. Время высушивания определяли опытным путем.

В результате проведенных экспериментов установлено, что быстрая и качественная сушка олигонуклеотидов отмечалась при 60°С в течение 1,5 часов. Высушенные варианты были охарактеризованы количественно – с использованием спектрофотометра и качественно – в ПЦР. При данном способе обработки олигонуклеотидов потерь продукта, а также снижения специфической и аналитической активности не отмечалось.

Для изучения активности в отдалённых сроках наблюдения праймеры помещали в различные условия хранения. Часть аликвот оставляли морозильной камере при минус 20°С, другую – при комнатной температуре. Затем, в течение года с интервалом 3 месяца образцы изучали в ПЦР. Специфическую и аналитическую активность праймеров проверяли посредством их использования в составе коммерческого препарата «ГенХол» с панелью стандартных разведений ДНК *V.cholerae* 569B в соответствии с прилагаемой инструкцией. Результаты постановки ПЦР представлены на рисунке 1.

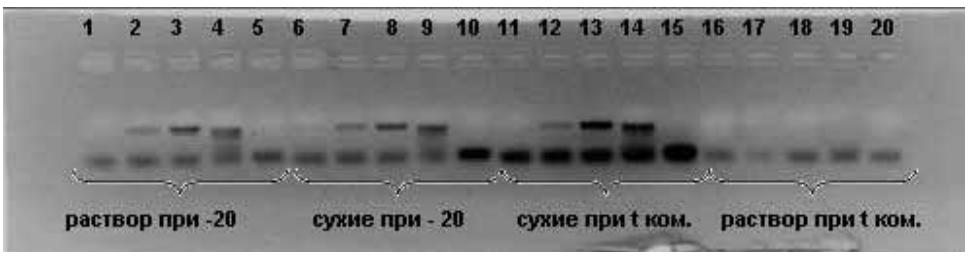


Рисунок 1. Результаты ПЦР с растворами и высушенными праймерами, хранившимися в течение 12 месяцев в различных условиях.

Треки 1 - 5 – растворы праймеров, хранившиеся при –20°С; 6–10 – сухие олигонуклеотиды, хранившиеся при –20°С; 11–15 – сухие олигонуклеотиды, хранившиеся при комнатной температуре; 16–20 – растворы праймеров, хранившиеся при комнатной температуре. Треки 1, 6, 11, 16 – 0,073 нг/мл холерной ДНК; 2, 7, 12, 17 – 0,146 нг/мл холерной ДНК; 3, 8, 13, 18 – 0,293 нг/мл холерной ДНК; 4, 9, 14, 19 – 1500 нг/мл холерной ДНК; 5, 10, 15, 20 – отрицательный контроль.

Как видно на рисунке 1, высушенные с помощью вакуумного концентратора Eppendorf 5301 олигонуклеотиды, помещенные на хранение в морозильную камеру холодильника (треки 6–10) и при комнатной температуре (треки 11–15) – стабильно сохраняли специфическую и аналитическую активность в течение года. Водные растворы праймеров, хранившиеся при комнатной температуре (треки 16–20) – полностью утратили свои свойства.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов разработана технология высушивания водных растворов олигонуклеотидных праймеров, входящих в состав препарата для генной диагностики холеры. Её применение позволяет сохранять олигонуклеотиды без соблюдения условий «холодовой цепи» до 12 месяцев без снижения их аналитических и специфических характеристик.

Предлагаемая технология может быть использована для конструирования устойчивых к неблагоприятным условиям хранения генодиагностических препаратов.

Литература:

1. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территории в современных условиях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:17–23.

2. Онищенко Г.Г. Борьба с инфекционными болезнями – приоритетная тема председательства Российской Федерации на саммите «Группы восьми» в 2006 г. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 7:3–7.

3. «ГенПест» – тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции. Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00096 дата регистрации 17.05.2013.

4. «ГенХол» – тест-система для выявления ДНК токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* (ctxA$^+$) методом полимеразной цепной реакции. Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00100 от 17.05.2013.

5. «ГенСиб» – тест-система для выявления ДНК *Bacillus anthracis* pXO1$^+$ методом полимеразной цепной реакции. Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00101 от 17.05.2013.

6. «ГенБру» – тест-система для выявления ДНК *Brucella spp.* методом полимеразной цепной реакции. Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00099 дата регистрации 17.05.2013.

7. Степанов А.В., Майоров Н.В., Тучков И.В., Матвеева Ж.В., Дятлов И.А., Внедрение технологии синтеза олигонуклеотидных праймеров как компонента ПЦР-тест-систем для диагностики чумы, холеры, сибирской язвы и бруцеллеза. Матер. 6-й Межгосударственной научно-практической конф. государств участников СНГ. 13-14 сентября 2005 г., Волгоград, с. 292–293.

8. Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Совершенствование синтеза олигонуклеотидных праймеров для производства ПЦР-тест-систем. Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, Выпуск 105, 2010., с. 63–67.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ В РНГА АНАЛИТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТАРНОГО ХОЛЕРНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА

Куделина А.М. [1], Кулаков М.Я. [1], Новицкая И.В. [1], Ларионова Л.В.[2], Терентьев А.Н. [2], Кругликов В.Д. [2], Дубина И.А. [1]

[1] ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград

[2] ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

irvnov@mail.ru

На современном этапе манифестации седьмой и восьмой пандемий холеры в условиях ее возможного завоза из эндемичных очагов, а также поддерживания очагов инфекции из-за выраженной способности возбудителей как 01, так 0139 серогрупп персистировать в воде открытых водоемов проблема совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции становится особенно актуальной.

РНГА с иммуноглобулиновым диагностикумом как экспресс-метод позволяет дать первый сигнальный ответ о наличии возбудителя в пробе и рекомендована в схемах специфической индикации холерных вибрионов [1]. Однако для определения уровня иммунного ответа и динамики антителообразования у больных требуется создание диагностикума на основе антигенных структур возбудителей. При этом использование эритроцитов как биологических носителей, с нашей точки зрения, не только позволяет четко визуализировать реакцию, но и способствует повышению чувствительности конструируемого препарата.

Цель нашего исследования сводилась к разработке экспериментальных серий эритроцитарного холерного антигенного диагностикума и изучению их аналитических характеристик (чувствительности и специфичности) при выявлении холерных сывороточных антител.

В качестве носителя использовали эритроциты барана, поверхность которых с целью облегчения связывания с сенситином обрабатывали формалином и танином. Эритроциты отбирали в стеклянную колбу и непрерывно перемешивали в течение 30 мин с раствором лимоннокислого натрия в конечной концентрации последнего 5%, после чего отмывали 0,15 М раствором NaCl (pH 7,2) путем трехкратного центрифугирования при 1000–1200 об/мин в течение 20–30 мин. Затем к взвеси эритроцитов добавляли равный объем 3% раствора формальдегида и инкубировали смесь в течение 20 часов (t +37°C) при постоянном перемешивании, после чего трижды отмывали путем центрифугирования с помощью 0,15 М раствора NaCl (pH 7,2).

Для танизации формалинизированные эритроциты в 2,5%-ной концентрации смешивали с равными объемами раствора танина 1:40000 и инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 15 минут [4].

Сенситинами служили инактивированные ацетоном и кипячением клеточные лизаты штаммов холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп: *V. cholera*

cholerae 1395; *V. cholera eltor Ogawa* 2044; *V. cholera eltor Inaba* 13020 и V. cholerae O139 16064, любезно предоставленные сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Для контроля иммунологической активности антигенных препаратов использовали иммунные кроличьи сыворотки к штаммам *V. cholera cholerae* 1395, *V. cholerae eltor Ogawa* 2044,*V. cholera eltor Inaba* 13020 и *V. cholerae* O139 с титром в РИД от 1:16 и выше.

Подбор оптимальной сенсибилизирующей дозы для каждого антигенного комплекса осуществляли эмпирическим путем, используя клеточные лизаты в конечных концентрациях от 3,25 мкг/мл до 282 мкг/мл. Сенсибилизацию носителя с антигенным комплексом проводили при 45°С в течение 90–150 минут в фосфатно-солевом буфере при pH 5,9 в соотношениях 1:1; 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5.

Для удаления несвязавшегося сенситина эритроциты, нагруженные соответствующими антигенами, отмывали 0,15 М раствором NaCl (pH 7,2) путем их центрифугирования при 2500–3000 об/мин в течение 15-20 мин.

Оказалось, что наиболее эффективно сенсибилизация формалинизированных танизированных эритроцитов барана была проведена клеточными лизатами вибрионов холеры, инактивированными кипячением, что, по-видимому, прежде всего было связано с более высоким содержанием в них белка. При этом оптимальное соотношение компонентов реакции определено как 1:4. Время полного связывания сенситина с носителем составило 150 мин; при дальнейшем увеличении сроков инкубации качество экспериментальных серий препаратов существенно не изменялось. Оптимальная сенсибилизирующая доза антигенной нагрузки определена в диапазоне 50–70 мкг/мл (для лизатов *V. cholera cholerae* 1395 - 70,5 мкг/мл, *V. cholera eltor Ogawa* 2044 – 51,4 мкг/мл, *V. cholera eltor Inaba* 13020 – 60,5 мкг/мл, и *V. cholerae* O139 16064 70,5 мкг/мл). Увеличение белковой нагрузки на носитель в отдельных наблюдениях вызывало спонтанную агглютинацию эритроцитов, в то время как снижение концентрации используемого сенситина сопровождалось, как правило, падением чувствительности РНГА.

Постановку РНГА осуществляли микрометодом на полистироловых планшетах микротитратора системы Takatsy в лунках с U-образным дном вместимостью 0,25 мл по общепринятой методике [2]. Последняя лунка каждого ряда служила контролем, подтверждающим отсутствие спонтанной агглютинации сенсибилизированных эритроцитов.

Иммунные сыворотки в разведении 1:10 титровали двукратным шагом. Разводящей жидкостью служила нормальная кроличья сыворотка, содержашая формалин в конечной концентрации 1%. Добавление формалина поддерживало pH среды и стабилизировало нагруженные эритроциты [3]. Постановку РНГА осуществляли как в макро-, так и микроварианте [4]. Учет реакции проводили через 2-3 часа после постановки реакции и окончательно – на следующие сутки.

При регистрации результатов РНГА установлено, что эритроциты, сенсибилизированные *V. cholera cholerae*, выявляли антитела к холерным

вибрионам в иммунных сыворотках к штаммам *V. cholera cholerae*, *V. cholera eltor Inaba* и *V. cholerae* O139 в титрах 1:640 – 1:2560 и в кроличьих сыворотках против *V. cholera eltor Ogawa* – в титрах 1:160–1:320.

Серии диагностикума на основе *V. cholera eltor Ogawa* 2044 выявляли специфические антитела в сыворотках кроликов против *V. cholera eltor Ogawa*, *V. cholera eltor Inaba*, *V. cholerae* O139 в разведении последних 1:1280 – 1:2560 и в анти-*V. cholera cholerae* сыворотках – в титрах 1:160–1:320.

Диагностикум на основе клеточных лизатов *V. cholerae eltor Inaba* 13020 выявлял антитела во всех иммунных сыворотках в титрах от 1:160 до 1:640.

Препарат на основе клеточного лизата *V. cholera* O139 преимущественно (в титрах 1:640-1:1280) выявлял сывороточные антитела к штамму *V. cholera O139*, в то время как титры реакции с сыворотками против *V. cholera cholerae*, *V. cholera eltor Inaba* и *V. cholera eltor Ogawa* составляли 1:160-1:320; что согласуется с данными о принадлежности этих групп вибрионов к разным сероварам.

Специфичность каждого из полученных препаратов оценена на наборе 5 коммерческих диагностических сывороток (чумной, туляремийной, бруцеллезной, сибиреязвенной, салмонеллезной), а также 5 интактных сывороток неиммунных кроликов. Для всех используемых контрольных сывороток в их разведении от 1:10 и выше ложноположительных результатов РНГА с диагностикумами на основе клеточных лизатов *V. cholera cholerae*, *V. cholera eltor Ogawa, V. cholera eltor Inaba*, а также *V. cholerae* O139 зарегистрировано не было.

Таким образом, на основе лизатов клеток холерных вибрионов 01 и 0139 сероваров осуществлено конструирование экспериментальных серий эритроцитарного холерного антигенного диагностикума, способного выявлять в РНГА специфические агглютинины сывороток кроликов в диагностических титрах (от 1:160 и выше), что может быть в дальнейшем использовано на различных этапах диагностики холеры.

Литература:

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред. Г.Г. Онищенко и В.В. Кутырева. – М., 2013. – с. 83.

2. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. – М., «Медицина», 1976.

3. Кривошея П.Ю. Стандартизация условий постановки реакции непрямой гемагглютинации вируса ринопневмонии лошадей. Вісник аграрної науки – 2012. – № 11 – с. 28–30.

4. Кулаков М.Я., Новицкая И.В., Пушкарь В.Г. Преимущества микроварианта реакции непрямой гемагглютинации в эпидемиологическом надзоре за некоторыми особо опасными инфекциями Ж. Инфекционные болезни. – 2011, т. 9. – Приложение 1. Материалы III Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – М.,28–30 марта 2011 г. – с.354.

ФАРМАКОКИНЕТИКА ЛИПОСОМАЛЬНОГО МЕРОПЕНЕМА

Лучинин Д.Н., Ротов К.А., Тихонов С.Н., Снатёнков Е.А.
ФКУЗ «Волгоградский научно исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград
vari2@sprint-v.com.ru

Проблема лечения особо опасных инфекционных заболеваний остаётся актуальной. Сложности терапии этих заболеваний, в основном, связывают с внутриклеточным расположением микроорганизмов и быстрым формированием антибиотикорезистентности. Для решения данной проблемы наиболее эффективным является получение и внедрение в медицинскую практику новых антибактериальных препаратов и разработка систем их направленного транспорта. В настоящее время активно ведутся исследования по внедрению липосомальных препаратов в лечебную практику [3]. Однако фармакокинетика липосомальных препаратов изучена недостаточно[1, 4].

Вах с соавт. провели оценку фармакокинетических параматеров меропенема [2]. Показатели фармакокинетики составляли: Cmax-55,4 мг/л, T1/2-0,96 ч, AUC-66,9мг*ч/л

Целью наших исследований явилось изучение фармакокинетических параметров липосомальной формы меропенема.

Для исследования системных параметров готовили липосомы методом выпаривания и обращения фаз [5] с меропенемом и люминолом в качестве метки. Исследования проводились на беспородных белых мышах массой 18-20 г. по 10 животных в группе. Препарат вводили внутрибрюшинно в дозе 1,0 мг. Через 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 ч после введения препарата забирали кровь для исследования. Измерение интенсивности свечения проводили на хемолюминометре БХЛ-07. Расчёт фармакокинетических параметров проводили с помощью программы M – IND.

Нами были получены следующие значения основных фармакокинетических параметров липосомального меропенма: Cmax-90,8 мкг/мл, T1/2-3,45 ч, AUC-333,6 мг*ч/л.

При сравнении основных показателей фармакокинетики липосомального и свободного меропенема выявлены значительные различия. Иммобилизованный меропенем сравнительно быстро всасывался из брюшной полости, создавая максимальные концентрации в крови на уровне 90,8 мкг/мл через 1 ч после введения. В последующие 2 и 4 ч липосомальный антибиотик сохранялся в крови в концентрациях 40,3 мкг/мл и 31,7 мкг/мл, а к 8 ч исследования его уровень составил 30,1 мкг/мл. Даже через 24 и 48 ч препарат определялся в крови экспериментальных животных в концентрациях 9,2 мкг/мл и 6,5 мкг/мл.

При сравнении значений площади под фармакокинетической кривой (AUC) выявлено, что иммобилизация антибиотика в фосфолипидные везикулы позволило увеличить количество препарата в системном кровотоке в 4.9 раза.

В наших экспериментах липосомальный меропенем имел величину периода полувыведения в 3,6 раза большую, чем свободный антибиотик. Это

свидетельствовало о более медленном выведении из кровотока липосомального препарата после однократного введения.

Таким образом, проведенные исследования выявили существенные различия фармакокинетических параметров, которые выражаются в достоверном увеличении большинства значимых показателей. Высокий уровень в крови и снижение скорости выведения антибиотика, иммобилизованного в липосомы, может свидетельствовать в пользу увеличения его терапевтической активности.

Литература:

1. Barza M., Stuart M., Szoka F. Jr. Effect of size lipid composition on the pharmacokinetics of intravitreal liposomes // Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. 1987. V28. № 5. P. 893–900.

2. Bax R.P., Bastain W., Featherstone A. et al. The pharmacokinetics of meropenem in volunteers // J. Antimicrob. Chemother. 1989. V9. №24: Suppl A: 311-20.

3. Hafner A, Lovrić J, Lakoš GP, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions // Int J Nanomedicine 2014. Feb. 9. № 9. P. 1005–1025

4. Swenson C.E., Stewart R.E., Hammett J.L., Fitzsimmons W.E., Ginsberg R.S. Pharmacokinetics and in vivo activity of liposome-encapsulated gentamicin // Antimicrob. Agents Chemother. 1990. V34. № 2. P. 235–240.

5. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1978. – V.75, N 9. – P. 4194–4198.

К ВОПРОСУ РАЗРАБОТКИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА КОМПОЗИЦИОННОГО ОРГАНОКРЕМНЕЗЕМНОГО МИКРОГРАНУЛИРОВАННОГО МАГНОСОРБЕНТА

Старцева О.Л., Курчева С.А., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь

labdiagn@yndex.ru

В создании новых диагностических препаратов одним из перспективных направлений является применение сорбентов с магнитными свойствами, являющихся твердофазной матрицей для селективного концентрирования на их поверхности различных биологически активных агентов [1]. Многолетние исследования в этой области привели к созданию магноиммуносорбентов (МИС) и внедрению в практику тест-систем магноиммуносорбентных для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций в иммуноферментном анализе [2, 3, 4].

С целью стандартизации магноиммуносорбентных МИБП и налаживания их производственного выпуска нами проводится разработка биотехнологии получения стандартного образца (СО) предприятия - композиционного

органокремнеземного микрогранулированного магносорбента (МС). Для этого составлена программа разработки, устанавливающая порядок и технологические этапы производства стандартного образца.

Программа разработки стандартного образца предприятия МС предусматривает:

– обоснование назначения с указанием предполагаемых аттестуемых характеристик стандартного образца и методов их определения с проведением валидации;

– выполнение научно-исследовательских (экспериментальных) работ;

– изготовление СО с указанием оптимальных условий синтеза и выявлением основных контрольных критических точек (ККТ) этапов производства;

– обоснование сроков годности СО методом ускоренного теста;

– разработка нормативных документов на СО.

Основными аттестуемыми характеристиками разрабатываемого СО являются: физико-химические характеристики, размер (диаметр) магнитных частиц (мкм), удельная поверхность ($м^2/г$), объём пор ($см^3/г$), также подлежат оценке стабильность и срок годности. В виду того, что стандартный образец МС предназначен для изготовления на его основе магноиммуносорбента, к аттестуемым характеристикам следует отнести сорбционную емкость и биологические показатели (специфичность и специфическую активность).

Проведение валидации технологических процессов и методов контроля позволят документально подтвердить соответствие условий производства требованиям нормативной документации, предъявляемым к стандартным образцам, как компонентам МИБП [5, 6, 7].

Для оптимизации технологического процесса изготовления СО необходимо предварительно осуществить подбор сырья, отработать методы синтеза, определить основные технологические параметры, влияющие на качество конечного продукта, выявить основные контрольные критические точки производства, провести аттестацию технологического оборудования, задействованного в производстве СО.

Завершением работы станет разработка нормативных документов на СО МС (свидетельства, инструкции по применению) и их утверждение.

Поэтапное выполнение программы разработки стандартного образца магносорбента приведет к созданию готового препарата с установленными значениями физико-химических и биологических параметров, воспроизводимых от серии к серии. Применение СО МС в качестве магнитной матрицы для изготовления МИС значительно повысит биологические характеристики магноиммуносорбентных диагностических тест-систем и наборов реагентов и, как следствие, достоверность результатов проводимых лабораторных исследований.

Литература:

1. Применение трепонемных магнитных иммуносорбентов в иммуноферментном анализе для диагностики сифилиса / И.А. Базиков, И.С. Тюменцева, Е.Н Афанасьев // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2000. – Вып. 3. – С. 44–46

2. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики особо опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Л.В. Ляпустина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2009. – Вып. 101. – С. 59–61.

3. Способ обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды / В.И. Ефременко, И.С. Тюменцева, М.Н. Касторная [и др.] // Патент РФ № 2218411; дата заявки 27.12.2001; опубл. 10.12.2003.

4. Способ проведения иммуноферментного анализа / Д.В. Ефременко, И.В. Жарникова, А.А. Ефременко [и др.] // Патент РФ № 2290641; дата заявки 30.03.2005; опубл. 27.12.2006.

5. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. – М.: Госстандарт. – 2009. – 138 с.

6. Валидация химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и предоставления результатов: МУ 3.3.2.1886-04. – М.: Роспотребнадзор, 2004. – 39 с.

7. Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов: СП 3.3.2.1288-2003. – М.:Минздрав России, 2003. – 80 с.

ПРИРОДНЫЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ КАК АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Киреев М.Н., Овчинникова М.В., Аленкина Т.В., Уткин Д.В., Ерохин П.С., Полунина Т.А., Касьян И.А., Никифоров А.К.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Ранее мы говорили о применении материалов из природных полисахаридных биополимеров в качестве контейнеров или матрикс-депо для компонентов химических вакцин – антигенов. В настоящее время накопилось достаточное количество фактических экспериментальных данных, позволяющих говорить о возможности и перспективах использования полисахаридов природного происхождения не только как контейнеров для антигенных компонентов медицинских иммунобиологических препаратов, но и как активных составляющих для химических вакцин антигенного и клеточного уровня, позволяющих усилить иммунный ответ макроорганизма на введенные антигены и снизить возможные неблагоприятные последствия применения лекарственных препаратов. Особенно интересны перспективы применения биосовместимых и биодеградируемых природных полисахаридов при конструировании трансдермальных форм вакцинных препаратов.

При создании современных медицинских иммунобиологических препаратов для профилактики, лечения и диагностики, все чаще применяют

природные биополимеры, такие как хитозан и альгинат натрия. Это обусловлено тем, что данные вещества хорошо совместимы с активными компонентами изделий медицинского назначения и не оказывают негативного влияния на макроорганизм. Напротив они обладают уникальными свойствами, так хитозан обладает бактерицидной активностью, биоциден, тормозит развитие грибов, совместим с тканями человека, обладает адъювантным действием, биодеградируется полностью до простых сахаров, которые выводятся из организма. Все эти свойства биотехнологии могут изменять (ослаблять или усиливать) и использовать в создаваемых препаратах.

При изучении материалов полученных разными способами из хитозана при помощи световой и сканирующей зондовой микроскопии на атомно-силовом микроскопе Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) в режимах прерывистого и непрерывного контакта (методами рассогласования, латеральных сил и модуляции силы) показано, что модифицированные образцы хитозана имеют высокие показатели адгезии.

На рисунке показаны разные варианты сорбентов полученных из модифицированного хитозана. Данный факт очень важен при конструировании изделий медицинского назначения основанных на принципах удержания антигенов, анатоксинов, ферментов, или иммуноглобулинов с дальнейшим использованием биологической активности этих компонентов в макроорганизме (вакцины, лекарственные препараты) или в диагностических наборах (биологические микрочипы для детекции антигенов и антител). Во всех этих препаратах принципиально, что природные биополимеры, при своей биоинертности практически не изменяют основные характеристики биологически активных веществ.

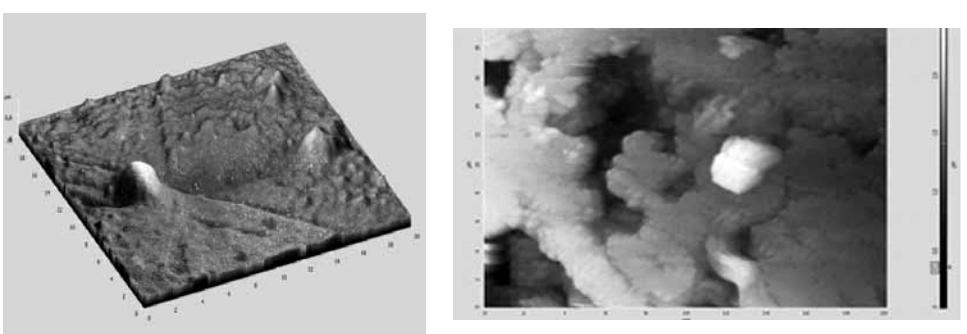


Рисунок. Зондовая микроскопия хитозановых мембран, модифицированных разными способами.

Как сказано выше, высокая сорбционная способность материалов из природных биополимеров важна и при создании лечебных сорбентов и профилактических препаратов. В настоящее время все большее внимание уделяют альтернативным способам введения в организм пациента медикаментозных препаратов, в том числе вакцин. Для ряда инфекций перспективным является применение трансдермального способа введения. При конструировании

таких систем, наиболее подходящими материалами, на наш взгляд, являются композиции из природных полимеров животного и растительного происхождения – хитозана и альгината натрия. Они обладают рядом свойств, которые будут полезны для биотехнологов. Хитозан имеет выраженное бактерицидное и биоцидное действие. Оба полимера могут быть в различном агрегатном состоянии – порошкообразном, растворе, в виде пленок и мембран, микро- и нанокапсул. Нативные и модифицированные хитозан и альгинат и их композиции имеют высокую сорбционную емкость, что позволяет получать препараты с необходимыми (терапевтическими) дозами антигенов химической вакцины при небольшом объеме матрикса. Введенные в такие полимерные носители биологически активные компоненты вакцины (антигены, ферменты, анатоксины), благодаря сетчатой структуре матрикса и большой связывающей способности, могут в значительных, но строго дозированных количествах, удерживаться полимерным носителем. При применении таких форм в лечебной практике, антигены будут в заранее определенное время выходить из матрикса и оказывать свое действие на макроорганизм.

Таким образом, матриксы и покрытия из экологически чистых, биосовместимых и биодеградируемых природных полимерных материалов могут быть использованы при конструировании современных профилактических, лечебных и диагностических, препаратов, эффективных и безопасных.

КОНТРОЛЬ РЕЖИМОВ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Вахрушина Н.И., Шульгина И.В., Галетова С.С., Лобовикова О.А., Холматов К.И.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Питательные среды (ПС) используют в технологии производства лечебно-профилактических и диагностических средств, а так же они являются самостоятельными изделиями медицинского назначения. При приготовлении ПС одной из важнейших операций является стерилизация, для которой, как правило, используют способ стерилизации влажным теплом в паровых стерилизаторах [1, 2].

Деструкция микроорганизмов физическими и химическими методами подчиняется экспоненциальному закону. По современным требованиям максимальный уровень обеспечения стерильности 10^{-6}, что означает, в среднем из миллиона единиц продукции в партии изделий одна может оказаться нестерильной [3, 4].

Эффективность паровой стерилизации ПС зависит от многих факторов: температуры, давления, продолжительности воздействия насыщенного пара при температуре стерилизации, полноты удаления воздуха из камеры, конфигурации и объема емкостей, полноты заполнения камеры, уровня перво-

начальной контаминации сырья, посуды и др. [2]. Стерилизация является примером специального процесса, поскольку ее эффективность не может быть проверена во всей партии продукции. Таким образом, режим стерилизации ПС должен быть валидирован, т.е. аттестован адекватными методами контроля, до его практического использования на конкретном оборудовании в соответствие с ГОСТ Р ИСО 11134-2000 [5]. В процессе работы необходим постоянный внутрипроизводственный контроль режимов стерилизации – проведение регулярных мероприятий по получению, документированию и интерпретации данных, необходимых для доказательства надежности стерилизации и соответствия продукции заданным требованиям.

Для контроля стерилизации в настоящее время предложены методы: физические (контроль физических параметров средствами измерения), химические (контроль изменения цвета химических индикаторов) и биологические (контроль роста споровых тест-культур после стерилизации) [6, 7]. Текущий (оперативный) и периодический контроль работы стерилизационного оборудования регламентируют МУК № 15/6-5 [8].

Метод контроля режимов паровой стерилизации растворов и ПС с применением химических индикаторов, размещаемых внутри емкости с ПС, регламентирован МУК 4.2.1991-05 [11]. Результат контроля химическими индикаторами становится известен сразу после завершения цикла стерилизации. Это достигается благодаря использованию «внутренних» индикаторов с контрольными значениями срабатывания, соответствующими минимально-достаточным условиям для прогрева всего объема материала. Таким образом, химические и физические методы контроля являются косвенными методами, не свидетельствующими о стерильности продукта. Стерильность ПС выборочно контролируют путем инкубации при (37±1) °С и (55±1) °С в течение 2–7 сут в соответствие с ГОСТ Р ЕН 12322-2010 и МУК 4.2.2316-08 [9, 10].

Для оперативной оценки эффективности стерилизации лекарственных растворов разработаны автономные биологические индикаторы (АБИ), порядок применения которых приведен в МУК 4.2.1036-01 [12]. Биологический метод контроля эффективности стерилизации основан на тепловой деструкции спор тест-культур, неустойчивых к действию определенных температур в течение времени стерилизационной выдержки. В АБИ совмещены в одном полимерном закрытом контейнере определенное количество высушенных спор тест-культур и специальная легко-ломающаяся стеклянная ампула с цветной ПС. АБИ размещают непосредственно внутри емкости с раствором.

АБИ относятся к типу интегрирующих многопараметрических индикаторов, в которых все факторы летальности влияют на тест-культуру так же, как на контаминирующую микрофлору в стерилизуемом продукте. Этот факт гарантирует надежность метода и позволяет отнести его к средствам прямого контроля [6].

Кинетика гибели тест-культуры в АБИ и контаминанта в растворе подчиняется одному закону, что обеспечивает высокую точность метода. Автономная система такого индикатора гарантирует отсутствие ложноположительного результата, вследствие загрязнения стерильного теста при

последующем посеве на цветную ПС, что присуще методу с использованием простого биоиндикатора.

Таким образом, в настоящее время существует достаточное количество средств контроля стерилизации растворов и ПС, но отсутствует система в их использовании [7]. Под системой контроля стерилизации подразумевается комплекс методов с указанием объема и периодичности их проведения и описанием порядка действий персонала в различных ситуациях. Системы контроля должны быть адекватны методу стерилизации, типу стерилизатора и его оснащенности штатными контрольно-измерительными устройствами, степени физического и морального износа.

Рекомендуемая нормативными документами в России, странах Западной Европы и Америки кратность использования метода биологического индикатора колеблется от двух раз в год до каждого стерилизационного цикла. Достоверно доказано, что увеличение частоты бактериологического контроля и использование этого метода для самоконтроля процесса стерилизации позволяет снизить процент неэффективной стерилизации [13].

Во ФКУЗ «Микроб» разработан алгоритм валидации режима стерилизации ПС, основанный на использовании физических (по показаниям дисплея стерилизатора, манометров, термометров), химического (использование наружных и внутренних термовременных индикаторов) и биологического методов контроля (использование АБИ). Работа осуществляется на аттестованном автоматическом стерилизационном оборудовании. Например, при производстве полусинтетической среды с индикатором феноловым красным для контроля процесса стерилизации (110°С в течение 30 мин) в паровом стерилизаторе STERIVAP HP 669-1ED (Чехия) одновременно используются термодатчик, погруженный в емкость с ПС, и следующие индикаторы: наружные «Фарматест 110/30», внутренние «Фарматест 110/10» и биологические «Биостер пар 112/10».

Валидацию режимов стерилизации ПС проводят с использованием образцов не менее трех серий ПС с целью доказательства, что процесс (в пределах установленных параметров) обладает повторяемостью и приводит к ожидаемым результатам при производстве продукта требуемого качества. Обязательным условием является использование одинаковых по объему и материалу емкостей с ПС. Количество контрольных точек, зависит от объёма стерилизатора: минимально 5 шт., максимально 13 шт. Для проведения самоконтроля допускается использование аналогичных по объёму ёмкостей, заполненных водой.

Если индикаторная метка хотя бы одного химтеста не достигла цвета эталона сравнения, то условия паровой стерилизации не были соблюдены и партия ПС считается не простерилизованной. Если во всех контрольных точках внутренние химтесты имеют цвет, соответствующий эталону, то биотесты АБИ извлекают из емкостей с ПС и помещают в термостат (37±1) °С одновременно с контрольным биотестом, не подвергнутым стерилизации. Изменение цвета, хотя бы одного биотеста (кроме контрольного) и его помутнение, свидетельствуют о нестерильности ПС.

При получении удовлетворительных результатов контроля стерилизационного процесса, качество ПС проверяют на соответствие химическим и биологическим показателям [10]. Отсутствие изменений показателей качества ПС свидетельствует об адекватном стерилизационном режиме.

Внутрипроизводственный контроль осуществляется физико-химическими методами при каждом стерилизационном цикле, а методом бионагрузки (АБИ) с кратностью не менее 1 раза в месяц, и после ремонта стерилизационного оборудования, а так же в случае выявления нестерильных образцов ПС.

При получении неудовлетворительного результата контроля проверяют правильность установки параметров стерилизационного режима, техническую исправность стерилизатора и соблюдение правил и норм загрузки. Стерилизатор допускается использовать после устранения причин его неудовлетворительной работы и получения положительных результатов контроля. При изменении цвета и помутнении АБИ, на фоне удовлетворительных результатов физико-химического контроля возможными причинами могут быть: нарушение нормы загрузки или неправильно выбранный стерилизационный режим в зависимости от первичной контаминации сырьевых компонентов ПС.

Литература:

1. htth: medinfo.dp.ua/stat/s207/htm. Global industriy Analisis. Inc. USA, 2009. / Дата обращения 25.09.2013.

2. Васильев Н.С., Лямкина О.Д. Проблемы паровой стерилизации водных растворов // Дезинфекционное дело. – 2005, № 1. – с. 57–62.

3. Матевосян М.Б., Бурцев П.Ю., Федоров Ю.И. Общие принципы термической инактивации микроорганизмов // Дезинфекционное дело. – 2005. – № 2. С.75–77.

4. Yong J.H. New Sterilization Technologies. In: Sterilization technology // Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 1997.

5. ГОСТ Р ИСО 11134-2000. Стерилизация медицинской продукции. Требования к валидации и текущему контролю. Промышленная стерилизация влажным теплом. – М.: Госстандарт России, 2000.

6. htth://www/remedium/ru/public/journal/rem_volga/2009~Антипов О.Н. Биологический контроль и обеспечение эффективности стерилизации / Дата обращения 20.11.2007.

7. htth: pharminfo.com.ua/ ~ Рубан Г.И. Средства контроля стерилизации // Дезинфекционное дело. – 1998. – № 2 / Дата обращения 25.09.2013.

8. Методические указания по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов № 15/6-5, утв. 28.02.1991 г.

9. ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. – М.: Стандартинформ, 2011.

10. Методические указания «Методы контроля бактериологических питательных сред» МУК 4.2.2316-08.

11. Контроль соблюдения условий паровой стерилизации растворов питательных сред с применением химических индикаторов. МУК 4.2.1991-05 // Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. – 2005, вып. 4 (22). – С. 87–100.

12. Контроль режимов стерилизации растворов лекарственных средств с помощью биологических индикаторов ИБКСЛ-01. МУК 4.2.1036-01. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001.

13. htth://medi/ru/doc/6190108/htm ~ Лившиц М.М., Леви М.И., Митюков А.П., Корнев И.И., Воронков В.А.. Савенко С.М., Бутаева Э.Б., Элиас Е.Е. Значение частоты биологического контроля для определения эффективности стерилизации // Дезинфекционное дело. – 1999. – № 1. / Дата обращения 20.11.2007.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ СТЕРИЛИЗУЮЩЕЙ ФИЛЬТРАЦИИ ХОЛЕРОГЕНА-АНАТОКСИНА

Васин Ю.Г., Еремин С.А., Перепелица А.И., Комиссаров А.В., Ульянов А.Ю., Никифоров А.К.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

rusrapi@microbe.ru

Основным средством специфической профилактики холеры на территории Российской Федерации является холерная бивалентная химическая вакцина, разработанная и выпускаемая в институте «Микроб». Данная вакцина, содержащая основные протективные антигены Vibrio cholerae O1 классического биовара: холероген-анатоксин, а также О1 антиген сероваров Инаба и Огава, сопоставима по эффективности с зарубежным холерными вакцинами

В настоящее время основным промышленным методом, используемым для стерилизации белковых компонентов медицинских иммунобиологических препаратов, к которым относится холероген-анатоксин, в силу их специфичности, является мембранный метод микрофильтрации.

Современная промышленность выпускает новые образцы микрофильтрационного оборудования (капсулы, кассеты и др.), использование которых возможно при стерилизации холерогена-анатоксина. Данные образцы, по мнению их разработчиков, позволяют повысить количество простерилизованного раствора в 2…3 раза в сравнении с дисковыми фильтрами. Преимущество достигается гофрированием мембранных фильтров и, следовательно, увеличением полезной площади стерилизации. Ряд образцов позиционируются для многоразового использования. Специальных исследований, направленных на многоразовое использование этих установок для стерилизации холерогена-анатоксина не проводилось.

Апробации новых микрофильтрационных устройств на стадии стери лизующей фильтрации холерогена-анатоксина были посвящены данные исследования. Наряду с этим представлял интерес и разработка способов реге-

нерации установок с целью их многократного использования и повышения экономичности процесса.

Нами была выбрана микрофильтрационная капсула «Sartobran P» (Sartorius, Германия) и представляющая собой комбинацию гофрированных фильтров с размерами пор 0,45 и 0,2 мкм, запаянных в оболочку из инертного материала.

Характеристики холерогена-анатоксина, применяемого в исследованиях были следующие: содержание белка 5,0%, концентрация водородных ионов 7,2 ед. pH. Количество профильтрованного раствора препарата составило 15 дм3.

Далее требовалось оценить возможность регенерации капсулы. В качестве раствора разрушающего белки, оставшиеся в порах фильтрующего элемента капсул использовали 1% водный раствор моющего средства «P-3 ultrasil 11», предназначенного для обработки мембранного оборудования. Разрушение белков осуществляли циркуляцией вышеназванного раствора через внутренний объем капсулы до восстановления паспортной производительности. Было выявлено, что проведение данного процесса в течение 120 мин приводит к очищению пор фильтрующего элемента. Отмывку стерилизующего устройства производили дистиллированной водой, до снижения уровня pH, равному 5,5 (значение показателя для дистиллированной воды). Было показано, что 25 дм3 воды достаточно для удаления моющего раствора. Капсулу после регенерации хранили в 20% растворе этилового спирта.

В последующем определялась пропускная способность капсул после 5 циклов стерилизации холерогена-анатоксина с дальнейшей регенерацией. Было выявлено, сохранение количественных значений данного показателя при обеспечении стерильности профильтрованного раствора. Следовательно, капсулу «Sartobran P» возможно использовать, как минимум, для 5 циклов стерилизации.

РИСК – МЕНЕДЖМЕНТ КАК ЭЛЕМЕНТ УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СРЕДСТВ ПРОФИЛАКТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Любая деятельность в современных условиях прямо или косвенно подвергается влиянию факторов риска. Риск является одной из составляющих в работе организаций, осуществляющих производственную, научно-исследовательскую, коммерческую, маркетинговую и другую деятельность. На предприятии различают риски производственные, связанные с технологическими процессами, а также коммерческие и финансовые, обусловленные возможным снижением предполагаемого объема производства, непредвиденным ростом затрат и т.д.

При производстве иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики особо опасных инфекций (ООИ) именно производственные риски являются определяющими. Коммерческие и финансовые риски имеют в данном случае второстепенное значение, т.к. вышеуказанные производства являются технически сложными, высоко затратными и малообъемными, а применение препаратов ограничено и обусловлено эпидпоказаниями. Производители таких иммунобиологических препаратов имеют государственную поддержку, которая определена Федеральным законом N 157-ФЗ «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» от 17 сентября 1998 г.: «государство гарантирует обеспечение современного уровня производства иммунобиологических лекарственных препаратов для иммунопрофилактики, а также государственную поддержку отечественных производителей … указанных препаратов» (2).

Высокотехнологическое производство, в частности биотехнологическое, связано с рядом дополнительных рисков, о которых следует знать и стремиться управлять ими. Эти риски снижаются с введением GMP на производстве.

В соответствии с ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств» с 1 января 2014 года все фармацевтическое производство Российской Федерации должно быть переведено на стандарты GMP (Good Manufacturing Products) (1). Предприятиям, не соответствующим данным стандартам, к которым относится большинство производителей иммунобиологических лекарственных средств, будет определен дополнительный переходный период.

Основой внедрения стандартов GMP при производстве лекарственных средств является построение системы обеспечения качества (3, 4, 6, 7), целью которой является предупреждение несоответствия продукции заданным требованиям. Анализ производственных рисков является одним из средств решения этой задачи.

Одним из основных источников производственных рисков является использование помещений, не соответствующих правилам GMP: несоблюдение поточности производства, классов чистоты для стерильных форм, конструктивных решений систем воздухо- и водоподготовки и др.

Любое предприятие, эксплуатирующее технологическое оборудование и контрольно-измерительные приборы, сталкивается с рисками, связанными с его выбором, монтажом, аттестацией (или метрологической поверкой), организацией эксплуатации и обслуживания. При производстве иммунобиологических лекарственных препаратов необходимо уделять этим вопросам большое внимание ввиду особенностей выпускаемого продукта, а также высокой степени ответственности за него перед потребителем.

Высокая вероятность возникновения рисков связана с человеческим фактором. Существенную роль имеет профессиональная подготовка персонала и адекватное распределение обязанностей.

Организация системы документации и четкое ведение производственных записей позволит избежать дополнительных рисков.

Возможность появления рисков не исключена на этапах контроля и хранения конечного продукта: нестандартность методов контроля полуфабриката

и готовой лекарственной формы, изменение условий хранения могут привести к тому, что препарат не будет соответствовать показателям фармакопейной статьи предприятия, не пройдет процедуру сертификации и, в конечном итоге, не будет реализован.

При производстве средств профилактики особо опасных инфекций помимо типичных производственных факторов, приводящих к возникновению рисков, следует учитывать риски, связанные с использованием возбудителей вышеназванных инфекций и продуктов их метаболизма. Для соблюдения мер биологической безопасности необходимо неукоснительное выполнение требований СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», касающихся помещений, оборудования и производственной санитарии (5). Масштабное аппаратное культивирование возбудителей ООИ требует введения дополнительных мер защиты персонала и окружающей среды.

Избежание проблем качества при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов представляет собой главную цель управления рисками качества. Эффективным методом решения этой задачи является анализ рисков, основанный на использовании системы HACCP (от англ. – Hazard Analysis and Critical Control Points) (6). С середины 90-х годов HACCP активно применяется для определения критических процессов в фармацевтических производствах и для выявления критических зон в чистых помещениях. Концепция определения критических этапов производственных процессов и связанного с этим ухудшения качества продукции, лежащая в основе системы HACCP, в целом, соответствует принципам GMP. Применение HACCP может использоваться при производстве иммунологических лекарственных препаратов параллельно с внедрением правил GMP.

Принципы применения системы HACCP заключаются: в проведении анализа опасностей, а именно, идентификации всех потенциально опасных факторов, способных оказать влияние на качество и безопасность продукта; определении Критических Контрольных Точек (ККТ). ККТ – это этап (место) в рамках процесса, на котором может быть проведен контроль, являющийся существенным для предотвращения, удаления опасного фактора или снижения его до приемлемого уровня.

Управляющее воздействие необходимо сконцентрировать в тех местах, где возникает опасность получения продукта, несоответствующего заданным требованиям. Особенность метода HACCP в том, что он дает действенный инструмент для четкого и безошибочного определения ККТ. Это, так называемое, «Дерево принятия решений» – диаграмма в виде логической цепочки простых вопросов, на которые даются ответы «да»-«нет», позволяющих определить – является ли данный этап/место/операция процесса ККТ или нет. Следующим этапом метода HACCP является определение критических пределов для каждой ККТ, приведение в соответствие которым уменьшит риск до приемлемого уровня или устранит действие опасного фактора. Установление системы мониторинга ККТ позволяет организовать контроль параметров в точках риска с определенной периодичностью. Необходимо

вовремя обнаружить несоответствие в ККТ, чтобы потенциально небезопасный продукт был изолирован до его использования. Разработанная система корректирующих мероприятий обеспечивает порядок действий на случай выхода параметров в критической точке за допустимые пределы. Для оценки эффективности принятых мер необходимо наличие системы проверки HACCP, которая предполагает оценку правильности всех действий, выполняющихся при практической реализации принципов HACCP. Выполнение всех вышеперечисленных действий и полученных результатов должно быть документально оформлено, что подтверждает внедрения системы HACCP на предприятии. Документирование всех процедур является воплощением принципа GMP «что не записано – то не сделано». Одним из ведущих принципов внедрения HACCP на предприятии является создание системы обучения персонала, обеспечивающего функционирование системы.

Для предприятий-производителей иммунобиологических лекарственных препаратов HACCP – наиболее рентабельная методика, которая позволяет сконцентрировать ресурсы и усилия предприятия в критических областях производства, и при этом, соответственно, резко снизить риск выпуска и продажи опасного продукта. HACCP на предприятии – это надежное свидетельство того, что изготовитель обеспечивает все условия, гарантирующие стабильный выпуск безопасной продукции.

Правила GMP ВОЗ рекомендуют применять систему анализа риска HACCP для определения критических процессов и зон, аргументируя это тем, что система HACCP является признанным во всем мире системным подходом, позволяющим с высокой степенью надежности выявить критические процессы и разработать эффективную систему управления ими для обеспечения гарантированного качества и безопасности лекарственных средств.

Производство и применение лекарственных препаратов всегда влечет за собой определенный риск. Важно понимать, что качество лекарственного средства должно сохраняться на протяжении всего срока его хранения, таким образом, чтобы все свойства препарата, важные для качества, соответствовали требованиям нормативной документации. Эффективное управление рисками может гарантировать высокое качество лекарственных препаратов для пациентов, а также помочь в принятии адекватных мер и объективных решений в случае возникновения проблем качества.

Литература:

1. ФЗ № 61 «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.10 г.

2. ФЗ № 157 «Об иммунопрофилактике инфекционных болезней» от 17.09.98 г.

3. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

4. ГОСТ Р 52537-2006. Производство лекарственных средств. Система обеспечения качества. Общие требования.

5. СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

6. МР «Руководство по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека», 2008 г. (Письмо Росздравнадзора от 15.07.09 N 01И-396/09).

7. Иванов А.И., Сударев И.В., Никифоров С.А., Гандель В.Г., Поспелов В.И., Бунятян Н.Д. «Разработка и внедрение системы менеджмента качества на фармацевтических предприятиях» / Москва, 2009.

РАЗДЕЛ 7.
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРОФИЛАКТИКИ, ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

ЭПИДЕМИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ПФО: ОСОБЕННОСТИ 2013 ГОДА

Зайцева Н.Н., Альтова Е.Е., Носов Н.Н.

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

prokaids@mail.ru

Кумулятивное количество выявленных ВИЧ-инфицированных в округе на 01.01.14 г. составило 183 252 человека. Показатели распространенности и пораженности ВИЧ-инфекцией – 615,5 и 476,8 на 100 000 населения соответственно.

В 2013 г. выявлено 16 732 новых случая ВИЧ-инфекции, в том числе 205 – у детей. Показатель заболеваемости (56,2 на 100 000 населения) превышает уровень 2012 г. (53,5) и среднероссийский (54,3). Среди ВИЧ-инфицированных 57,3% – мужчины; 73,8% – жители города.

На десяти территориях округа отмечался положительный темп прироста новых случаев инфицирования ВИЧ; отрицательные значения этого показателя были в Удмуртии, Пензенской, Ульяновской областях и Пермском крае. Значительные темпы прироста отмечены в Кировской, Оренбургской, Нижегородской областях, Республике Татарстан. В среднем по ПФО темп прироста составил +4,5% (Таблица).

Таблица

Количество выявленных ВИЧ-инфицированных в Приволжском федеральном округе в 2011–2013 гг.

Территория	Выявлено в 2011 году	Выявлено в 2012 году	Выявлено в 2013 году
Башкортостан	1916	2425	2475
Марий-Эл	73	105	126
Мордовия	91	85	95
Татарстан	1140	1191	1400

Удмуртия	513	530	518
Чувашия	128	138	149
Кировская	85	96	178
Нижегородская	1334	1710	1926
Оренбургская	1216	1459	1703
Пензенская	197	281	244
Пермский край	2321	2484	2318
Самарская	3790	3482	3573
Саратовская	864	1042	1138
Ульяновская	897	978	889
ИТОГО по ПФО	**14565**	**16006**	**16732**

Шесть территорий округа в 2013 г. имеют инцидентность, превышающую среднеокружной уровень (56,2 на 100 000 населения): Самарская (111,2); Оренбургская (84,5); Ульяновская (69,8), Нижегородская (58,5) области; Пермский край (88,0); Республика Башкортостан (60,9).

На протяжении всех лет существования эпидемии ВИЧ-инфекции в ПФО наблюдается преобладание того или иного пути передачи ВИЧ.

Так, в 2007, 2010, 2012, 2013 гг. преимущество имел половой путь передачи инфекции, реализуемый при гетеросексуальных контактах. В 2008, 2009, 2011 гг. большая часть ВИЧ-инфицированных лиц в ПФО заразилась при употреблении ПАВ парентерально.

В 2013 г. доминирование полового пути передачи ВИЧ отмечено во всех территориях ПФО, кроме Нижегородской области, где ведущим продолжает оставаться парентеральный путь передачи (54,5%).

Наряду с гетеросексуальной передачей вируса продолжает существовать и, в последние годы имеет тенденцию к увеличению, инфицирование при половых контактах в группе МСМ. Так, в 2010-2012гг. доля лиц, зараженных ВИЧ, среди представителей этой категории населения составляла 0,4%-0,6% от общего числа инфицированных, в 2013 г. на их долю приходится 0,8%. ВИЧ-позитивные МСМ регистрировались на всех территориях округа, кроме Республики Мордовия и Оренбургской области. Всего в 2013 г. выявлен 101 ВИЧ-инфицированный МСМ, из них почти треть (29 человек) – в Нижегородской области.

Среди всех ВИЧ-позитивных лиц с установленными факторами риска заражения в округе, процент инфицированных при употреблении инъекционных ПАВ составил 38,2%. Выше среднеокружного показатели в Нижегородской, Самарской областях, в Пермском крае и республиках Башкортостан и Татарстан (54,5%, 41,1%, 46,4% и 42,6%, 39,0% соответственно). Самые низкие значения этого показателя отмечены в Чувашии и Мордовии (15,0% и 15,1% соответственно).

Зарегистрирован один случай инфицирования ребенка при грудном вскармливании (Ульяновская область) и два случая инфицирования при гемоконтактах в быту (Саратовская область).

Необходимо отметить, что более 20% выявленных ВИЧ-позитивных лиц в округе остаются недоступными для проведения эпидрасследования.

В 2013 г. от ВИЧ-позитивных матерей рождено 3 642 ребенка с перинатальным контактом по ВИЧ. Всего на начало 2014 г. число таких детей в округе 27 191, из них 5 992 ребенка имеют неокончательный лабораторный диагноз. Общее число ВИЧ-позитивных детей, инфицированных при перинатальном контакте с ВИЧ, – 1 471 человек. Основное количество таких детей приходится на Самарскую (441); Оренбургскую (257), Ульяновскую (126); Нижегородскую (125) и Саратовскую (124) области; Республику Башкортостан (147). Доля детей, инфицированных ВИЧ перинатально, в общей структуре путей передачи в 2013 г. составила 1,4%, что превышает показатель 2012 г. (1,0%).

Частота перинатальной передачи ВИЧ от матери к ребенку в ПФО на 01.01.14 г. составила, в среднем, 6,9%. Превышение среднеокружного показателя зарегистрировано в Саратовской (8,5%); Нижегородской (8,4%); Кировской (8,2%); Оренбургской (8,1%); Ульяновской (7,2%); Пензенской (7,1%) областях; в республиках Башкортостан (8,8%) и Мордовия (8,5%). Значения данного показателя в пределах от 6,0% до 7,0% регистрировались в Самарской области и Чувашии; ниже 6,0% – в республиках Удмуртия, Марий Эл и Татарстан, а так же в Пермском крае.

Работа по профилактике перинатальной передачи ВИЧ является одной из первоочередных задач центров по профилактике и борьбе со СПИД. Доля ВИЧ-инфицированных женщин, закончивших беременность родами, которым проводилась химиопрофилактика передачи ВИЧ от матери ребенку или антиретровирусная терапия в 2013 г. составила в среднем по округу 96%, что на уровне прошлых лет. Показатели охвата химиопрофилактикой ниже среднеокружного значения зарегистрированы в Самарской (91,9%), Саратовской (93,0%), Ульяновской (94,8%) и Оренбургской (95,2%) областях.

В 2013 г. трехэтапной химиопрофилактикой передачи ВИЧ от матери ребенку в ПФО было охвачено 89,8% пар «мать-ребенок», в 2012–2011 гг. данный показатель составил 91,5% и 88,9% соответственно.

На 01.01.2014 г. в округе АРВ-терапию получают 55 349 человек. При этом, необходимо отметить, что 35,6% ЛЖВ, получающих терапию, прерывали ее по разным причинам. Доля пациентов, прервавших лечение по причине смерти, составила 39,3%. Остальная, значительная масса прервавших терапию, несомненно, будет являться группой риска по развитию резистентности вируса к антиретровирусным препаратам.

В возрастной структуре инфицированных в 2013 г. основная доля (41,7%) приходится на возраст 31–40 лет; 36,9% – на возраст 21–30 лет; дети до 14 лет составили 1,3%; 13,7% выявлены в возрасте 41–50 лет и 3,8% – старше 50 лет. В 2013 г. выявлено 205 детей до 14 лет, общее количество ВИЧ-инфицированных детей на начало 2014 года – 1 854 человек. В 94,1% случаев причиной заражения детей явилась перинатальная трансмиссия ВИЧ.

На протяжении последних лет в ПФО отмечается устойчивая тенденция уменьшения доли лиц в возрасте 21–30 лет и увеличение числа новых случаев в возрасте старше 31 года.

По-прежнему, лидирующая роль в эпидпроцессе сохраняется за неработающими людьми, в 2013 г. их доля составила 51%. Однако, в последние годы, среди инфицированных возрастает доля социально-адаптированных лиц.

Одним из объективных показателей интенсивности эпидемического процесса ВИЧ-инфекции является смертность. В 2013г. от всех причин умерло 6 398 ВИЧ-инфицированных, из них по причине ВИЧ-инфекции – 1 299. Показатель смертности составил 21,5 на 100 000 населения, что превышает уровень 2011–2012 гг. (16,9 и 19,8 соответственно). В целом, в ПФО кумулятивное число смертей среди ВИЧ-позитивных на 01.01.14 г. составило 41 300 человек, в том числе, вследствие ВИЧ-инфекции – 7 618.

В целом, эпидемический процесс ВИЧ-инфекции в Приволжском федеральном округе в 2013 году характеризовался:

- Положительным темпом прироста числа новых случаев заражения ВИЧ и, соответственно, увеличением показателя заболеваемости.
- Увеличением числа регионов округа с инцидентностью, превышающей среднеокружные значения.
- Значительным числом территорий с очень высоким и высоким уровнем пораженности населения ВИЧ-инфекцией.
- Преобладанием полового пути передачи ВИЧ, реализуемого при гетеросексуальных контактах, на 13 административных территориях ПФО и в среднем по округу.
- Продолжающимся ростом доли инфицированных МСМ в общей структуре путей передачи ВИЧ в ПФО.
- Увеличением числа детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей, а так же значительными показателями частоты перинатальной передачи ВИЧ в некоторых регионах ПФО.
- Ростом смертей всего и, в том числе, вследствие ВИЧ-инфекции.
- Значительными темпами прироста выявленных инфицированных в возрастной категории старше 30 лет.
- Увеличением числа детей, инфицированных ВИЧ.

ИНТЕГРАЦИЯ ДЕТЕЙ, ЗАТРОНУТЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, В ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ ПРОСТРАНСТВО МАССОВОЙ ШКОЛЫ – АКУАЛЬНОЕ НАПРАВЛЕНИЕ МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Кузоватова Е.Е. [1, 2], Носов Н.Н. [1], Гладышева О.С. [2]

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

[2] Нижегородский институт развития образования

prokaids@mail.ru, labzd@yandex.ru

Эпидемия ВИЧ-инфекции в России в целом и в ПФО продолжает распространяться, в нее вовлечено большое число молодых людей, включая детей и подростков. По состоянию на 31.12.2013 г. по данным формы «Сведения о мероприятиях по профилактике ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, выявлению и лечению больных ВИЧ» в ПФО состояло на диспансерном наблюдении 126 512 ВИЧ-инфицированных. Анализ форм статистического наблюдения показал, что доля детей и подростков в возрастной структуре ВИЧ-инфицированных в округе во все годы наблюдения была, возможно, не столь велика (в 2013 г. – 0,9%, в 2012 г. – 1,4%), существенно уступая иным возрастным категориям (в первую очередь, 21–30 и 31–40 лет), однако в абсолютных цифрах число таких детей и подростков довольно велико.

ВИЧ/СПИД представляет собой очень многогранную проблему. ВИЧ-инфицированные дети и подростки должны получать медицинскую помощь, но нельзя забывать и о влиянии этого заболевания на психо-социальное развитие ребенка. Таким образом, совершенно необходимо предоставить детям и подросткам психологическую и социальную поддержку в дополнение к медикаментозному лечению.

Проблема интеграции ВИЧ-позитивных детей в образовательную среду приобретает для ПФО все большую актуальность. На 31.12.2013 г. в округе проживало 1 679 ВИЧ-инфицированных детей и подростков в возрасте до 18 лет, большинство из них (90,7%) имеют перинатальный путь заражения, 2,6% заразились при употреблении наркотиков, у 4,3% заражение произошло половым путем. У 17 детей (1%) в качестве пути инфицирования отмечено грудное вскармливание. Большинство детей проживало в семьях с биологическими родителями, опекунами или в приемной семье. Дошкольники составляли 51,3%, из них 40% детей посещают детское дошкольное учреждение. Школьники в социальной структуре ВИЧ-инфицированных детей составили 43,7%. Доля детей школьного возраста среди ВИЧ-позитивных детей и подростков увеличивается из года в год во всех субъектах ПФО и в округе в целом (рис.1).

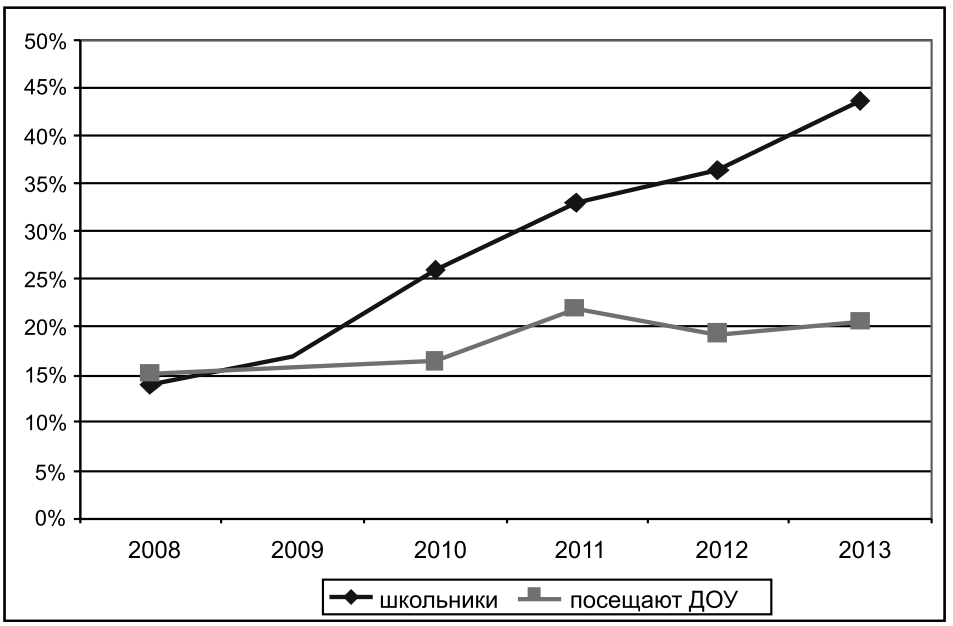


Рис. 1. Доля детей, посещающих дошкольные образовательные учреждения и школы, в общей структуре ВИЧ-положительных детей и подростков в ПФО в 2008–2013 гг.

Таким образом, в ПФО 64,2% детей с ВИЧ-инфекцией в 2013 г. посещали дошкольные образовательные учреждения и школы (в 2012 г. – 55%). Еще 1,5% (в 2012 г. - 1%) составляли учащиеся колледжей и студенты техникумов и вузов.

Изменился и расширился спектр основных задач оказания помощи этим детям. Если ранее основной задачей в медицинском плане являлось обеспечение выживания, то теперь это борьба с побочными эффектами антиретровирусной терапии и резистентностью вируса. Появились и новые проблемы – раскрытие статуса, половое воспитание, планирование семьи, будущая профессия. Особую актуальность приобретает вопрос формирования толерантной среды в общеобразовательных учреждениях в отношении ВИЧ-инфицированных.

Дети и подростки, столкнувшиеся с ВИЧ-инфекцией, попадают в травматическую ситуацию как в связи с заболеванием, так и в связи с болезнью и потерей близких, поэтому удовлетворение их основных потребностей ставится под угрозу. Более того, они могут столкнуться со стигматизацией и отчуждением в обществе, что приводит к снижению самооценки, неспособности справляться с трудностями, и ведет в конечном итоге к проблемам интеграции в общество. Предвзятое отношение и проявление дискриминации нередко препятствуют детям и подросткам, затронутым ВИЧ или живущим с ВИЧ, получать дошкольное воспитание и посещать школу.

Согласно российским и международным документам, положение об обучении ВИЧ-инфицированных детей основывается на:

– праве родителей не разглашать свой диагноз и диагноз ребенка при зачислении его в образовательное учреждение;

– правиле соблюдения персоналом учебного заведения конфиденциальности, то есть неразглашения сведений о состоянии здоровья ребенка, полученных от родителей или ставших известными другим путем;

– требовании соблюдать основные гигиенические правила и универсальные меры профилактики [1].

ВИЧ-инфекция рассматривается с современных позиций как хроническое заболевание с контролируемым течением, и состояние здоровья ребенка – это единственный критерий, который должен лежать в основе выбора формы и места обучения для ребенка, живущего с ВИЧ. В связи с этим перед работниками образования возникает задача обеспечения равного доступа к образованию для учащихся, живущих с ВИЧ, и защиты их от дискриминации.

Содействие интеграции ВИЧ-позитивных детей в образовательное пространство массовой школы является актуальной проблемой, решение которой требует объединения усилий службы по профилактике ВИЧ/СПИД и системы образования. Сегодня медицина обладает достаточными возможностями, чтобы обеспечить полноценную жизнь человеку с диагнозом ВИЧ. ВИЧ-инфекция не передается бытовым путем. Тем не менее, проведенные опросы в среде педагогов показывают, что не все из них готовы к тому, что в классе может оказаться ВИЧ-инфицированный ученик.

Ранее проведенные исследования показали, что основным препятствием к этому является не столько недостаток знаний, сколько отсутствие психологической готовности и мотивации педагогов [2]. Специалистами Приволжского окружного центра СПИД (далее Центр) совместно с кафедрой здоровьесбережения в образовании ГБОУ ДПО НИРО в 2011–2013 гг. было проведено анкетирование 68 педагогов Нижегородской области с целью выявить их отношение к профилактической деятельности, готовность к ее организации и проведению, а также базовый уровень знаний по проблеме профилактики ВИЧ-инфекции и зависимостей. Педагогам был задан в числе прочих вопрос: «Как бы Вы поступили, если бы в Вашем классе был ВИЧ-инфицированный ученик?» Из числа опрошенных 36,8% не выделяли бы этого ученика среди других и относились к нему, как и к другим детям; 8,8% уделяли бы ему больше внимания, чем остальным; 2,9% участников опроса уделили бы особое внимание вопросам конфиденциальности; 26,5% стали бы глубже изучать проблему, постоянно общаться с родителями ребенка, обратились за консультацией к специалисту, стали бы проводить больше профилактических бесед в классе. При этом 17,6% опрошенных педагогов не знают, как бы они поступили в данной ситуации, 13,2% оставили вопрос без ответа, а 1 человек оказался вообще не готов к принятию подобных детей, считая, что ребенок стал бы изгоем. Таким образом, результаты анкетирования показали, что 32,4% педагогов школ, принявших участие в опросе, не готовы к работе с ВИЧ-позитивными детьми в условиях образовательного учреждения.

Проведенный опрос также выявил и недостаточную информированность педагогов об основных свойствах и путях передачи вируса. Несмотря на то, что

из 38 участников, ответивших на данный раздел анкеты, большинство (85%) правильно ответило на вопрос о невозможности передачи ВИЧ при обычных бытовых контактах, можно было убедиться, что декларируемые знания мало влияют на установки и регуляцию поведения. При углубленном анкетировании 14 педагогов затруднялись с ответом на вопрос, можно ли заразиться ВИЧ при пользовании общим санузлом, а один респондент положительно ответил на этот вопрос. У 11 человек вызвал затруднение вопрос, можно ли заразиться при прикосновении к инфицированному ВИЧ человеку; семь человек сомневались, не находится ли ВИЧ в воздухе, а один участник был в этом уверен. Таким образом, можно было придти к выводу, что педагоги нуждаются также и в повышении уровня знаний по проблеме ВИЧ-инфекции.

Для успешного решения проблемы интеграции детей, живущих с ВИЧ, в образовательное пространство массовой школы, необходима дополнительная подготовка педагогов по различным аспектам проблемы ВИЧ-инфекции. Ключевыми фигурами в решении данной проблемы выступают Министерство образования административной территории в лице институтов повышения квалификации работников образования, образовательных организаций, детских домов и Министерство здравоохранения в лице службы по профилактике ВИЧ/СПИД и педиатрической службы.

В связи с этим представляется важной дальнейшая разработка данного направления взаимодействия и широкое внедрение в субъектах округа начатой в 2007 г. в РФ комплексной программы подготовки работников образования по вопросам, связанным с обучением и воспитанием детей, затронутых эпидемией ВИЧ. Успешные примеры реализации таких программ можно видеть в ряде областей России, в том числе и в ПФО (Самарская, Оренбургская области), однако они были предназначены в первую очередь для педагогических работников интернатных учреждений. В сложившейся ситуации по ВИЧ-инфекции считаем необходимым реализацию подобных программ и для работников массовой школы [3].

На кафедре здоровьесбережения в образовании НИРО в рамках реализации данной программы совместно с Центром завершается разработка обучающего курса для педагогов области. При разработке курса авторы опирались на международные и российские рекомендации, в т.ч. опыт работы международного проекта ЮНИСЕФ «Интеграция детей, затронутых эпидемией ВИЧ-инфекции, в образовательную среду и предоставление им возможностей для развития в раннем возрасте», который осуществлялся в Челябинской, Оренбургской, Иркутской областях и Алтайском крае в 2007–2009 гг. Также были использованы знания и навыки, полученные на международном обучающем семинаре «Психологическая помощь, поддержка, образование и социальная защита ВИЧ-инфицированных и столкнувшихся с болезнью детей и подростков» (Израиль, 2012 г.). Программа курса включает следующие разделы:

1. ВИЧ-инфекция и дети (особенности эпидемии, пути передачи вируса, особенности течения заболевания, диагностика и лечение, универсальные меры профилактики).

2. Этические аспекты ВИЧ-инфекции (включая социально-правовые аспекты и стратегии борьбы со стигмой и дискриминацией).

3. Развитие коммуникативных навыков педагогов. Эффективные способы коммуникации с подростками.

Для работников системы образования на телекоммуникационной площадке Института развития образования был дважды проведен вебинар по проблеме интеграции детей, затронутых ВИЧ-инфекцией, в образовательную среду.

Очевидно, что просветительская работа будет иметь эффект только в том случае, если она является адресной и системной, позволяющей специалистам понять, каким образом полученная информация может быть применима и использована в практической деятельности. Совместные усилия по разработке и внедрению программы подготовки педагогов в рамках межведомственного взаимодействия службы по профилактике и борьбе со СПИД и системы образования позволят повысить профессиональную компетентность деятельности педагогов, работающих в школьном коллективе, где есть дети, затронутые ВИЧ-инфекцией.

Литература:

1. «Дети со знаком плюс»: Информационное пособие для сотрудников дошкольных и образовательных учреждений, под ред. А.И.Загайновой. – М. – 2008.

2. Солнцева Н.Е. Психологическая готовность педагога к взаимодействию с детьми, затронутыми ВИЧ-инфекцией //Профилактика ВИЧ-инфекции и других социально значимых заболеваний в системе образования. - Материалы международной конференции. – Алматы. – 2011. – с. 110–111.

3. Кузоватова Е.Е. Интеграция ВИЧ-позитивных детей в образовательное пространство: проблемы подготовки педагогов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. Труды 7-й Всероссийской научно-практ. конф. с межд. участием. – 2012. – № 7, в 2-х частях. СПб. – с. 780–784.

ЖЕНЩИНЫ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ. КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОК, ВЫЯВЛЕННЫХ ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Вехова Е.В., Спирин А.В., Агафонова О.В.,
Садыкова Г.Б., Широбокова О.И., Мальшина И.В.

ГБУЗ «Самарский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом», Самара

aids@samaramail.ru

Эпидемия ВИЧ-инфекции в России характеризуется увеличением числа женщин в структуре людей, живущих с ВИЧ [1]. Наблюдается феминизация эпидемии, что обусловлено гетеросексуальной передачей ВИЧ-инфекции женщинам половыми партнерами, употребляющими наркотики. [2].

Активное вовлечение в эпидемию женщин преимущественно репродуктивного возраста приводит к росту числа беременностей, родов и детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями [1].

Проблема ВИЧ-инфекции в Самарской области имеет большое социальное значение, что связано с широким распространением заболевания на территории региона. На 31.12.2013 года кумулятивное число ВИЧ-инфицированных на территории области достигло 53 465 человек, пораженность ВИЧ населения составила 1 225,4 на 100 тыс., заболеваемость в 2013 году – 111,2 на 100 тыс. населения [3]. Среди пациентов, впервые выявленных и вставших на диспансерный учет в 2013 году, доля лиц, заразившихся половым путем, составила 57,3%. По итогам всех лет наблюдения на женщин приходится 76,5% всех случаев заражения ВИЧ половым путем.

Цель исследования: изучить клинико-эпидемиологическую характеристику ВИЧ-позитивных женщин с акцентом на пациенток, выявленных во время беременности.

Материалы и методы

Используя карты эпидемиологического расследования случаев ВИЧ-инфекции и индивидуальные карты амбулаторного больного, проведен сравнительный анализ эпидемиологических данных ВИЧ-инфицированных пациенток, выявленных в 2001 г. и 2013 г., и анализ клинико-эпидемиологический данных 111 пациенток, выявленных во время беременности в период с 2007 по 2011 год. В работе использованы методы описательной статистики: расчет среднего и среднеквадратического отклонения; расчет долей; расчет доверительных интервалов по методу Клоппера-Пирсона.

Результаты и их обсуждение

По состоянию на 31.12.2013 года кумулятивное число женщин с положительным результатом иммунного блота в г.о. Самара – 6 662. В период с 2001 по 2013 год число ВИЧ-позитивных женщин в Самарской области выросло в 6,6 раз, кумулятивное число ВИЧ-инфицированных – в 3,7 раз. За весь период наблюдения половым путем инфицировались 63,2% пациенток, вставших на диспансерный учет в СПИД-центр, при употреблении внутривенных наркотиков заразились 36,8%.

В 2001 году в Самарской области было зарегистрировано наибольшее число лиц, имеющих положительный результат иммунного блота. В том числе в г.о. Самара выявлено 3 529 ВИЧ – позитивных лиц, из них 758 (21,5%; 95% ДИ: 20,1–22,9%) женщин. На диспансерный учет встали 736 (97,1%; 95% ДИ: 95,6–98,2%) пациенток, что свидетельствует о мотивации данной категории больных в уточнении диагноза. При эпидемиологическом расследовании уста-новлено, что инфицировались половым путем 93 (12,3%; 95% ДИ: 10,3–15,5%) женщины; парентеральным при употреблении внутривенных наркотиков 643 (87,4%; 95% ДИ: 84,8–89,7%). В том числе 74 женщины (9,8%; 95% ДИ: 7,7–12,1%) были выявлены при обследовании по причине беременности. Из них инфицировались половым путем 42,2% (95% ДИ: 30,6–54,6%); парентеральным при употреблении внутривенных наркотиков 57,8% (95% ДИ: 45,4–69,4%).

Таким образом, основным путем инфицирования женщин в 2001 году явилось парентеральное введение наркотических препаратов. Клиники прогрессирования заболевания при установлении диагноза ВИЧ-инфекции в 2001 году не было.

В 2013 году в г.о. Самара выявлено 1458 лиц, имеющих положительную реакцию иммунного блота, из них 591 (40,5%; 95% ДИ: 38–43,1%) женщина. На диспансерный учет встали 61,3% пациенток (367 чел.). Из них заразились половым путем 343 (93,5%; 95% ДИ: 90,4–95,8%); парентеральным при употреблении внутривенных наркотиков 24 (6,5%; 95% ДИ: 4,2–9,6%).

На момент установления диагноза пациентки имели следующие стадии ВИЧ-инфекции: 2А – 4 (1,1%; 95% ДИ: 0,3–1,8%); 2Б – 3 (0,8%; 95% ДИ: 0,2–2,4%);); 2 В – 1 (0,3; 95% ДИ: 0,01–1,5%); 3 – 279 (76%; 95% ДИ: 71,3–80,3%);); 4А – 70 (19,1%; 95% ДИ: 15.2–23,5) 4Б – 8 (2,2%; 95% ДИ: 95–4,3%);); 4В – 2 (0,5%; 95% ДИ: 0,1–1,95 %).

При обследовании по причине беременности выявлены 132 (22,4%; 95% ДИ: 19,04-25,9%) пациентки. На диспансерный учет встали 75% беременных (99 чел.), из которых половым путем были инфицированы 95,96% (95% ДИ: 89,98–98,9%).

В сравнении с 2001 годом число женщин, выявленных во время беременности, выросло в 1,8 раза, удельный вес беременных среди ВИЧ-инфицированных женщин вырос с 9,8% до 22,4%.

Для женщин, вставших на диспансерный учет, ведущим путем инфицирования были половые контакты. В тоже время не встала на диспансерный учет – 231 (39,1%; 95% ДИ 35,1–43,2%) женщина из выявленных в 2013 году. Вероятно, что среди женщин, не мотивированных на диспансерное наблюдение, число лиц, инфицированных при употреблении внутривенных наркотиков, возрастет.

Второй группой наблюдения были 111 женщин, у которых ВИЧ - инфекция была выявлена во время беременности: диагноз ВИЧ-инфекции установлен в 2007 –31, в 2010 – 52; в 2011 – 28 пациенткам. Возраст женщин от 17 до 42 лет, средний возраст 26,97±5,1 лет. Половой путь передачи инфекции установлен у 99 (89,2%) женщин, средний возраст 26,8±5,3 лет; парентеральный при употреблении внутривенных наркотиков – у 12 (10,8%), средний возраст 28,2±3,01 лет.

Семейный статус пациенток на момент установления диагноза ВИЧ-инфекции: не замужем – 48 (43,2%; 95% ДИ: 33,9–52,98%); гражданский брак – 31 (27,9%; 95% ДИ: 19,8–37,2%); замужем – 25 (22,5%; 95% ДИ: 15,14–31,4%); в разводе – 5 (4,5%; 95% ДИ: 1,5–10,2%); вдова – 1 (0,9%; 95% ДИ: 0.02–4,9%), замужем, но с мужем не проживает – 1 (0,9%; 95% ДИ: 0.02–4,9%).

Беременность, во время которой установлен диагноз ВИЧ-инфекции, завершилась родами у 85 женщин; абортом у 23 пациенток; по одному случаю выкидыша, внематочной беременности и искусственных родов.

В течение последующих лет еще беременность и роды были у 6 женщин.

Среди беременных, инфицированных половым путем, у 47 пациенток партнеры зарегистрированы в базе ВИЧ-позитивных лиц: 31 были выявлены

ранее, 16 – при обследовании по контакту. Отказались назвать половых партнеров 8 женщин. Обследовались анонимно с положительным результатом – 2, с отрицательным результатом – 1 половой партнер. Нет сведений о результатах обследования у 41 полового партнера, но в базе ВИЧ-позитивных лиц их на 01.03.2014 нет.

Только пять женщин знали, что половой партнер инфицирован, 25 беременных о ВИЧ-инфекции у настоящего полового партнера не были информированы. У одной пациентки, используя базу данных, было установлено, что инфицирован бывший половой партнер.

При проведении эпидемиологического расследования было установлено, что 36 половых партнеров являлись потребителями инъекционных наркотиков (31 – по результатам эпидемиологического расследования, 5 – со слов беременной). Высока вероятность употребления внутривенных наркотиков еще у 4 половых партнеров, у которых ВИЧ-инфекция была выявлена при обследовании в местах лишения свободы. Были инфицированы половым путем (от других партнеров) 3 половых партнера беременных женщин. Не обращались для обследования 9 половых партнеров, зарегистрированных как ВИЧ-позитивные, путь их инфицирования не установлен (коды причин обследования 113, 118, 108).

Три половых партнера беременных, имеющих в анамнезе употребление внутривенных наркотиков, были выявлены раньше них; два были выявлены при обследовании по контакту, семь пациенток не назвали половых партнеров.

На момент установления диагноза пациентки имели следующие стадии ВИЧ-инфекции: 2А – 2 (1,8%; 95% ДИ: 0,2–6,4%); 2Б – 6 (5,4%; 95% ДИ: 2–11,4%); 3 – 87 (78,4%; 95% ДИ: 69,7–85,6%); 4А – 13 (11,7%; 95% ДИ: 6,4–19,2%); 4Б – 3 (2,7%; 0,6–7,7%). У 16 пациенток диагноз ВИЧ-инфекции установлении при прогрессировании заболевания. Диагноз острой ВИЧ-инфекции установлен у 8 пациенток.

Заключение

В период с 2001 по 2013 год число ВИЧ-позитивных женщин в Самарской области выросло в 6,6 раз, кумулятивное число ВИЧ-инфицированных – в 3,7 раз. Опережающие темпы роста числа ВИЧ-инфицированных женщин связаны с активной передачей ВИЧ при половых контактах с мужчинами, и в первую с мужчинами, употреблявшими внутривенные наркотики (31 из 47 мужчин с ВИЧ-положительным статусом).

В 2013 году у 80 (21,8%; 95% ДИ: 17,7–26,4%) пациенток (выявленных в том же 2013 г.) на момент установления диагноза имели клинику прогрессирования ВИЧ-инфекции (стадии 4А, 4Б, 4В).

ВИЧ-инфицированные мужчины в значительном числе случаев не сообщают половым партнерам о наличии инфекции, поэтому проблема ВИЧ-дискордантных пар приобретает все большее значение как для популяции в целом, так и особенно при наличии беременности.

В связи с этим даже в случае отрицательного результата обследования на ВИЧ-инфекцию актуально предлагать беременным обследовать их половых партнеров при соблюдении конфиденциальности и добровольности обследования. Такой подход к профилактике распространения ВИЧ-инфекции

определяется особой социальной значимостью и будет способствовать обеспечению контроля над эпидемией.

Литература:

1. Оказание помощи женщинам и детям с ВИЧ-инфекцией. Под ред. Н.А. Белякова и А.В. Самариной. Медицинский тематический архив. СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2013. – 166 с.

2. Сайт ГБУЗ «Самарский областной центр по профилактике и борьбе со СПИДом» // http: www.samaraspidcenter.ru (дата обращения: 27.02.2014).

3. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации: проблемы, задачи, перспективы (По материалам сайта Федеральной службы по надзору ив сфере защиты прав потребителей и благополучия человека) // ВИЧ-инфекция у женщин и детей. Актуальные вопросы совершенствования профилактики, диагностики и лечения. Сборник статей и тезисов. – СПб.: «Человек и его здоровье», 2013. – 138 с.

4. Женщина, ребенок и ВИЧ. Под редакцией Н.А. Белякова, Н.Ю. Рахманиной и А.Г. Рахмановой. – СПб.: Балтийский медицинский образовательный центр, 2012. – 600 с.

ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ЧУВАШСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Щербаков А.А., Семенов О.П., Кочерова И.В.

БУ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Минздрава Чувашии

ipspid@medinform.su

По показателям заболеваемости на 100 тыс. населения Чувашская Республика (ЧР) относится к регионам с низким уровнем инфицирования ВИЧ (2009 г. – 9,8, 2010 г. – 10,0, 2011 г. – 10,2, 2012 г. – 11,1, 2013 г. – 12,0) и занимает 12-е ранговое место в Приволжском федеральном округе (ПФО). За 2013 г. в республике выявлено 149 новых случаев ВИЧ-инфекции, что на 8,0% больше чем за 2012 год (138 новых случаев). Вместе с тем, заболеваемость по Чувашской Республике гораздо ниже, чем по Российской Федерации (РФ) и ПФО (показатели заболеваемости на 01.01.2014 г. – 54,3 и 54,0 соответственно). С начала регистрации на 31.12.2013 г. в республике выявлен 1 621 ВИЧ-инфицированный. Умерли от разных причин всего 346 ВИЧ-позитивных, в т.ч. от СПИД – 92, туберкулеза – 34, в 2013 г. соответственно 45; 15 и 4. Число лиц, зарегистрированных с ВИЧ/СПИД и живущих в республике, составило 1275 человек (пораженность ЧР – 102,5 на 100 тысяч населения, РФ – 479,0, ПФО 476,3). На диспансерном наблюдении состоят 1 203 человек, в т.ч. 18 детей, что составляет 94,6% подлежащих, детей – 100,0%. В соответствии с государственной программой Российской Федерации «Развитие здравоохранения», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 24.12.2012 № 2511, и государственной программой Чувашской Республики, утвержденной постановлением Кабинета Министров Чувашской

Республики от 16.05.2013 № 185, доля ВИЧ-инфицированных лиц, состоящих на диспансерном учёте, от числа выявленных, в 2013 г. должна быть не менее соответственно 75% и 93,2%.

Случаи ВИЧ-инфекции зарегистрированы во всех муниципальных образованиях Чувашии. Необходимо отметить, что самая высокая пораженность, отмечается в г. Канаш, который является узловой железно-дорожной станцией, где проходил основной транзитный путь наркотических средств. Вспышка заболеваемости произошла там в 2002 г. в среде потребителей инъекционных наркотиков., но благодаря хорошо налаженной работе Федеральной службы Российской Федерации по контролю за оборотом наркотиков по Чувашской Республике – Чувашии и врачей-специалистов Центра СПИД в настоящее время заболеваемость в городе незначительно превышает среднереспубликанские показатели.

За годы регистрации ВИЧ-позитивных по месту возможного заражения распределяются следующим образом: ЧР – 65,3%, другие субъекты РФ – 29,1, иностранные государства – 1,4%. Из 149 выявленных и зарегистрированных случаев ВИЧ-инфекции в 2013 г. в 68,4% заражение произошло в Чувашии, 30,3% – вне территории республики, среди которых 25% приходится на г. Москва и Московскую область.

В структуре ВИЧ-позитивных по месту проживания удельный вес сельского населения возрос с 3,8% в 2000 г. до 51,7% в 2013 г.

Среди всех зарегистрированных ВИЧ-инфицированных по прежнему преобладают мужчины – 922 человека, что составляет 56,9%. Необходимо отметить, что в последние годы отмечается увеличение доли женщин. На начало 2014 года зарегистрировано 699 женщин, т.е. произошло увеличение данного показателя с 19,2% в 2000 г. до 43,1% в 2013 г.

С 2000 г. в республике родилось 230 детей от ВИЧ-позитивных матерей (32,9% от всех зарегистрированных ВИЧ-инфицированных женщин), из них у 13 (5,6%) установлен диагноз ВИЧ-инфекция. На конец 2013 года находятся под наблюдением 34 ребенка, имеющие неокончательный лабораторный результат. В 2013 г. ВИЧ-инфекция у новорожденных не выявлена.

В возрастной структуре инфицированных по кумулятивному показателю преобладает доля лиц в возрасте 20–29 лет – 51,9%, но среди вновь выявленных данный показатель снижается и в 2013 г. составил 36,9%. Произошел сдвиг эпидемии в наиболее старшие возрастные группы. Увеличение доли новых выявленных случаев в возрасте 30–39 лет (с 3,8% в 2000г. до 33,6% в 2013 г.) и 40–45 лет (с 7,7% в 2000 г. до 17,4% в 2013 г.) свидетельствует об активном вовлечении их в модели рискованного поведения.

Наиболее высокий удельный вес среди ВИЧ-позитивных с начала регистрации данной инфекции отмечается среди неработающих (49,8%), но в 2013 г. более 55% зарегистрировано среди работающего населения.

В целом по республике имеет место перераспределение ВИЧ-инфицированных по факторам риска заражения в сторону увеличения удельного веса заразившихся половым путем (диаграмма 1).

Доля лиц, заразившихся ВИЧ при гетеросексуальном контакте, возросла с 7,7% в 2000 г. до 79,9% в 2013 г. В то же время снижается доля лиц заразившихся при внутривенном введении наркотиков (с 92,3% в 2000 г. до 14,8%

в 2013 г.). Использование психоактивных веществ для внутривенного использования до сих пор остается актуальным фактором распространения инфекции, так как половым путем преимущественно заражаются женщины (60,2% от всех заразившихся гетеросексуальным путем), в том числе от своих ВИЧ-инфицированных партнеров мужчин, употребляющих или употреблявших наркотики.

Диаграмма 1.

По кумулятивному показателю удельный вес ВИЧ-инфицированных, заразившихся гетеросексуальным путем, составил 55,4%, при внутривенном введении наркотиков – 37,9%, гомосексуальном контакте – 2,2%, детей, заразившихся от матерей во время беременности и родов, – 0,8%.

Как и в предыдущие годы выявляемость ВИЧ-инфекции в поликлиниках лечебно-профилактических учреждений значительно выше, чем в других учреждениях здравоохранения, удельный вес выявленных в поликлиниках в 2013 г. составил 49,0%.

На конец 2013 года высокоактивную антиретровирусную терапию получают 426 больных ВИЧ-инфекцией, что составляет 100% от подлежащих лечению или 35,4% от состоящих на учете.

В результате проведенного анализа отмечается, что ЧР относится к регионам с низким уровнем инфицирования ВИЧ. Заболеваемость за ряд лет стабилизировалась на низких показателях с незначительной тенденцией к росту. Имеет место вовлечение в эпидемический процесс населения более старших возрастов, перераспределение ВИЧ-позитивных по факторам риска заражения в сторону увеличения удельного веса заразившихся половым путем, рост доли ВИЧ-инфицированных женщин и рождаемости от них детей.

В структуре ВИЧ-позитивных по месту проживания возрастает удельный вес сельского населения. Наиболее высокий удельный вес ВИЧ-позитивных отмечается среди неработающего населения, вместе с тем намечается рост инфицирования среди работающих.

Более 30% случаев заражение происходит за пределами ЧР, что указывает на необходимость профилактической работы в отъезжающих организованных коллективах.

Высокий охват антиретровирусной терапией в республике ВИЧ-инфицированных позволяет снизить интенсивность передачи ВИЧ-инфекции в общей популяции населения, что прямо влияет на заболеваемость, обеспечивая ее снижение и повышает эпидемиологическое благополучие населения. Также своевременное начало лечения снижает смертность и инвалидизацию среди ВИЧ-инфицированных, повышает качество и продолжительность их жизни.

Литература:

1. Справка ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2013 г., ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», специализированная НИ лаборатория по профилактике и борьбе со СПИД (Федеральный научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом).

2. Информационный бюллетень Приволжского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД «ВИЧ-инфекция в Приволжском федеральном округе», ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (г. Нижний Новгород).

3. Информационный бюллетень № 124 «ВИЧ-инфекция в Чувашской Республике в 2013 году», БУ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Минздравсоцразвития Чувашии.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КРИПТОКОККОЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

Шахбазова Е.Н., Жадько Е.Н., Котляр Е.Ю., Захарова О.С., Килина Л.Н., Нагимова Ф.И., Галиуллин Н.И.

ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» Министерства здравоохранения республики Татарстан»

lenashakhbazova@yandex.ru

Клиническая диагностика криптококкоза затруднена из-за почти полного отсутствия характерных симптомов.

Данные о частоте криптококкоза в России отсутствуют, последние годы отмечен рост числа зарегистрированных случаев в Санкт-Петербурге.

Возбудителем является гриб *Cr.neoformans (*Sanfelice, 1894*)*, относящийся к классу базидиомицетов роду *Cryptococcus*. Этот род включает большое количество видов и вариантов, из которых наиболее частым возбудителем микоза в 90% случаев являются *Cr.neoformans var. neoformans* и *Cr.neoformans var. Grubii*. Наиболее чувствительными к этому микроорганизму являются головной мозг и его оболочки, основные клинические формы заболевания менингит и менингоэнцефалит.

Естественная устойчивость здорового человека к криптококкам достаточно высокая. Об этом свидетельствует преимущественная заболеваемость криптококкозом лиц с нарушениями иммунной системы, хотя возбудители широко распространены в различных географических зонах.

Однако, с ведением высоких технологий в медицину, растет заболеваемость криптококкозом и среди лиц, не инфицированных ВИЧ (трансплантация органов и тканей, врожденные формы иммунодефицита, длительное применение иммунодепрессантов и кортикостероидов, декомпенсированный сахарный диабет и др.).

Значительное число случаев остаются нераспознанными и «проходят под маской» других заболеваний.

Цель исследования.

Микологическое обследование больных ВИЧ-инфекцией ГАУЗ «РЦПБ СПИД И ИЗ МЗ РТ» города Казани с клиническими признаками поражения центральной нервной системы и мониторинг чувствительности к антимикотикам выделенных возбудителей.

Методы исследования.

Период исследования – август 2010 – декабрь 2013 года. Обследовано 103 ВИЧ-инфицированных пациента с диагнозами менингит и менингоэнцефалит, находящихся на наблюдении и лечении в отделении медико-социальной реабилитации в ГАУЗ «РЦПБ СПИД И ИЗ МЗ РТ» города Казани. Все пациенты разделены по стадиям ВИЧ-инфекции, возрасту и полу.

Стадии ВИЧ-инфекции определяли по приказу МЗ СЗ РФ от 17 марта 2006 года № 166. На 2В стадии (острая инфекция с вторичными заболеваниями) находились 2 пациента (1,94%), на 3 стадии (субклиническая стадия) – 11 пациентов (10,7%). На 4 стадии вторичных заболеваний находились 87,4% – 90 человек: из них: 4А стадии – 8 (7,8%), 4Б стадии – 35 (34%), 4В стадии – 47 (45,6%) пациентов.

Мужчины составили 70% (72 человека), женщины – 30% (31 человек), максимальный возраст – 60 лет, минимальный – 20 лет. Среди обследованных преобладает возрастная категория от 20 до 40 лет (84,5%), старше 40 лет – 15,5% (16 человек).

Исследовано 118 образцов: ликвор – 45 проб, сыворотка – 73 пробы. Забор и доставка материала осуществлялись согласно общим требованиям. Для выделения и идентификации возбудителя использовали общеупотребительные микробиологические методы исследования, направленные на получение чистой культуры возбудителя, изучение его биологической характеристики.

Идентификация выделенных грибов до вида проводилась с помощью тест-системы *Auxacolor* 2 (БиоРад, Франция). Чувствительность к антимикотикам определяли с применением тест-систем *Fungitest* (БиоРад, Франция) *YeastOne* (Sensititre, Гален). Антиген криптококка в ликворе и сыворотке определяли методом латекс-агглютинации в тест-системе *Pasrorex Cryptoplus* (БиоРад, Франция).

Результаты и обсуждение.

В процессе исследования получены следующие положительные результаты: антиген криптококка выявлен в 12,3% сывороток (9 проб), антиген криптококка в ликворе выявлен в 17,7% случаев (8 проб). Сыворотку исследовали только методом латекс-агглютинации для определения антигена криптококка. По литературным данным обнаружение антигена *Cryptococcus spp.* в сыворотке больных ВИЧ-инфекцией дает 90% подтверждение диагноза криптококкоза.

С конца 2012 года в лабораторию чаще поступает сыворотка от ВИЧ-инфицированных пациентов для исследования на криптококкоз. Исследование сыворотки на антиген Cryptococcus spp. является своеобразным скрининговым методом в диагностике, так как не всегда удается провести пункцию спинного мозга для получения ликвора от ВИЧ-инфицированного пациента. Поэтому при подозрении на криптококкоз любой локализации всем больным ВИЧ-инфекцией показано определение антигена *Cryptococcus spp.* в сыворотке.

Из 103 обследованных лиц антиген криптококка выявлен у 13 человек (12,6%). Из них на 3 стадии заболевания находилось 3 человека (23%), на 4Б стадии – 2 человека (15,4%) и на 4В стадии – 8 человек (61%). Подавляющее большинство больных криптококкозом мужчины – 12 человек (92,3%). 9 пациентов (69,2%) находились в возрасте старше 40 лет. 11 больных (84,6%) взяты на диспансерное наблюдение с диагнозом ВИЧ-инфекция сравнительно недавно (менее 3-х лет), причем более 50% из них были поставлены на диспансерный учет в середине 2013 года (полгода назад).

При поступлении ликвора на микробиологическое исследование первично проводили микроскопию нативного препарата. Все пробы ликвора, где были обнаружены дрожжевые клетки, давали положительный результат и в реакции латекс-агглютинации на наличие антигена *Cryptococcus neoformans*.

Культуральное исследование всех поступивших в лабораторию проб ликвора проводилось на выявление бактериального и грибкового роста. Однако во всех случаях, где отмечался рост культуры, нами получен рост только криптококка. Высевы со сред обогащения также не давали бактериального роста. На среде Сабуро мы наблюдали появление колоний беловатого цвета чаще на 3-5 сутки, иногда на 7 сутки. На агаре Сабуро криптококки образовывали колонии практически одинакового размера и пастообразной консистенции. На хромогенной среде размер и цвет колоний различался: размер – от мелких до крупных, цвет – от бежевого до различных оттенков коричневого.

Идентификация выросших культур показала, что во всех случаях выделен *Cryptococcus neoformans*. Типирование вариантов криптококка методом ПЦР не проводилось.

Известно, что при отсутствии в препаратах ликвора типичных клеток рекомендуется проводить дополнительное изучение проб СМЖ, взятых повторно, так как при локализованных криптококковых очагах поражения в ЦНС клетки гриба обнаруживаются в СМЖ не всегда. В нашем случае повторных исследований ликвора при отсутствии положительных результатов не было.

В 8 пробах ликвора был выделен *Cryptococcus neoformans*. В этих же 8 образцах мы обнаружили дрожжевые клетки в нативном препарате и капсулу при микроскопии в капле туши.

Все выделенные штаммы гриба были протестированы на чувствительность к антимикотокам. При изучении резистентности к антимикотикам штаммов грибов, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на диспансерном наблюдении в «РЦПБ СПИД И ИЗ МЗ РТ» можно отметить сохранение чувствительности к флюконазолу у 7 пациентов из восьми, лишь в одном случае мы наблюдали умеренную чувствительность к флюконазолу.

По данным литературы первичная резистентность *Cryptococcus neoformans* к азоловым антимикотикам развивается редко. Однако возможно развитие вторичной резистентности при длительной антифунгальной терапии. Поэтому клиницистам нужно помнить, что у таких ВИЧ-инфицированных пациентов необходимо повторно забирать именно ликвор с целью получения роста штамма с обязательной оценкой его чувствительности к антифунгальным препаратам.

У двух из 8 ВИЧ-инфицированных пациентов ликвор и сыворотка забирались неоднократно в течение исследуемого периода. У первого пациента после первичного выделения криптококка и проведенного лечения: в последующем все исследованные пробы были отрицательными. У второго пациента после повторного взятия ликвора на фоне проводимой терапии флюконазолом снова был получен рост *Cryptococcus neoformans*. Но получить чувствительность к антимикотикам не удалось на Фунгитесте, поэтому использовали метод серийных разведений с определением МПК. Получили умеренную устойчивость к флюконазолу (МПК 16 мкг/мл) и чувствительность к вориконазолу (МПК 0,25 мкг/мл). По результатам анализа пациенту терапия флюконазолом была заменена на вориконазол. Как показали контрольные исследования, гриб продолжает персистировать в организме больного. Причем больной находится на АРВТ с 2009 года, при этом на фоне снижения вирусной нагрузки уровень СД4 клеток остается низким (<0,03х10*9/л).

На сегодня основные стратегические проблемы терапии ВИЧ-инфекции так ли иначе оказываются связанными с появлением резистентности вируса к антиретровирусной (АРВТ) терапии. На фоне снижения эффекта АРВТ у пациентов возможно присоединение тяжелых оппортунистических заболеваний, к которым относится криптококкоз. Так из 13 обследованных нами пациентов, у которых был выделен *Cryptococcus neoformans*, 9 получали АРВТ. Вероятность связи развития у них криптококкоза с резистентностью вируса к АРВТ весьма высока. Возможно, стоит рассмотреть вопрос ранней

профилактики криптококкового менингита у ВИЧ-инфицированных пациентов не зависимо от стадии заболевания с назначением флюконазола.

Выводы

Основная часть ВИЧ-инфицированных пациентов (76,4%), которым поставлен диагноз внелегочного криптококкоза, преимущественно мужчины (92,3%) в возрасте от 30 до 40 лет (77%), находилась на стадии вторичных заболеваний. Во всех положительных пробах ликвора *Cryptococcus neoformans* обнаружен иммунологическими и микологическими методами. Все выделенные штаммы *Cryptococcus neoformans* имели капсулу небольших размеров. Выделенные штаммы *Cryptococcus neoformans* чувствительны к флюконазолу. При длительном применении флюконазола необходим мониторинг за уровнем чувствительности к этому препарату возбудителя. Позднее выявление ВИЧ-инфекции и постановка на диспансерное наблюдение приводит к развитию тяжелых оппортунистических заболеваний, в частности криптококкоза. Необходим скрининг сыворотки ВИЧ-инфицированных больных для выявления антигена криптококка.

ДОРОЖНОЕ КАРТИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА МОДЕРНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ ПРОФИЛАКТИКИ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (СЗЗ) В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Н.В.Сопина, С.Б.Рыбалкин, С.В.Олейник, Н.С.Федосеева

Пензенский институт усовершенствования врачей МЗ РФ;

ГБУЗ «Пензенский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи»;

Общественный фонд поддержки здравоохранения и образования г. Пензы «АнтиСПИД»

svmp@penzadom.ru

Анализ эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции позволяет специалистам делать вывод о том, что «организационные и профилактические мероприятия по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции не направлены на основные движущие силы эпидемии, осуществляются на недостаточном уровне и не позволяют добиться ощутимых результатов в борьбе с эпидемией ВИЧ-инфекции».

Принимая во внимание взаимную обусловленность ряда социально значимых заболеваний (наркомания, ВИЧ-инфекция, ИППП, парентеральные гепатиты) и сходные пути их передачи, при разработке комплекса профилактических мероприятий необходимо учитывать имеющиеся данные эпидемиологического анализа, использовать современные технологии прогнозирования и планирования профилактических вмешательств.

Целью предлагаемого исследования является проведение анализа процесса модернизации системы профилактики СЗЗ в Пензенской области.

Материалы и методы

Эпидемиологический анализ, SWOT-анализ, форсайт-анализ, технология дорожного картирования.

Полученные результаты

Эпидемиологический анализ данных о заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Пензенской области свидетельствует об имевших место двух вспышках заболеваемости с «пиками» в 2001 г. и 2012 г. Динамика заболеваемости обнаружила совпадение с общероссийскими тенденциями, но уровни заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Пензенской области были в 3-4 раза ниже средних по России (рис. 1, 2, 3).

Рисунок 1

Пик заболеваемости в 2001г. был связан с вспышкой ВИЧ-инфекции среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) во втором по величине городе Пензенской области – в городе Кузнецке.

Рисунок 2

Пик заболеваемости ВИЧ-инфекцией в 2012 г. был также связан со вспышкой среди потребителей наркотиков в областном центре – в городе Пензе.

Рисунок 3

Показатель заболеваемости ВИЧ-инфекцией по Пензенской области в 2012 г. был выше, чем в 2001 г., хотя был вызван ростом заболеваемости в Пензе всего в 2,5 раза. Если в среднем по России показатель заболеваемости растет, то в Пензенской области в 2013 г. заболеваемость была стабилизирована и обнаруживает тенденцию к снижению. Доля внутривенной передачи ВИЧ снизилась в 2013 году по сравнению с 2012 г. с 42,8% до 38,1% за счет изменения ситуации в г. Пензе (снижение с 54% в 2012 г. до 47,6% в 2013 г.). Снизилась также выявляемость ВИЧ-инфекции при проведении обследований групп высокого риска инфицирования (по к.102 – на 23%).

Это позволяет сделать вывод о том, что относительно благополучная ситуация по ВИЧ-инфекции в 2001г. была связана с работой проекта профилактики ВИЧ-инфекции среди ПИН и успешным решением задачи сдерживания эпидемии в столице региона. Рост заболеваемости в 2012 г. прогнозировался в связи с ожидаемым (и произошедшим) годичным прекращением работы проекта в Пензе и мог быть существенно выше, если бы не быстрое восстановление мощности проекта при возобновлении его работы в августе 2012 г.

Эпидемиологический анализ позволяет выявить закономерности эпидемического процесса, которые могут быть использованы для прогнозирования и разработки эффективных стратегий противодействия эпидемиям СЗЗ, включая ВИЧ-инфекцию:

1. Распространение ВИЧ инъекционным путем определяет вспышечное развитие эпидемии, в то время как для передачи ВИЧ половым путем более характерен постепенный рост или стабильная заболеваемость.

2. На показатели заболеваемости ВИЧ-инфекцией в регионе в целом наибольшее влияние оказывает напряженность эпидемической ситуации в крупных городах.

3. Чем выше показатели пораженности населения отдельных населенных пунктов и территорий ВИЧ-инфекцией, тем выше показатели заболеваемости. Высокие показатели заболеваемости обусловлены формированием больших резервуаров инфекции среди ПИН на территориях.

4. Приоритетными задачами профилактики ВИЧ-инфекции должно считаться сдерживание вспышечной заболеваемости в крупных городах региона.

5. Для обеспечения эффективности проектов профилактики ВИЧ-инфекции они должны стремиться к максимальному охвату ПИН (не менее 30% от оценочного количества) при обеспечении участия в проекте не менее 13%–15% ПИН на постоянной основе (обращение в проект не реже 1 раза в месяц в течение полугода).

6. Для обеспечения прямого воздействия на эпидемию в соответствии с Рекомендациями ВОЗ/UNAIDS каждый из ПИН, являющихся участниками проекта, должны получать в среднем не менее 150 шприцев и не менее 25 презервативов в год.

7. В отличие от программ первичной профилактики (условием проведения которых должно быть подтверждаемое качество профилактики СЗЗ), проекты профилактики СЗЗ в уязвимых группах способны демонстрировать высокую эффективность: достижение быстрых результатов при низких затратах.

Учитывая выводы эпидемиологического анализа, созданным координирующим органом (Межведомственный экспертный совет при Правительстве Пензенской области) проведено «дорожное картирование» модернизации системы профилактики СЗЗ:

1. Разработано видение системы профилактики СЗЗ к 2024г.

2. Проведено стратегическое планирование, включая SWOT-анализ, определена стратегия развития системы профилактики.

3. Разработан план приоритетных мероприятий.

4. Рассчитаны сценарии развития эпидемической ситуации в зависимости от полноты и своевременности выполнения плана мероприятий.

5. Проведен расчет прогнозируемой численности ЛЖВ (в зависимости от сценария).

6. Рассчитаны затраты на специфическую терапию (АРВТ) для каждого из сценариев развития эпидемии.

Приоритетными задачами в противодействии эпидемиям СЗЗ определены:

1. Сдерживание вспышечной заболеваемости ВИЧ-инфекцией в крупных городах Пензенской области.

2. Обеспечение качества проведения первичной профилактики СЗЗ.

3. Разработка системы мониторинга и оценки профилактических мероприятий по стандартным критериям.

4. Создание и совершенствования механизма координации профилактической работы.

«ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ НАСЕЛЕНИЯ»

МАТЕРИАЛЫ ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ,

посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. БЛОХИНОЙ

(28 мая 2014 г., г. Нижний Новгород)

Под редакцией профессора Е.И. Ефимова

г. Нижний Новгород
2014 г.