



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ИЗДАЕТСЯ С СЕНТЯБРЯ 1924 г.

ОРГАН МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

№10/2011



Лауреат
V Национального
конкурса
«Золотая литера»

Журнал включен в Перечень рецензируемых изданий,
рекомендованных ВАК Республики Беларусь
для опубликования результатов научных исследований

Редакционная коллегия:

АРНАУТОВ О. В.
АХТЕМИЙЧУК Ю. Т. (Украина)
БАРКОВСКИЙ Е. В.
БЕЛЕЦКИЙ А. В.
БЮХЛЕР М. В. (Германия)
ВЕКСНЕР С. (США)
ВОЛОТОВСКИЙ И. Д.
ВОРОБЕЙ А. В.
ГЕРАСИМОВИЧ Г. И.
ДЕДОВ И. И. (Россия)
ЖАРКО В. И.
ЗАТЕВАХИН И. И. (Россия)
КАРПОВ И. А.
КЕВРА М. К.
КОВАЛЕНКО В. Н. (Украина)
КУБАРКО А. И.
МАЛИНОВСКИЙ Н. Н. (Россия)

МАНАҚ Н. А.
МИХАЙЛОВ М. И. (Россия)
НАСОНОВ Е. Л. (Россия)
ПОКРОВСКИЙ В. И. (Россия)
ПОТАПНЕВ М. П.
СМЫЧЕК В. Б.
СОРОКА Н. Ф.
СУКАЛО А. В.
СУКОНКО О. Г.
СУСЛИНА З. А. (Россия)
ТЕРНОВ В. И.
ТИТОВ Л. П.
ХОЛОДОВА Е. А.
ЧЕРСТВЫЙ Е. Д.
ЧУЧАЛИН А. Г. (Россия)
ШОТТ А. В.

Главный редактор
Ю. К. АБАЕВ

Зам. гл. редактора
В. С. УЛАЩИК
Отв. секретарь
Л. А. ФЕДОТОВА

Редакционный совет:

ВАСИЛЬКОВ Н. А.
ДЕЙКАЛО В. П.
ДЕМИДЧИК Ю. Е.
ДЕРКАЧ Ю. Н.
ЛИПНИЦКИЙ И. Э.
ЛОСИЦКИЙ И. Г.
ЛЫЗИКОВ А. Н.

ПИНЕВИЧ Д. Л.
СИКОРСКИЙ А. В.
СИРЕНКО В. И.
СНЕЖИЦКИЙ В. А.
СТРИЖАК А. А.
ЧАСНОЙТЬ Р. А.
ШРУБОВ В. И.



Дорогие коллеги!

Глобализация, постепенно приводящая к формированию мира как единой целостной системы, оказывает влияние на все сферы общественной жизни, в том числе на медицину и, особенно, на распространенность инфекционных заболеваний. Известный эпидемиолог Л.В. Громашевский (1887–1980) писал: «Следуя по путям человеческих отношений туда, куда направляется хозяйственная деятельность человека, изменяя формы и объем своего распространения под влиянием общественной структуры, инфекционные болезни в своей эпидемиологии отражают те технические, экономические, социально-политические и культурные процессы, которые совершаются в обществе».

Рост международной торговли и туризма способствует распространению возбудителей инфекционных болезней, особенно с коротким инкубационным периодом и воздушно-капельным механизмом передачи возбудителя (грипп, оспа, чума и др.) по всему миру. Достаточно нескольких часов, чтобы инфекция, вспыхнувшая в одном регионе мира, вызвала чрезвычайную ситуацию на другом конце планеты. Нарастающий процесс урбанизации

приводит к формированию антропогенных экологических ниш и искусственных путей инфицирования для ряда возбудителей сапронозов (легионеллез, листериоз, иерсиниоз и др.). Ускоряется эволюция инфекционных болезней. За последние десятилетия клинические и эпидемиологические проявления многих инфекций изменились больше, чем за всю предыдущую историю наблюдений за ними. Если раньше больше внимания привлекали острые инфекционные заболевания, то сейчас – хронические (вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция и др.).

Опасность инфекционных болезней связана не только с «реставрацией» хорошо известных, но уже порядком подзабытых заболеваний (холера, желтая лихорадка и др.), но и с появлением новых, прежде не знакомых человечеству инфекций. За последние 35 лет выделено и идентифицировано более 40 новых патогенов – от исключительно опасного вируса геморрагической лихорадки Эбола до ротавирусов – распространенных возбудителей диареи у детей. Многие из новых видов инфекций характеризуются тяжелым течением, высокой летальностью, отсутствием надежных методов диагностики и профилактики. Новые возбудители заболеваний приобретают все большую устойчивость к антибиотикам, бороться с ними становится все труднее.

Современные технологии в медицине также увеличивают риск появления новых болезней и формирование необычных для известных возбудителей путей распространения. Значительная угроза исходит от успехов генной инженерии и биотехнологии. Манипулирование генами может привести к повышению антигенных свойств подопытных микроорганизмов, при этом иммунная защита организма человека, возможно, окажется неэффективной в связи с появлением новых иммунодоминантных эпитопов. Негативную роль играет постепенное изменение климата – глобальное потепление. В результате малярия завоевывает все большие территории Азии и Африки, а смертоносная лихорадка «денге», практически побежденная в прошлом столетии, начала появляться в Африке, Центральной, Южной Америке, на территории США, Австралии и в Европе.

Эпидемиологический прогноз первой половины XXI века неутешителен. Неизбежен рост проблем и для Беларуси, располагающейся в центре Европы на пути транспортных и миграционных потоков между Западом и Востоком. Это ставит новые более сложные задачи перед органами здравоохранения, эпидемиологической и инфекционной службами, а также врачами лечебной сети. В данном и двух последующих номерах журнала будут опубликованы актуальные для нашей республики статьи сотрудников РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, посвященные различным аспектам диагностики и лечения инфекционных заболеваний.

В заключение разрешите напомнить, что началась подписка на I полугодие 2012 г. Мы верим, что журнал «Здравоохранение» сохранит не только своих постоянных подписчиков, но и приобретет новых авторов и читателей.

С уважением

Ю. К. Абеев

**Проблемы эпидемиологии,
микробиологии и инфекционных болезней**

- Капитулец С. П., Жавнерко Г. К., Капитулец Н. Н.,
Парибок И. В., Ничипорук О. И., Полещук Н. Н.**
Нанотехнологические подходы к визуализации
и идентификации амилоидных белковых агрегатов 4
- Газиумарова Л. Д., Титов Л. П.** Листерия: эпидемиология, этиопатогенез и методы лабораторной диагностики 9
- Ермакова Т. С., Горбунов В. А., Титов Л. П.**
Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций 16
- Глазкова С. Э., Лебедев Ф. А., Титов Л. П.**
Чувствительность штаммов *Neisseria meningitidis* к антибиотикам 26
- Грибкова Н. В., Шмелева Н. П., Сивец Н. В.**
Эпидемия гриппа в Республике Беларусь в первый постпандемический сезон (2010—2011 гг.) 31
- Поклонская Н. В., Амвросьева Т. В., Безручко А. А.,
Гринкевич П. И., Хило А. В., Кишкурно Е. П.**
Генотипирование возбудителей норовирусной инфекции 36
- Винокурова Н. В., Счесленок Е. П., Клавсут Г. А.,
Семижон П. А., Красько А. Г., Бусел С. А.,
Фидаров Ф. М., Владыко А. С.** Идентификация возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Республике Беларусь 43

Обмен опытом

- Беляковский В. Н., Волченко А. Н., Воропаев Е. В.,
Силин А. Е.** Выявление папилломавирусов высокого канцерогенного риска и других урогенитальных инфекций при профилактике рака шейки матки 46
- Воскресенский С. Л., Кошельков Я. Я.,
Кадырко С. М., Славинская А. А.** Характеристика микрофлоры половых органов и ее чувствительность к антибиотикам при аплазии влагалища до и после кольпопозза свободным кожным лоскутом 51

Школа молодого ученого

- Улащик В. С.** Классификация и особенности научных исследований в медицине 56

Срочные публикации

- Лещук С. П., Потапнев М. П., Лях С. А.,
Лагодич Л. Г.** Анализ использования компонентов крови в организациях здравоохранения Республики Беларусь 61
- Пищик Н. Н., Косенко И. А., Матылевич О. П.,
Прудывус И. С.** Эффективность основных методов лечения больных раком шейки матки в Беларуси 65
- Круглик О. А.** Отдаленные результаты реставрации зубов с повышенным стиранием при помощи фотоотверждаемого композиционного материала 69

Юрист разъясняет

- Липовка А. П., Купрейчик Н. И.** Порядок предоставления гарантий и компенсаций за работу во вредных и (или) опасных условиях труда по результатам аттестации рабочих мест 73

Некролог

- Памяти Петра Иосифовича Лобко 74

Круглый стол

- Внутрибольничные инфекции 76

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

- Kapitulets S. P., Zhavnerko G. K., Kapitulets N. N.,
Paribok I. V., Nichiporuk O. I., Poleshchuk N. N.**
Nanotechnologic approaches to visualization and identification of amyloid aggregates
- Gaziumarova L. D., Titov L. P.** Listeriosis: epidemiology, etiopathogenesis, and methods of laboratory diagnosis

- Ermakova T. S., Gorbunov V. A., Titov L. P.** Etiological structure and resistance of pathogenic agents causing pyoseptic infections to antibiotics

- Glazkova S. E., Lebedev F. A., Titov L. P.** *Neisseria meningitidis* strains sensitivity to antibiotics

- Gribkova N. V., Shmelyova N. P., Sivets N. V.** Influenza epidemic in the Republic of Belarus during the first postpandemic season of 2010 – 2011

- Poklonskaya N. V., Amvrosiyeva T. V., Bezruchko A. A.,
Grinkevich P. I., Khilo A. V., Kishkurno E. P.** Genotyping of pathogenic agents causing noroviral infection

- Vinokurova N. V., Scheslenok E. P., Klavsut G. A.,
Semizhon P. A., Krasko A. G., Busel S. A., Fidarov F. M.,
Vladyko A. S.** Identification of pathogenic agents causing hemorrhagic fever accompanied by renal syndrome circulating on territory of the Republic of Belarus

Sharing Experience

- Belyakovsky V. N., Volchenko A. N., Voropayev E. V.,
Silin A. E.** Papilloma viruses of high carcinogenic risk and other urogenital infections detection under cervical carcinoma prevention

- Voskresensky S. L., Koshelkov Ya. Ya., Kadyrko S. M.,
Slavinskaya A. A.** Description of sexual microflora and its sensitivity to antibiotics under vagina aplasia before and after colpoptosis by free skin flap

School for Beginning Researchers

- Ulashchik V. S.** Classifications and particular features of scientific researches in medicine

Urgent Publications

- Leshchuk S. P., Potapnev M. P., Lyakh S. A.,
Lagodich L. G.** Analysis of using blood components at public health organizations in the Republic of Belarus

- Pishchik N. N., Kosenko I. A., Matylevich O. P.,
Prudyvus I. S.** Efficiency of major methods of managing patients with cervical carcinoma in Belarus

- Kruglik O. A.** Remote outcomes of hyper-erasing teeth restoration by photocurable composite materials

Layer is explaining

- Lipovka A. P., Kupreichik N. I.** Procedure of providing guarantees and compensating for working under harmful and/or dangerous working conditions basing on the results of workplaces attestation

Obituary

- In commemoration of Pyotr Iosifovich Lobko

Talking at Round Table

- In-hospital infections



С. П. КАПИТУЛЕЦ, Г. К. ЖАВНЕРКО, Н. Н. КАПИТУЛЕЦ,
И. В. ПАРИБОК, О. И. НИЧИПОРУК, Н. Н. ПОЛЕЩУК

НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИЛОИДНЫХ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Оптимизировать метод атомно-силовой микроскопии для визуализации и идентификации PrP-структур в очищенных фракциях PrP^{Sc}.

Материал и методы. На 5 золотистых сирийских хомяках воспроизведена экспериментальная инфекция скрепи, штамм 263 K. От животных в терминальной стадии болезни получен инфекционный материал. Выделение и очистку аномальной протеазоустойчивой изоформы прионного белка (PrP 27-30) проводили по методу H. Hilmert и H. Diringer (1984) в собственной модификации. Наличие PrP 27-30 в очищенной фракции мозга определяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле и методом иммунного блоттинга, инфекционность PrP 27-30 — биопробой на животных. Визуализацию PrP-структур и идентификацию PrP 27-30 осуществляли методом атомно-силовой микроскопии на локально активированной поверхности кремния и пленки золота на кремнии.

Результаты. В очищенной фракции PrP 27-30 изучены различные пространственные PrP-структуры: трехлепестковые ассоциаты и кристаллические четырехлучевые структуры. Показана их частичная устойчивость к ферментативной обработке протеиназой K и инфекционность для лабораторных животных. Отработана технология локальной активации поверхности гидрофильного кремния микроконтактной печатью бычьего сывороточного альбумина, промотирующего адсорбцию антиприонных моноклональных антител 3F4. Показано, что метод локальной активации кремниевой поверхности специфическими антителами позволяет проводить управляемую фиксацию PrP 27-30 из анализируемой пробы на микронных участках поверхности.

Заключение. Полученные результаты могут быть использованы для совершенствования исследований этиопатогенеза конформационных болезней, в том числе и развития методов прижизненной диагностики прионных инфекций у человека.

Ключевые слова: конформационные болезни, амилоидные структуры, аномальный протеазоустойчивый прионный белок, атомно-силовая микроскопия, локально активированная поверхность кремния.

В настоящее время известно более 25 заболеваний человека, включая прионные болезни, которые ассоциируются с системным или локальным отложением в тканях мозга амилоидных белковых агрегатов [1]. Амилоидные заболевания, отнесенные также к конформационным болезням, вызваны нарушением процессов формирования пространственной структуры ряда белков (сейчас их известно 16), приводящих к изменениям физиологии клетки. В патогенезе болезни конформационно-измененные белки, состоящие

из растворимых в норме клеточных белков, объединяясь, образуют в итоге нерастворимые амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки во вне- и внутри нервных клеток [2]. Как правило, это вызывает дезинтеграцию и коллапс транспортной системы нейрона, приводя сначала к нарушению биохимической передачи сигналов между клетками, а затем и к гибели самих клеток [3, 4].

Отложение аномального протеазоустойчивого прионного белка (PrP^{Sc}) в виде амилоидных бляшек отмечается при всех известных в настоящее время прогрессирующих нейродегенеративных заболеваниях прионной природы и является основной «мишенью» при изучении заболеваний [1]. Термин «инфекционный амилоидоз», предложенный для прионных болезней D. C. Gajdusek, подчеркивает патоморфологическую картину этих заболеваний и одновременно дифференцирует от других видов амилоидозов, уточняя их инфекционную (трансмиссивную) природу [5]. Считается, что прионы представляют собой инфекционную разновидность амилоидных фибрилл.

В настоящее время использование спектроскопического структурного анализа, наиболее оптимального метода для получения точной информации о структуре белка на молекулярном уровне, при изучении структурной организации прионов сильно ограничено необходимостью применения значительного количества высокоочищенных белковых фракций, что неприемлемо при прионных заболеваниях, поскольку PrP^{Sc} содержится в клетках нервной ткани в низкой концентрации, а очищенные его фракции остаются загрязненными другими белками [6]. В ряде исследований вместо PrP^{Sc} анализировали амилоидные фибриллы из синтетического пептида и рекомбинантного прионного белка [7, 8]. Однако синтетические прионы до сих пор остаются неинфекционными (трансмиссибельными) и, следовательно, не могут считаться полностью аутентичными PrP^{Sc}.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из перспективных подходов для получения информации о прионных структурах в виде изображений на твердой поверхности при исследовании образцов как на воздухе, так и в жидкостной ячейке при физиологических условиях [8].

Целью настоящей работы является оптимизация метода АСМ для визуализации и идентификации PrP-структур в очищенных фракциях PrP^{Sc}.

Материал и методы

В работе использовали прототипный штамм возбудителя скрепи, шт. 263K, предоставленный В. Б. Григорьевым. Золотистых сирийских хомяков (5 животных 3-недельного возраста, масса 20—25 г) заражали, как описано ранее [9]. Инокулум для заражения готовили в асептических условиях из расчета 1 часть головного мозга хомяка, находящегося в терминальной стадии экспериментальной инфекции скрепи, на 9 частей раствора Хэнкса, pH 7,4 (вес/об.) с до-

бавлением по 100 ЕД/мл антибиотиков пенициллина и стрептомицина (инфекционный титр 6,5 ЛД₅₀/мл). Опытным животным вводили под легким эфирным наркозом по 0,03 мл 10% гомогената мозга интрацеребрально. Длительность инкубационного периода скрепи (время от заражения до начала развития болезни) определяли по выявлению специфических клинических маркеров инфекции: чрезмерное возбуждение животных, неадекватная реакция на внешние раздражители, изменение двигательных функций (нарушение координации, походки, тремор, слабость в конечностях, парезы), резкая потеря массы тела (кахексия). Животных наблюдали в течение 7 мес до их гибели. Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с международными требованиями по гуманному обращению и использованию лабораторных животных [10].

Из образцов головного мозга хомяков, находящихся в терминальной стадии болезни, выделяли и очищали аномальную протеазоустойчивую изоформу прионного белка (PrP27-30) по методу Н. Hilmert и Н. Diringer в собственной модификации [11, 12]. Для этого 5 г ткани мозга гомогенизировали в 50 мл 10 ммоль фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ), рН 7,4, содержащего 10% лаурил саркозила. Полученный гомогенат мозга подвергали двум последовательным этапам центрифугирования: при 22 000 г в течение 30 мин, 4°С и при 215 000 г в течение 2 ч, 4°С. Осадок суспендировали в 5 мл 10 ммоль ФСБ, рН 7,4, содержащем 1% лаурил саркозила и 10 % NaCl, и подвергали озвучиванию на установке «Virsonic cell disrupter Model 16-850» (Швеция) 2 раза по 30 с. Затем проводили ферментативное переваривание образцов протеиназой К (100 мкг/мл, 37°С, 2 ч). Реакцию останавливали добавлением к раствору 1 ммоль фенолметилсульфонил флюорида. Полученный материал разносили по эпендорфам и центрифугировали при 14 000 г в течение 15 мин. Далее осадок дважды отмывали буферным раствором 20 ммоль трис-НСl, рН 8,5 при центрифугировании в аналогичных условиях и озвучивали до просветления раствора. Концентрацию белка в супернатанте определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм по стандартной методике. Расчет проводили по формуле:

$$C = (\text{ОП}_{\text{пробы}} - \text{ОП}_{\text{воды}}) \times 3 \times 750 \times \text{разведение образца}$$

где С — концентрация белка в мкг/мл, ОП_{пробы} — оптическая плотность исследуемого образца, ОП_{воды} — оптическая плотность растворителя (вода).

Полученную очищенную фракцию PrP27-30 (примерно 2 мкг/мл) разводили ФСБ, рН 7,4. Разведение составляло 10⁻², 10⁻⁴ и 10⁻⁶, по 30 мкл каждого разведения вводили интрацеребрально 4 сирийским хомякам. Инфекционность разведений PrP27-30 определяли по продолжительности инкубационного периода болезни, согласно методу S. B. Prusiner и соавт. [13]. Наличие возбудителя скрепи у сирийских хомяков подтверждали электрофорезом в полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ) и методом иммунного блоттинга (ИБ) посредством выявления в гомогенатах мозга PrP27-30.

ЭФ-ПААГ проводили по методу U. K. Laemmli [14]. Из очищенной фракции PrP27-30 отбирали аликвоту

(100 мкл) и добавляли 100 мкл двукратного буфера образца (0,5 моль трис-НСl, 10% глицерин, 10% ДСН, 2,5% меркаптоэтанол, 0,001% бромфеноловый синий). Образцы прогревали в микропланшетном инкубаторе «Dri-block DB-2A» («Techne», Швейцария) при 98°С в течение 5 мин и анализировали в стандартных пластинах «NuPage» («Invitrogen», США) с использованием прибора для мини-электрофореза «XCell SureLock Mini Cell» («Invitrogen», США). В лунки геля наслаивали по 10 мкл образца. ЭФ-ПААГ проводили при 200 В в течение 45 мин при комнатной температуре. В серии экспериментов гели окрашивали Кумасси голубым R-250. Белковые полосы, соответствующие по электрофоретической подвижности PrP27-30, вырезали и элюировали обработкой 30% раствором перекиси водорода (1 ч, 60°С), элюат разводили ФСБ (рН 7,4) в соотношении 1:20 и хранили при -20°С.

ИБ проводили, как описано ранее, по методу Н. Towbin и соавт. [15]. Перенос белков из 12% ПААГ на PDVF-мембрану осуществляли при 150 В в течение 1 ч. В качестве первичных антител использовали коммерческие анти-PrP моноклональные антитела (MAT) 3F4 (Sigma) в рабочем разведении 1:5000. Детекцию иммунореактивных белков проводили с использованием антимышиных антител, меченных пероксидазой хрена (Sigma).

Визуализацию белковых агрегатов PrP27-30 осуществляли методом АСМ путем сканирования поверхности образцов на воздухе с помощью микроскопа «Nanoscope IIIa» («Veeco», США), оборудованного «D-сканером» в контактном режиме (contact mode) и в режиме прерывистого контакта (tapping mode). Были использованы контактные 100- и 200-мкм кантилеверы «Nanoprobe» из Si₃N₄ с константой упругости 0,12 и 0,36 Н/м и тейпинговые иглы из кремния с резонансной частотой ~315 кГц. Сила воздействия иглы на образец в контактном режиме составляла единицы нН. Частота строчной развертки при получении изображения варьировала от 1 до 5 Гц. Толщину пленки определяли по глубине естественного или искусственно сформированного в структуре пленки дефекта. В последнем случае дефект структуры создавали, сканируя небольшой участок поверхности (как правило 400 нм²) при силе воздействия иглы на образец не менее 10 нН.

Результаты и обсуждение

При ферментативной обработке PrP^{Sc} в присутствии детергента удаляется N-концевая область белка с образованием компонента с молекулярной массой (М.м.) приблизительно 27—30 кДа (PrP27-30). PrP27-30 является высокоочищенной фракцией аномального прионного белка и обладает склонностью к полимеризации [1, 7]. Морфоструктурный анализ PrP27-30 может дать дополнительную информацию о структуре прионного амилоида, хотя она имеет искусственное происхождение на этапе очистки.

Полученная в результате выделения и очистки фракция PrP27-30 была проанализирована в 12% ЭФ-ПААГ и методом ИБ (рис. 1). Видно, что исследуемый материал содержал мажорную полосу про-

6 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

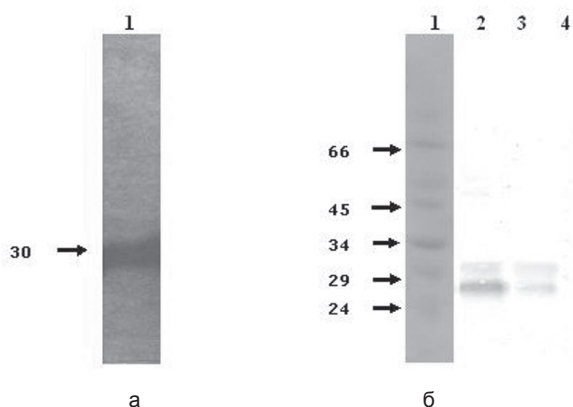


Рис. 1. Выявление аномального прионного белка PrP27-30 в очищенной фракции головного мозга сирийского хомяка с экспериментальным скрепи: а — электрофорез в 12% полиакриламидном геле: дорожка 1 — очищенная фракция PrP27-30, окрашенная Кумасси голубым R-250; б — иммунный блоттинг: дорожка 1 — маркерные белки, окрашенные Ронсеау S; 2 — очищенная фракция PrP27-30; 3 — очищенная фракция PrP27-30 после ферментативной обработки (протеиназа К 20 мкг/мл, 37°C, 1 ч); 4 — очищенная фракция PrP27-30 (разведение 10^{-4})

теазоустойчивого белка с М.м. 27—30 кДа (рис. 1, а), проявляющего специфичность к анти-PrP МАТ 3F4 (рис. 1, б). PrP27-30 в растворе проявлял частичную устойчивость к ферментативной обработке протеиназой К (см. рис. 1, б, дорожки 2 и 3). В очищенной фракции PrP27-30 в разведении 10^{-4} никаких белковых полос, специфически реагирующих с антиприонными антителами, не выявлено (см. рис. 1, б, дорожка 4), однако инфекционность в этой фракции сохранялась (таблица).

Нанотехнологические подходы при анализе морфоструктуры прионных агрегатов в растворе состояли в оптимизации технологии приготовления подложек для сканирования образцов методом АСМ. На 1-м этапе работы были улучшены условия активации/пассивации кремниевой и золотой поверхностей для повышения качества микроструктурированных белковых пленок, используемых для анализа методом АСМ.

Подложки из кремния и пленки золота на кремнии подвергали гидрофилизации путем нагревания в смеси H_2O , H_2O_2 и NH_4OH (в отношении 5:1:1) в течение 10—15 мин при температуре 67—72°C с последующей тщательной промывкой бидистиллированной водой и сушкой в токе азота. Дополнительно пластинки с пленкой золота на кремнии были гидрофоби-

зованы при выдерживании их в растворе 1 ммоль 16-меркаптогексадекана в спирте не менее 8 ч. В серии экспериментов на золотую и кремниевую поверхности наносили по 50 мкл очищенной фракции PrP27-30. Подложки обрабатывали в течение 25 мин при комнатной температуре, тщательно промывали дистиллированной водой (20 раз по 50 мкл) и высушивали на воздухе (20 мин).

В АСМ-образцах, приготовленных путем адсорбции проб электрофоретически очищенных фракций гомогенатов мозга, обработанных протеиназой К, выявлено наличие нескольких видов специфических структур, располагающихся на поверхностях золотых и кремниевых подложек в виде характерных для прионов одиночных, реже довольно крупных скоплений аномальных образований (рис. 2). Структуры PrP27-30, наблюдаемые на поверхностях кремния (рис. 2, а) и золота (рис. 2, б), существенно различались по морфологии. Так, на подложке гидрофильного кремния, обработанного очищенной ЭФ фракцией PrP27-30, выявляются преимущественно 2 вида структур: глобулы диаметром 5—10 нм и трехлепестковые ассоциаты с длиной лепестков от 200 до 270 нм (в среднем 250 нм), причем перепад высот каждого из лепестков составлял от 8 до 40 нм (см. рис. 2, а).

На поверхности гидрофобной золотой подложки отмечены множественные кристаллические структуры, представленные, как правило, несимметричными четырехлучевыми «звездами» размером с зерно, варьирующим от 0,1 до 9 мкм². На лучах «звезд» просматривались регулярные структуры с периодом ~12 нм. Максимальная длина кристаллитов достигала 9 мкм, высота — до 140 нм. Между кристаллами наблюдались глобулярные структуры диаметром 8—10 нм и более (см. рис. 2, б). Результаты АСМ коррелировали с данными ИБ.

Для исследования процессов избирательной адсорбции исследуемого белка на гидрофильную поверхность кремния методом микроконтактной печати (МКП) были нанесены полосы бычьего сывороточного альбумина (БСА). В качестве мастера использовали кремниевую калибровочную решетку TGZ3 для АСМ с высотой «ступенек» 540 ± 2 нм и периодом 1,5 мкм. Реплику (штамп) получали, сшивая полидиметилсилоксановый олигомер на мастере, нагревая его при 100°C в течение 30 мин. БСА наносили на поверхность штампа из водного раствора (концентрация 1 мг/мл), помещая каплю раствора на поверхность штампа на 15 мин. Затем следовала стадия отмывания поверхности штампа от избытка адсорбата

Инфекционность PrP27-30 в очищенной фракции головного мозга сирийского золотистого хомяка с экспериментальным скрепи для лабораторных животных

Разведение очищенной фракции	Концентрация PrP27-30, г	Сирийские золотистые хомяки, n		Инкубационный период, сут	Инфекционность, lg ЛД ₅₀ /мл
		заболевшие	всего в опыте		
10^{-2}	$2 \cdot 10^{-6}$	4	4	$86,8 \pm 0,6$	4,4
10^{-4}	$2 \cdot 10^{-8}$	4	4	$118,8 \pm 1,5$	2,1
10^{-6}	$2 \cdot 10^{-10}$	2	4	$178,5 \pm 16,5$	>2,0
Контроль	0	4	0	0	0

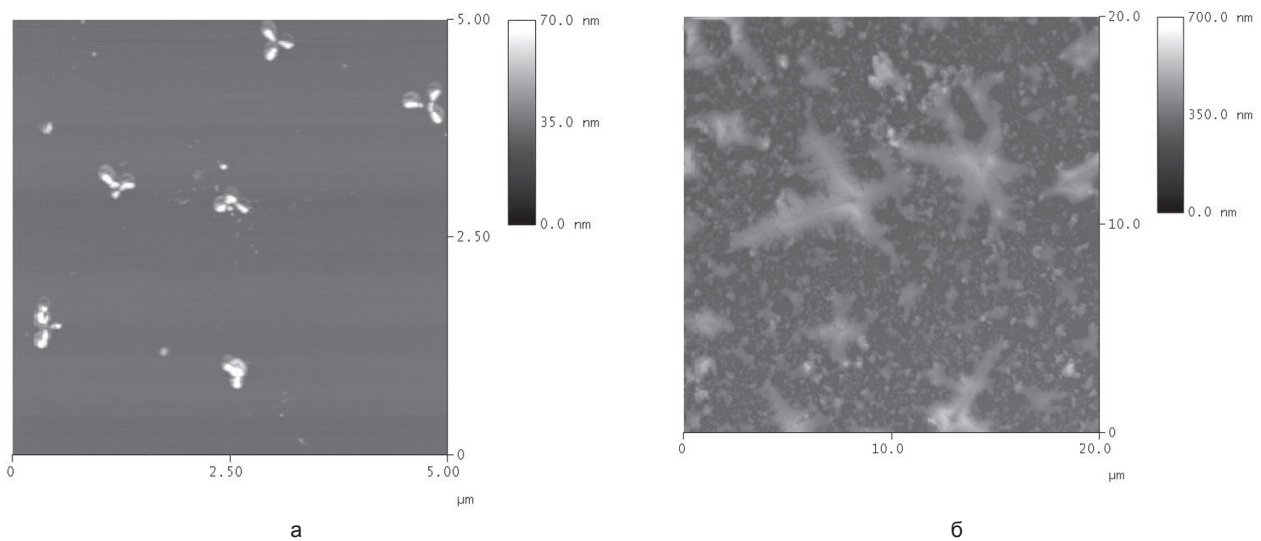


Рис. 2. АСМ-изображение пространственных форм прионного белка PrP27-30 в очищенной фракции головного мозга сирийского золотистого хомяка с экспериментальным скрепи: а — поверхность гидрофильного кремния, б — гидрофобная пленка золота на кремнии

и высушивания в токе азота. После этого адсорбированное на штампе вещество переносили на твердую поверхность гидрофильного кремния, приводя штамп в соприкосновение с модифицируемой поверхностью на 40—60 с.

В серии экспериментов на локально активированные БСА кремниевые поверхности сначала наносили по 50 мкл моноклональных антител (МАТ) 3F4 в ФСБ, рН 7,4, разведение 1:5000, обрабатывали 15 мин при комнатной температуре. БСА служил в качестве белка, промотирующего адсорбцию МАТ. Затем подложки тщательно промывали и высушивали на воздухе, как описано выше. Управляемую фиксацию PrP27-30 осуществляли последующей обработкой поверхности кремния, активированную МАТ, серийными десятикратными разведениями (от 10^{-2} до 10^{-9}) гомогенатов мозга сирийских хомяков с экспериментальной инфекцией скрепи до и после ферментативного переваривания протеиназой К (100 мкг/мл, 37°C, 1 ч). Отмывание и высушивание образцов проводили, как описано выше.

Эффективность взаимодействия иммобилизованных на поверхности МАТ 3F4 с PrP27-30 из гомогенатов мозга до и после ферментативной обработки протеиназой К (100 мкг/мл, 37°C, 1 ч) исследовали на участках между полосами БСА. В серии экспериментов ферментативное переваривание проводили непосредственно на поверхности гидрофильного кремния. Анализ образующихся макромолекулярных комплексов «антиген—антитело» на поверхности кремния проводили на воздухе в контактном режиме и режиме прерывистого контакта.

Установлено, что метод МКП обеспечил формирование однородных полос белка БСА на поверхности гидрофильного кремния. Причем эти полосы четко отличались от немодифицированных участков подложки, служащих поверхностью сравнения (рис. 3, а). Перепад высот у БСА при МКП составил $1,66 \pm 0,2$ нм.

БСА блокировал неспецифическую адсорбцию на модифицированной поверхности, что обеспечивало эффективную иммобилизацию МАТ в промежутки между полосами БСА. При анализе АСМ-изображений, полученных после иммобилизации МАТ на поверхность гидрофильного кремния, оказалось, что уровень полос иммобилизованных МАТ был лишь незначительно ниже уровня полос БСА ($\sim 0,1$ нм). После взаимодействия МАТ с PrP27-30 наблюдали узкие полосы белковых комплексов, превышающие уровень полос БСА в среднем на $1,6 \pm 0,2$ нм (рис. 3, б). Высота комплекса «МАТ+PrP27-30» составила в среднем $3,2 \pm 0,4$ нм.

Высокое пространственное разрешение и фазовый контраст были достигнуты в режиме прерывистого контакта, который позволил идентифицировать малые агрегаты, возможно индивидуальные молекулы (мономер) прионного белка, которые имеют Y-образную форму (рис. 3, в). Следует отметить высокую однородность полученных образцов (см. рис. 3, б) и отсутствие агрегатов PrP на поверхности. Можно допустить, что более крупные PrP-структуры удалялись с поверхности кремния при процедуре промывания образцов.

Установлено также, что PrP27-30 адсорбируется на полоски МАТ как из исходного гомогената, так и из растворов после их обработки протеиназой К. При этом комплексы удавалось наблюдать при разведениях образцов 10^{-2} , 10^{-4} и 10^{-6} , что превышает чувствительность метода ИБ на несколько порядков.

Факт выявления только малых агрегатов PrP, специфически связывающихся с МАТ, свидетельствует о том, что подобное взаимодействие может эффективно осуществляться в случае, когда PrP27-30 находится в состоянии близкой к мономерному и его вторичная и третичная структуры обеспечивают расположение активных антигенсвязывающих сайтов на поверхности глобулы, разрешающее специфическое связывание с антителом.

8 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

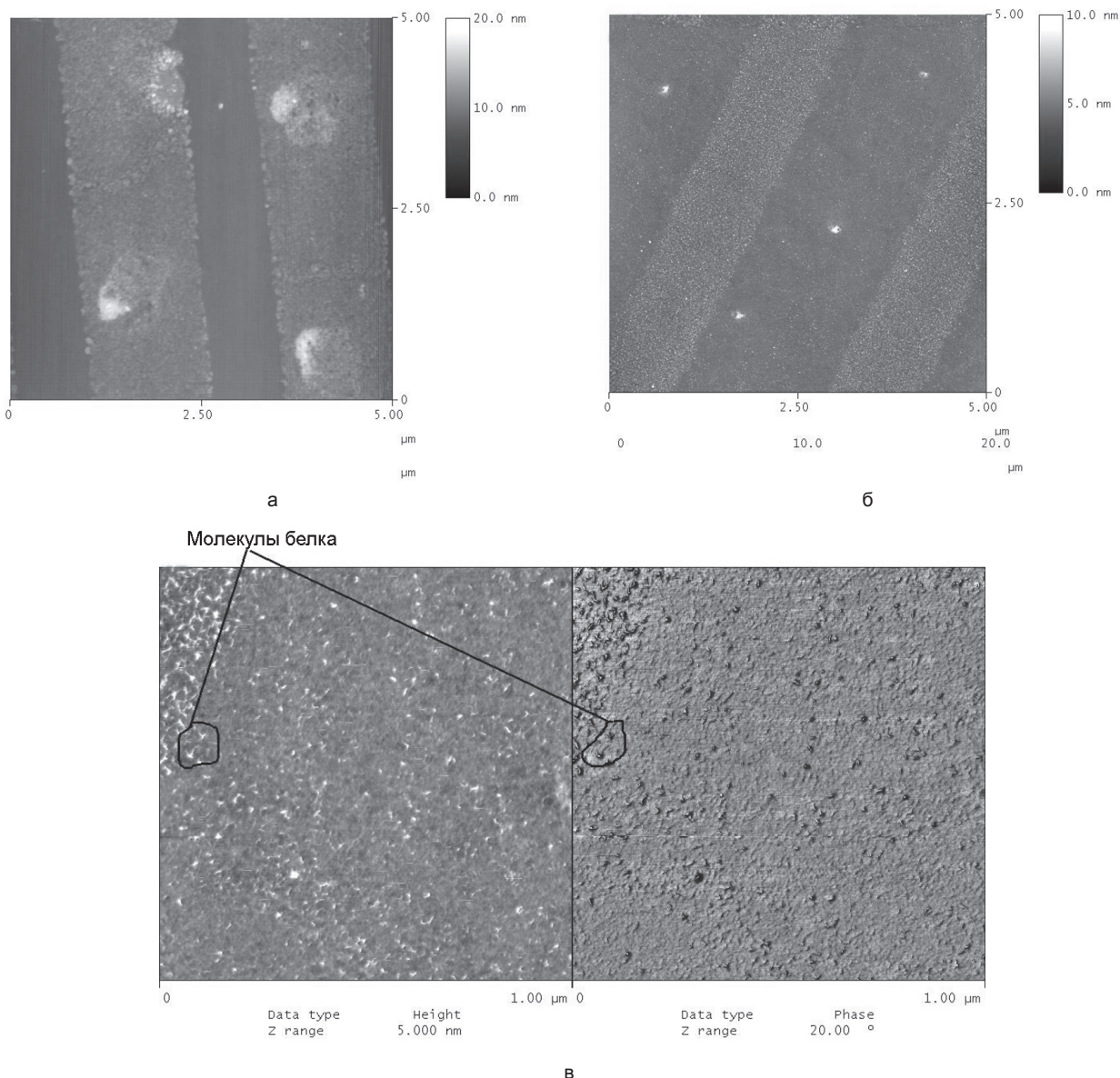


Рис. 3. Управляемая фиксация и идентификация PrP27-30 на локально активированной поверхности кремния: а — микроконтактная печать бычьего сывороточного альбумина на кремнии; б — последующая обработка микроструктурированной поверхности кремния антиприонными моноклональными антителами 3F4 и очищенной фракции прионного белка PrP27-30; в — АСМ-изображение высокого разрешения, видны индивидуальные молекулы PrP27-30 как на изображении топографии (слева), так и на изображении фазового контраста (справа)

Таким образом, примененные в настоящей работе нанотехнологические подходы к визуализации и идентификации амилоидных белковых агрегатов, позволили:

1) в очищенных фракциях PrP27-30 выявить и изучить различные пространственные структуры аномального инфекционного прионного белка, образованные возбудителем скрепи, на активированных подложках различной природы. Помимо глобулярных, палочковидных структур и скрепи-ассоциированных фибрилл, выявляемых ранее методом электронной микроскопии [1, 3, 6, 7], в условиях эксперимента были обнаружены трехлепестковые ассоциаты и кристаллические четырехлучевые структуры, образуемые прионным белком, для которых отмечена частичная устойчивость к ферментативной обработке

и с которыми связана инфекционность PrP27-30 для лабораторных животных;

2) реализовать условия концентрирования искомым прионных белков на заданных участках твердой поверхности, активированных специфическими моноклональными антителами. Высокую концентрацию PrP27-30 из образцов с низким содержанием прионного белка при адсорбции их на участке поверхности порядка 100 мкм (что более чем достаточно для дальнейших исследований с помощью АСМ) обеспечивает специфичность взаимодействия антиген—антитело. При этом немодифицированные участки служили поверхностью сравнения для оценки размеров анализируемых биообъектов;

3) показать, что использование метода локальной активации кремниевой поверхности специфическими

антителами позволяет проводить управляемую фиксацию PrP²⁷⁻³⁰ из анализируемой пробы на микронных участках поверхности, что может быть использовано для совершенствования исследований этиопатогенеза прионных болезней, в том числе и развития методов прижизненной диагностики прионных инфекций у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prusiner S. B. // *N. Engl. J. Med.*— 2001.— Vol. 344, № 20.— P. 1516—1526.
2. McKinley M. P., Prusiner, S. B. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*— 1991.— Vol. 172.— P. 75—91.
3. Iqbal K., Alonso Adel C., Chen S., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2005.— Vol. 1739, №№ 2—3.— P. 198—210.
4. Chun W., Johnson G. V. // *Front. Biosci.*— 2007.— Vol. 12.— P. 733—756.
5. Gajdusek DC. // *Virology* / Ed. B. N. Field, D. M. Knipe, R. M. Chanock, et al. — NY, 1990.— P. 2289—2324.
6. Safar J. G., Geschwind M. D., Deering C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*— 2005.— Vol. 102.— P. 3501—3506.
7. Lasmezas C. I., Weiss S. // *Microbial Foodborne Diseases: Mechanisms of Pathogenesis and Toxin Synthesis* / Ed. J. W. Cary, J. E. Linz, D. Bhatnagar.— Lancaster, 2000.
8. Anderson M., Bocharova O. V., Makarava N., et al. // *J. Mol. Biol.*— 2006.— Vol. 358.— P. 580—596.
9. Капитулец С. П., Полещук Н. Н., Красочко П. А. // *Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария.*— 2006.— № 2.— С. 18—26.
10. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* — Washington, D. C, 1996.
11. Hillmert H., Diring H. // *Biosci. Rep.*— 1984.— Vol. 4.— P. 165—170.
12. Полещук Н. Н., Капитулец С. П., Капитулец Н. Н. и др. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.*— 1993.— № 10.— С. 409—412.
13. Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth D. F., et al. // *Ann. Neurol.*— 1982.— Vol. 11.— P. 353—358.
14. Laemmli U. K. // *Nature (London).*— 1970.— Vol. 227.— P. 680—685.
15. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 1979.— Vol. 76.— P. 4350—4354.

NANOTECHNOLOGIC APPROACHES TO VISUALIZATION AND IDENTIFICATION OF AMYLOID AGGREGATES

S. P. Kapitulets, G. K. Zhavnerko, N. N. Kapitulets, I. V. Paribok, O. I. Nichiporuk, N. N. Poleshchuk

Objective. To optimize the atomic-powdered microscopy (APM) for visualizing and identifying PrP structures in PrP^{Sc} purified fractions.

Materials and methods. Five Syrian gold yellow hamsters were infected with scrapie (263K strain) experimentally. Infectious material was taken in the animals infected during the disease terminal stage. The prion protein (PrP 27-30) abnormal protease resistant isoforms were separated and purified by H. Hilmert and H. Diring the method being modified by the authors (1984). PrP 27-30 was identified in the purified brain fraction electrophoresis in 12% polyacrylamide gel and in the immune blotting, the PrP 27-30 infectivity was determined in bioassays on animals. The PrP structures were visualized and the PrP 27-30 was identified in the atomic-powdered microscopy (APM) on the locally activated silicon surface and on the gold film on silicon.

Results. Various space PrP structures were studied in the PrP 27-30 purified fraction: three-petal associates and crystal four-ray structures. Their partial resistance to enzymic proteinase K treatment and infectivity for laboratory animals was shown. The technology of the hydrophilous silicon surface local activation by microcontact printing with bovine albumin promoting absorption of anti-prion monoclonal 3F4 antibodies was finished. It was shown that the silicon surface local activation by specific antibodies allowed controlled fixation of PrP 27-30 from the sample assayed on the surface micron sites.

Conclusion. The results obtained may be used for improving the studies of conformational diseases etiopathogenesis including development of methods for the prion caused diseases intravital diagnosis in human being.

Key words: conformational diseases, amyloid structures, abnormal protease resistant prion protein, atomic-powdered microscopy, silicon surface locally activated.

Адрес для корреспонденции:

Капитулец Сергей Петрович.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 268-00-38.

Л. Д. ГАЗИУМАРОВА, Л. П. ТИТОВ

ЛИСТЕРИОЗ: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ЭТИОПАТОГЕНЕЗ И МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

С конца 1980-х годов в ряде стран Европы и Америки были зарегистрированы многочисленные вспышки листериоза у людей, которые характеризовались тяжелым течением и высокой летальностью. Поэтому проблема пищевого листериоза, помимо медицинского, приобретает существенное социально-экономическое значение. Научный интерес к листериям связан с тем, что эти бактерии стали одной из наиболее популярных моделей для изучения внутриклеточного паразитизма.

Подробно описываются данные Центров по контролю и профилактике заболеваний листериозом, о причинах возникновения этой инфекции, путях передачи, факторах патогенности, методах лабораторной диагностики.

Ключевые слова: листериоз, культивирование, выделение, методы индикации и идентификации возбудителя, экспресс-диагностика.

Несмотря на успехи, достигнутые в борьбе с инфекционными болезнями, уровень заболеваемости в мире остается высокими. Наряду с открытием целого ряда неизвестных ранее инфекционных агентов, наблюдается повышение роли и удельного веса хорошо известных возбудителей. Некоторые их виды, еще недавно считавшиеся сапрофитными, сегодня перешли в группу условно-патогенных, причем зачастую полирезистентных бактерий, которые способны приобретать свойства патогенности. К таким возбудителям в полной мере можно отнести факультативно-анаэробные микроорганизмы — листерии, роль которых в патогенезе человека возрастает из года в год. До 80-х годов XX века листериоз рассматривался как типичный зооноз с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя [1, 2]. Возбудители выделены от более 90 видов диких и домашних животных, птиц, рыб, насекомых и клещей. В 1929 г. листерии впер-

вые обнаружены у больных людей, а также у овец — одного из основных хозяев листерий, с которыми контактирует человек [3].

Внимание к этой инфекции возросло после расщифровки в конце прошлого столетия вспышек пищевого листериоза у людей с летальностью до 33—41% в США, Канаде, Мексике, Франции, Израиле, Испании, Италии, Швейцарии, Франции, Великобритании.

В настоящее время в США и странах Европы осуществляется мониторинг за лабораторно подтвержденными случаями инфекции. В 2004 г. в США листериоз выявлялся с частотой 0,27 случая на 100 000 населения или 2,7 на 1,0 млн [4]. В штате Калифорния частота инфекции в 2004—2006 гг. составила 0,34 на 100 000 населения. Наиболее высокая частота инфекции выявлена у новорожденных детей в возрасте до 1 мес и у взрослых старше 60 лет. Около 30% от всех случаев листериоз регистрируется у беременных женщин, 60% случаев заболевания выявляется у лиц в возрасте от 10 до 40 лет. Риск возникновения инфекции у женщин в 3,6 раза выше, чем у мужчин (0,25 против 0,07 на 100 000 населения). Примерно в 15—25% случаев инфекции у беременных отмечаются выкидыши и мертворождения, в 5% — бактериемия. Большинство случаев заболевания возникает спорадически, хотя все чаще описывают крупные вспышки листериоза, обусловленные употреблением в пищу контаминированных бактериями пищевых продуктов. При этом частота случаев инфекции возрастает до 5,0 на 100 000 населения. В Европе неперинатальная листериозная инфекция встречается с частотой 0,1—1,0 случай на 100 000 населения (Израиль — 0,6; Финляндия — 0,09—0,65; Испания — 1,1; Англия — 0,35). Крупнейшей и наиболее известной является вспышка листериоза, возникшая в 1985 г. в Лос-Анджелесе (США), которая была связана с употреблением в пищу сычужного мексиканского сыра, контаминированного *L. monocytogenes*. Всего было зарегистрировано 142 больных, из них 48 — со смертельным исходом, 130 — с перинатальной и неонатальной патологией.

По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (СДС, США), 11% от всех продуктов, хранящихся в домашних холодильниках, контаминированы листериями. В 33% случаев выделенные штаммы *L. monocytogenes* от больных, а также из продуктов, хранившихся в холодильнике, имели идентичный молекулярно-генетический профиль при регистрационном анализе пульс-электрофорезом. Поэтому проблема пищевого листериоза, помимо медицинского, приобретает и существенное социально-экономическое значение. Изъятие зараженных партий продуктов из торговли, ограничение их вывоза, остановка производства наносят значительный ущерб в сотни млн долларов США странам-экспортерам сыра и мясных продуктов [5, 6]. В 2006 г. листериоз был зарегистрирован в 23 странах Европейского Союза. Среди зоонозных инфекций листериоз занимает 5-е место по частоте высеваемости, уступая кампилобактериозу, сальмонеллезу, иерсиниозу и веротоксигенному эшерихиозу [7].

В Республике Беларусь статистические данные по заболеваемости листериозом практически отсутствуют. В ряде микробиологических лабораторий (РНПЦ ЭМ, ГЦГЭ, детская и взрослая инфекционные больницы Минска, Гродненской областной центр гигиены и общественного здоровья и др.) выделены патогенные штаммы листерий, что указывает на их циркуляцию и необходимость проведения мониторинга данной инфекции. В пользу этого свидетельствует стабильно высокая заболеваемость ОКИ, значительный процент которой неустановленной этиологии.

Кроме того, среди причин младенческой смертности в Республике Беларусь от 2 до 4% составляют преждевременные роды. По данным главного акушера-гинеколога Минздрава Республики Беларусь А. Н. Барсукова, в 70% причиной преждевременных родов являются инфекции половых путей у женщин. Среди 30% новорожденных, погибших от инфекций в перинатальный период, в 70% случаев последняя остается неуточненной. С целью изучения роли анаэробных инфекций у беременных предусматривается проведение пилотного исследования на наличие у них патогенной флоры. Это позволит определить клиническое значение данной инфекции с последующей выработкой рекомендаций по снижению частоты преждевременных родов.

Следует также отметить, что с целью повышения качества продовольственного сырья, обеспечения его экспорта постановлением Минздрава Республики Беларусь № 63 регламентировано определение листерий в более чем 100 наименованиях отечественных продуктов [8].

Таксономия и биологические свойства возбудителя. Листерии получили название в честь шотландского хирурга Д. Листера. Род *Listeria* включает 6 видов — *L. monocytogenes* (типовой вид, описан М. Хамфесом в 1911 г.), *L. ivanovi* (подвиды *ivanovi* и *londoniensis*), *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*. *L. monocytogenes* вызывает заболевание у человека, *L. ivanovi* — у животных.

Это небольшие палочковидные бактерии, имеющие тенденцию формировать короткие цепочки из 3—5 и более клеток. Грамположительны, в старых культурах могут быть грамтрицательными и иметь коковидную форму. Спор не образуют, способны формировать капсулу. Факультативные анаэробы или микроаэрофилы с перитрихально расположенными жгутиками подвижны при культивировании при 20—25°C. Микроорганизмы способны расти и удваивать их количество при температуре -4°C в условиях холодильника в течение 2 дней. Данные свойства способствуют длительному сохранению и размножению микроба в пищевых продуктах как факторах передачи инфекции. При 37°C выявляется наличие лишь малочисленных жгутиков или их отсутствие, что приводит к снижению или утрате подвижности. Листерии ферментируют глюкозу, каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Из глюкозы и некоторых других углеводов образуют кислоту (но не газ!), гидролизуют эскулин. Мочевину, желатин, казеин и молоко не гидролизуют.

На основе различий в строении соматического O-антигена и жгутикового H-антигена виды листерий подразделяются на серотипы. Для *L. monocytogenes* характерны следующие антигены — 1/2a, 1/2b, 1/2c; 3a, 3b, 3c; 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e и 7. У человека заболевание наиболее часто вызывают серотипы 1/2a, 1/2b и 4b. Вспышки инфекции обычно обусловлены штаммами, принадлежащими к серовару 4b.

Факторы вирулентности. *L. monocytogenes* — внутриклеточный патоген, выживает и размножается в цитоплазме фагоцитов и других клеток, ускользая, таким образом, от воздействия бактерицидных систем хозяина. Известен ряд биологически активных молекул и поверхностных белков листерий, играющих важную роль на различных этапах взаимодействия микроба с эукариотической клеткой (табл. 1).

Лучше всего изучен листериолизин O — поробразующий тиолзависимый гемолизин с молекулярной массой 58 кДа. Листериолизин («главный фактор» патогенности листерий) обладает выраженным токсическим эффектом при заражении лабораторных животных, вызывая их гибель. При взаимодействии с эукариотической клеткой листериолизин O участвует в лизисе вакуоли (первичной и вторичной), обеспечивая свободное деление листерий в цитоплазме.

Фосфатидилхолин — специфическая фосфолипаза C — участвует в лизисе мембраны первичной вакуоли вместе с листериолизином O. Фермент видоспецифичен для *L. monocytogenes*, кроме того, он участвует в лизисе вторичной вакуоли и обеспечивает высвобождение бактерий из фагосом. Помимо более изученной мембранолитической функции перечисленных ферментов имеются данные об их регуляторной функции на уровне сигнальной трансдукции мембранных белков эукариотической клетки. Так, благодаря металлопротеазе — полипептиду с молекулярной массой около 60 кДа, неактивная форма переходит в активную. На этапах инвазии важную роль играют поверхностные белки-интернарины, которые богаты лейцином и облегчают поглощение микроба фагоцитами: интерналин A участвует в проникновении в эпителиальные клетки; интерналин B необходим для инвазии в гепатоциты.

Способность листерий индуцировать полимеризацию актина обеспечивает возможность активного движения возбудителя по цитоплазме клетки, а также переход в соседние клетки. В этом процессе участвует поверхностный белок actA, индуцирующий полиме-

ризацию актина. Продавливание мембраны клеток позволяет патогенным листериям преодолевать барьеры слизистой оболочки кишечника, избегая контакта с антителами, компонентами системы комплемента и фагоцитами. Мигрируя в кровяное русло, возбудитель может перемещаться в различные отдаленные от первичного очага места, поражая преимущественно мозг и плаценту.

Генетический контроль вирулентности. Гены, кодирующие факторы вирулентности, расположены на фрагменте хромосомы размером около 10 тыс. пар нуклеотидов. Функционально они объединены в 4 оперона, транскрипция которых полностью или частично находится под контролем регуляторного белка P₂fA [9]. Гены патогенности листерий активируются, по-видимому, только при получении сразу нескольких внешних сигналов, свидетельствующих о попадании возбудителя в эукариотический организм [10].

Патогенез и клинические проявления. Патогенез листериоза до конца не изучен, безусловную роль играют свойства возбудителя. Чаще всего выделяют типы возбудителя, вызывающие конкретные формы поражений — локальные поражения, железистые лихорадки (лимфадениты), гемогенные, лимфогенные и неврологические расстройства, а также способность к факультативному внутриклеточному паразитизму.

Воротами инфекций является слизистая оболочка органов желудочно-кишечного тракта. Возможно проникновение возбудителя через миндалины, о чем свидетельствуют случаи развития специфического тонзиллита и поражения региональных лимфатических узлов. Для развития манифестной формы инфекции большое значение имеет состояние иммунной системы.

Для листериоза характерен широкий спектр клинических проявлений. На рис. 1 представлена схема этиопатогенеза листериоза, которая включает факторы риска и передачи инфекции, патофизиологические аспекты листериоза у взрослых и новорожденных, а также признаки и симптомы инфекции у взрослых.

Инфекция у беременных, плода и новорожденных. Передача листериозной инфекции осуществляется половым путем; доказано внутриутробное заражение плода или новорожденного от больной матери. Листериозная инфекция может развиваться на протяжении всего периода беременности, хотя большая часть случаев приходится на III триместр.

Таблица 1

Факторы патогенности *L. monocytogenes*

Белок	Молекулярная масса, кДа	Ген	Функция
Prfa	27	<i>prfa</i>	Регуляция транскрипции генов вирулентности
Листериолизин O	58	<i>hly</i>	Лизис первичной и вторичной фагосом
PICA (фосфатидилинозитол-специфичная фосфолипаза C)	33	<i>plcA</i>	Лизис фагосомы, гемолиз
Лецитиназа	33	<i>plcB</i>	Лизис вторичной фагосомы
Металлопротеаза	56	<i>mpl</i>	Посттрансляционная модификация лецитиназы
ActA	67	<i>actA</i>	Полимеризация актина
Интерналин, InlB	88,65	<i>inlA, inlB</i>	Индукция фагоцитоза

12 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

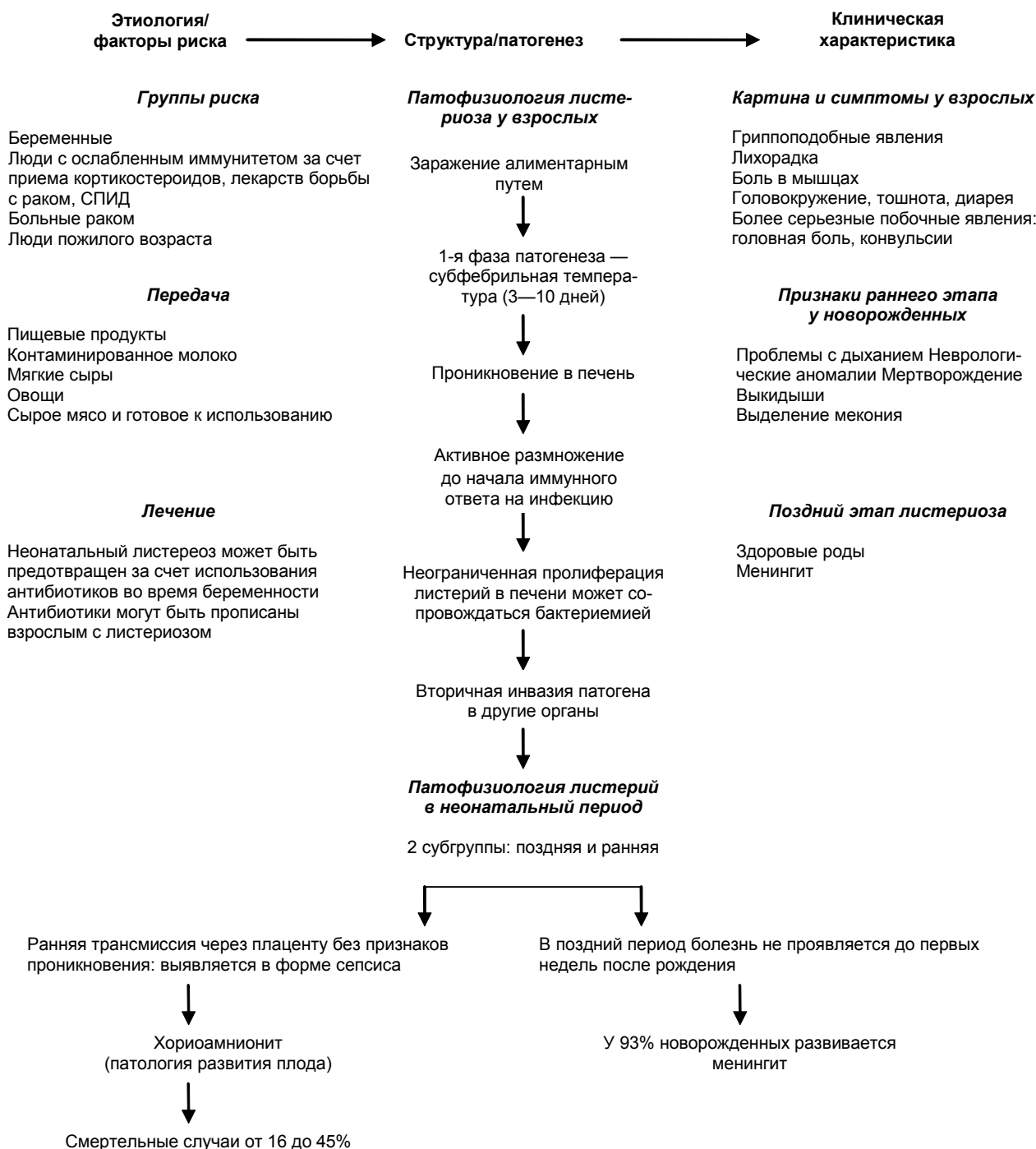


Рис. 1. Этиопатогенез листериоза у взрослых и новорожденных

При внутриутробном инфицировании листериями развивается септический гранулематоз. Дети рождаются недоношенными с симптомами пневмонии, лихорадкой, одышкой, заложенностью носа, цианозом, нарушением проходимости бронхов и гнойного плеврита. Часто отмечается развитие желтухи, реже — увеличение селезенки. Листериоз новорожденных протекает тяжело.

Менингиты. Немаловажна роль листерий как возбудителей оппортунистической инфекции. Частота случаев листериоза не уступает, а по данным ряда

исследователей, превосходит таковую при перинатальной и неонатальной патологии. Чаще всего выявляют клинические формы, связанные с поражением центральной нервной системы, проявляющиеся менингитом или менингоэнцефалитом. Заболевание характеризуется лихорадкой, возможно развитие лимфаденита и конъюнктивита.

Бактериемия и эндокардиты. При попадании возбудителя в кровь возникают острые лихорадочные заболевания. В дальнейшем происходит фиксация возбудителя в ретикулоэндотелиальной системе

(печень, селезенка, лимфатические узлы) и в нервной системе с развитием менингитов и менингоэнцефалитов.

По характеру проявлений наблюдают следующие клинические формы: ангинозно-септическую, септико-тифозную, септико-гранулематозную и др. Прогноз заболевания серьезный — до 30% случаев листериоза у взрослых заканчивается фатально. Ангинозно-септический листериоз может осложняться эндокардитом. Эндокардиты составляют 5—10% от всех случаев листериозной инфекции у взрослых.

Гастроэнтерит. Острый гастроэнтерит описывают при эпидемических вспышках листериозного сепсиса и при поражении нервной системы.

Листериоз у лиц с иммуносупрессией. В последние 10—15 лет наиболее значительный рост случаев листериоза отмечается у лиц пожилого возраста на фоне сопутствующих заболеваний, иммуносупрессивной терапии. Выявляются такие клинические проявления листериоза, как инфекция кожи, абсцессы печени и селезенки, пневмония, миокардит, остеомиелит, воспаление суставов и др.

Листериоз у онкологических больных. Наиболее часто листериоз развивается на фоне онкологических заболеваний, почечной или сердечной недостаточности, диабета. Листерии не являются ведущими возбудителями при ВИЧ-инфекции, но у этой группы пациентов листериоз встречается в 150—300 раз чаще, чем в общей популяции [10, 11]. Разнообразные клинические проявления листериоза при лимфомах, СПИДе, беременности, иммуносупрессивной терапии наряду с экспериментальными данными подтверждают ведущую роль клеточного иммунитета в развитии листериозной инфекции [12—14]. Это говорит о значимости данного микроорганизма в инфекционной патологии человека, его возрастающей роли в диагностике заболеваний и необходимости изучения его биологии и факторов патогенности.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Диагностика листериоза основывается на клинической картине, данных эпидемического анамнеза (контакт с животными) и бактериологии. Но решающее значение имеют результаты бактериологических, серологических и молекулярно-генетических методов

исследования, составляющие основу идентификации и типирования этих микроорганизмов (рис. 2).

Материалом для исследования являются кровь, СМЖ, слизь из зева, пунктаты увеличенных лимфатических узлов, у новорожденных дополнительно — меконий, пупочная кровь; секционный материал (кусочки мозга, селезенки, лимфатические узлы). Кровь и СМЖ засевают на плотные среды (глюкозо-печеночный или кровяной агар с глюкозой). Выросшие колонии отбирают для дальнейших исследований по наличию гемолитической активности на средах с кровью или по способности приобретать сине-зеленую окраску при косом освещении. Однако выделение возбудителя из клинического материала и продуктов питания оказалось малоэффективным без селективных компонентов и методов. Поэтому в 80-е годы были созданы селективные среды и методы, значительно повышающие эффективность выделения и сократившие сроки идентификации листерий. Схемы выделения листерий в зависимости от степени контаминации и количества микробных тел в исследуемом материале включают либо непосредственный высеv на селективный агар, либо обогащение исследуемого образца на селективном бульоне с последующим высеvом на селективный агар.

Для дифференциации листерий с помощью биохимических методов исследования особое значение имеют тесты, позволяющие идентификацию *L. monocytogenes* совместить с дифференциацией от других непатогенных для человека видов (табл. 2). *L. monocytogenes* образует рамнозу и не утилизирует ксилозу и манит, обладает β-гемолитической активностью на кровяном агаре. Информативен CAMP-тест, в котором культура *L. monocytogenes* дает положительную реакцию, образуя зону усиления гемолиза с гемолитическим штаммом *Staphylococcus aureus* и в большинстве случаев отрицательную с *Rhodococcus equi* на чашках с кровяным агаром.

Одним из доступных и простых методов индикации и идентификации возбудителя листериоза является реакция агглютинации. Качество агглютинирующей сыворотки зависит от высокоактивной схемы специфической иммунизации животных. Наиболее результативна схема иммунизации, предусматривающая 3 способа введения антигена: внутривенный, в подушечки лап, в лимфатические узлы.

Таблица 2

Дифференциация *L. monocytogenes* от других видов листерий

Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovi</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
Ферментация:							
маннитола	-	-	-	-	-	+	+
D-ксилозы	-	+	+	-	+	-	-
L-рамнозы	+	-	-	d	d	±	d
β-гемолиз	+	+	+	-	-	-	-
CAMP-тест							
<i>Rhodococcus equi</i>	±	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-
Патогенность для человека	Высокая	Низкая	Низкая	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

14 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

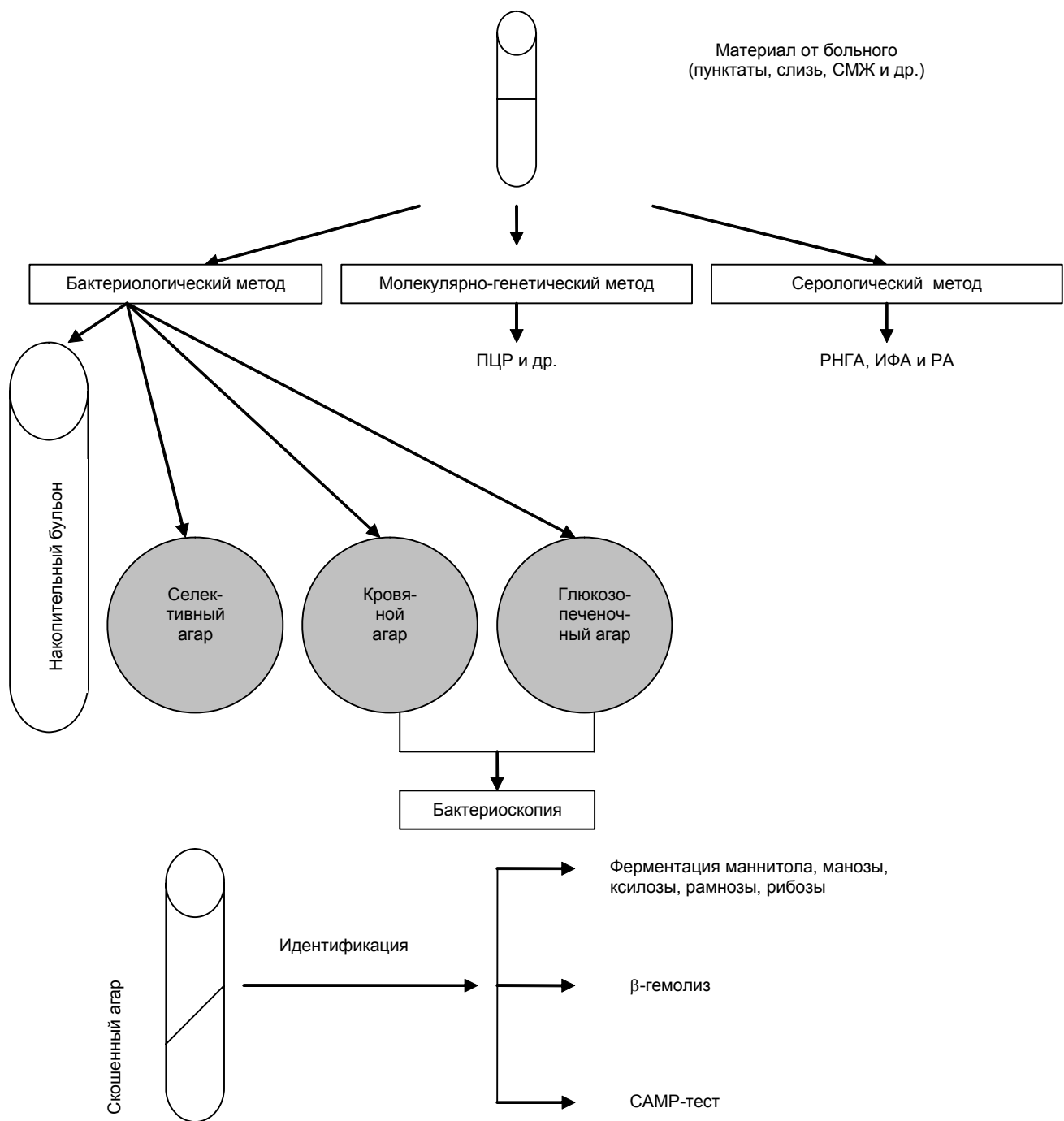


Рис. 2. Схема диагностики листерий

Важным достоинством этой схемы является непродолжительность периода иммунизации животных-продуцентов, который составляет 17—18 дней, атравматичность для них, получение высоких титров специфических антител (до 1:320) — 1—6400. Специфичные полигрупповые листериозные сыворотки были получены после проведения иммуносорбции с помощью твердофазных ПААГ-сорбентов [15].

До сих пор остаются актуальными и широко используются простые, достаточно чувствительные, не требующие применения специальной аппаратуры и потому общедоступные серологические тесты, в част-

ности, РНГА. Однако анализ серологической структуры листерий показал, что она крайне неудобна для диагностики. Серотипы листерий не являются видоспецифичными. Они могут быть общими для разных видов листерий, независимо от их патогенности для человека. Тем не менее в практике отечественных бактериологов серологические методы остаются основными. Они чаще используются как методы лабораторной диагностики листериоза. Наиболее перспективным для серологической диагностики представляется определение антител к секретлируемому фактору патогенности листерий — листериозину O. Но даже

эту более специфичную методику авторы рекомендуют использовать только для выявления неинвазивных бессимптомных форм болезни при эпидемических вспышках листериоза.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ЛИСТЕРИЙ

Для ускоренной идентификации листерий используют идентификационные системы «APJ Listeria» («Биомерье», Франция) и их аналоги. Большое внимание уделяется молекулярному типированию штаммов *L. monocytogenes*. Применение пульс-электрофореза и полимеразной цепной реакции представляется наиболее перспективным для типирования вирулентных штаммов листерий, хотя их использование в рутинной бактериологической практике ограничено.

Определенное значение для клинической диагностики листериоза имеют автоматизированные идентификационные системы, в которых инкубация в бульоне сочетается с биохимической и биофизической идентификацией возбудителя. Однако идентификация *L. monocytogenes* требует специальной программы, соответствующей питательной среды, особого внимания к результатам утилизации углеводов и т. д. Поэтому и здесь приоритет принадлежит классической бактериологии, хотя в дальнейшем поиск новых высокоспецифичных антигенных и нуклеотидных маркеров может изменить ситуацию.

Приведенные данные свидетельствуют о «многоликой» роли листерий в инфекционной патологии человека и необходимости дальнейшего совершенствования санэпиднадзора и лабораторной диагностики данной инфекции. За рубежом для этих целей используют комплекс препаратов, выпускаемых различными фирмами. У нас в стране отсутствуют препараты для диагностики листериоза как культуральным методом, так и с помощью тест-систем.

Быстрый прогресс в этой области может быть достигнут в результате объединения усилий бактериологов, эпидемиологов и специалистов в области гигиены питания по следующим ключевым направлениям:

1) налаживание производства отечественных селективных сред накопления и выделения листерий, а также других реагентов, необходимых в современных схемах диагностики этой инфекции;

2) регламентация общепринятых, налаживание мониторинга за случаями инфекции и новых методов выделения и идентификации возбудителя соответствующими документами Министерства здравоохранения Республики Беларусь;

3) осуществление комплекса мероприятий по профилактике листериоза у беременных и новорожденных, включающих бактериологическое обследование на листериоз, особенно в случаях отягощенного акушерского анамнеза, выполнение рекомендаций по

питанию, проведение мониторинга за листериями в акушерских стационарах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных: Сборник сан.-вет. правил.— М., 1996.
2. Schuchat A., Swaminathan B., Broome C. V. // *Clin. Microbiol. Rev.*— 1991.— Vol. 4.— P. 169—183.
3. Gray M. L. // *Bact. Rev.*— 1966.— Vol. 30.— P. 309—382.
4. CIDRAP [Электронный ресурс]: Center for Infectious Disease Research and Policy. — Режим доступа: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/food-disease/causes/listeriaview.html>.
5. Карликанова Н., Куваева И., Карликанова Г. Листерии в молоке и молочных продуктах.— М., 1999.
6. Костенко Ю. Г., Шагова Т. С., Янковский К. С. // *Мясная индустрия.*— 1997.— Т. 3.— С. 23—24.
7. Denny J., Me Lauchlin J. // *Eurosurveillance.*— 2008. — Vol. 13, № 13.— P. 53—55.
8. Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 63 от 9.06.2009 «Об утверждении Санитарных правил и гигиенических нормативов “Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов”».— Минск, 2009.
9. Ермолаева С. А., Белый Ю. Ф., Тартаковский И. С. // *Мол. ген. микробиол. вирусол.*— 2000.— Т. 1.— С. 17—19.
10. Farber J. M., Peteslrin P. J. // *Microbiol Rev.*— 1991.— Vol. 55.— P. 476—511.
11. Lorber B. // *Clin. Infect. Dis.*— 1996.— Vol. 24.— P. 1—11.
12. Тартаковский И. С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Медицина для всех.— М., 2002.
13. Kaufmann S. H. // *Immun. Intracell. Bacteria.*— 1993.— Vol. 11.— P. 129—163.
14. Пронин А. В., Белый Ю. Ф., Тартаковский И. С. и др. // *Журн. микробиол.*— 1996.— № 7.— С. 53—56.
15. Алиева Е. В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммуно-диагностических препаратов для выявления возбудителя листериоза: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 2008.

Поступила 18.07.11.

LISTERIOSIS: EPIDEMIOLOGY, ETIOPATHOGENESIS, AND METHODS OF LABORATORY DIAGNOSIS

L. D. Gaziumarova, L. P. Titov

Since 1980th numerous outbreaks of listeriosis characterized by a severe course and high lethality have been registered in people in a number of European and American countries. Thus, the problems associated with food listeriosis acquire a substantial social and economic significance in addition to the medical one. The scientific aspect of the interest to listeria is caused with the fact that those bacteria have become a most popular model for studying the intracellular parasitism. The data of the centers for listeriosis control and prevention are described in detail, the causes of that infection appearance, the routes, the pathogenicity factors, the methods of the laboratory diagnosis are presented.

Key words: cultivation, separation, methods of the pathogenic agent indication and identification, express-diagnosis.

Адрес для корреспонденции:

Газиумарова Людмила Дмитриевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-80-64.

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

ВИДОВАЯ СТРУКТУРА И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Проведен отбор множественно резистентных возбудителей гнойно-септических инфекций в стационарах республики, осуществлена верификация устойчивости/чувствительности к антимикробным препаратам. Определены минимальные ингибирующие концентрации наиболее часто применяемых антибиотиков. Определен удельный вес грамположительных и грамотрицательных бактерий в этиологической структуре бактериальных гнойно-септических инфекций в медицинских учреждениях. Для проведения комплекса мероприятий по снижению антибиотикорезистентности штаммов возбудителей необходимо осуществлять мониторинг клинически значимых микроорганизмов и контроль за устойчивыми штаммами, изучать особенности эпидемического процесса при внутрибольничных инфекциях, определять резерв антимикробных препаратов.

Ключевые слова: возбудители гнойно-септических инфекций, антибиотикорезистентность, мониторинг.

Во всем мире отмечается рост устойчивости возбудителей гнойно-септических инфекций (ГСИ) к антибактериальным препаратам и их распространение в популяции человека. Возникновение антимикробной резистентности микроорганизмов является естественным биологическим ответом на широкое и нерациональное использование антимикробных препаратов (АМП), что искусственно создает селективные условия, способствующие отбору, выживанию и размножению устойчивых штаммов микроорганизмов [1]. Естественно, что высокий уровень резистентности возбудителей ГСИ к антибиотикам, неэффективность применяемых режимов антимикробной терапии и развитие осложнений имеют огромное социально-экономическое значение. В 2001 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) был принят и опубликован первый официальный документ «Глобальная стратегия по сдерживанию антимикробной резистентности», 7 апреля 2011 г. впервые был проведен Всемирный день здоровья, посвященный борьбе с распространением резистентности микроорганизмов под девизом «Если не принять меры сегодня, нечем будет лечить завтра». С таким предостережением выступила Ж. Якаб, директор Европейского регионального бюро ВОЗ при ООН. Необходимость борьбы с формированием и распространением антимикробной резистентности признана ВОЗ, государствами Евросоюза, Северной Америки, Японии и является приоритетной задачей во всех странах мира.

При планировании политики антибиотикотерапии в стране и конкретном учреждении здравоохранения рационально опираться на научно обоснованные данные мониторинга устойчивости микроорганизмов, вызывающих ГСИ у пациентов, проживающих в кон-

кретной области, районе и получающих антибиотикотерапию в специализированных отделениях стационара (отделение интенсивной терапии, хирургии, пульмонологии, урологии, гинекологии и др.) [2]. Для осуществления эффективного микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за распространением и циркуляцией возбудителей ГСИ в учреждениях здравоохранения (УЗ), начиная с 2003 г., ежегодно проводится анкетирование опорных баз Национального референс-центра по мониторингу резистентности к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам клинически значимых микроорганизмов и сбор культур микроорганизмов от пациентов. В референс-центре проводится углубленный анализ биологических свойств возбудителей, выделенных от пациентов в регионах (учитываются различные типы стационаров, нозологические формы заболеваний и локализация патологического процесса).

Целью данной работы явилось изучение этиологической структуры и антибиотикорезистентности микроорганизмов, выделяемых от больных в стационарах республики.

Материал и методы

Клинический материал от пациентов, находящихся на лечении в многопрофильных стационарах, забирали в соответствии с общепринятыми правилами (работали бактериологи региональных УЗ). Выделенные из биологического материала штаммы микроорганизмов доставляли в лабораторию клинической и экспериментальной микробиологии (референс-центр) РНПЦ микробиологии и эпидемиологии, где проверяли чистоту выделенных культур, проводили их реидентификацию и определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИК) широкого спектра антибиотиков. Депонирование выделенных культур в коллекцию бактерий проводили параллельно на полужидком МПА при +5°C и в мясопептонном бульоне с 15% глицерина в замороженном состоянии при -20°C.

Часть информации о спектре выделяемых при ГСИ микроорганизмов и резистентности к антибиотикам получена путем анализа баз данных, полученных с помощью автоматических анализаторов «Vitek 2 Compact» («BioMerieux»).

Определение антибиотикочувствительности идентифицированных микроорганизмов проводили диффузионным методом и методом серийных разведений на среде Мюллера—Хинтона в соответствии с инструкцией «Методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» 2009 г. Верификацию видовой принадлежности выделенных микроорганизмов и подтверждение антибиотикочувствительности осуществляли на микробиологическом анализаторе «Vitek 2 Compact» («BioMerieux»).

Результаты исследований обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Спектр и структура возбудителей ГСИ. Было исследовано 800 изолятов. Данные по определению удельного веса основных таксономических групп бактерий в этиологической структуре ГСИ учреждений здравоохранения страны представлены на рис. 1. Почти в половине случаев (48%) ГСИ вызывают представители семейства энтеробактерий, 2-е место занимают стафилококки (21%), НГОБ составляют 22%, в том числе бактерии рода *Acinetobacter* — 14%, *Pseudomonas* — 8%.

В структуре энтеробактерий преобладают клебсиеллы (48,5%) и кишечная палочка (25,5%). Меньшую значимость по частоте обнаружения имеют энтеробактер, протей, цитробактер, серрации и морганеллы. Редко (менее 1% в структуре) выделяются бактерии родов *Pantoea spp.*, *Providencia spp.*, *Hafnia spp.*, *Kluuvera spp.* (рис. 2).

Среди стафилококков в этиологии ГСИ преобладает *Staphylococcus aureus* (50%). Из коагулазоотрицательных стафилококков ведущую роль играют эпи-

дермальный и гемолитический стафилококки, удельный вес которых суммарно составляет 37% (рис. 3).

Инфекции, вызванные ацинетобактером, весьма актуальны в настоящее время в связи с трудностью их терапии. В видовой структуре этих бактерий ведущую роль играет *Acinetobacter baumannii* (97,6%). Другие виды ацинетобактерий (составляют 2,4%), выделяемых при ГСИ, представлены *A. Iwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. ursingii*. Из представителей НГОБ наибольшую актуальность имеют бактерии рода *Pseudomonas* — возбудители ГСИ, преобладает синегнойная палочка — *P. aeruginosa* (96,5%). Другие виды псевдомонад выделяются значительно реже и составляют 3,5% от общего числа бактерий рода *Pseudomonas*.

Уровни антибиотикорезистентности возбудителей ГСИ. Был проведен анализ устойчивости к антимикробным препаратам основных возбудителей гнойно-септических инфекций. Результаты тестирования фенотипической антибиотикорезистентности клинически значимых штаммов бактерий, выделенных от больных с ГСИ в бактериологических лабораториях УЗ в 2010 г., представлены ниже.

Штаммы золотистого стафилококка характеризуются очень высокой частотой устойчивости к бензилпенициллину — 91% (табл. 1).

Резистентность к оксациллину составила 40%. Таким образом, 40% штаммов являются клинически устойчивыми ко всем β-лактамам антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам) независимо от результатов определения чувствительности к этим антибиотикам *in vitro*. Устойчивыми к макролидам (эритромицин) были 45% культур, к линкозамидам (клиндамицин) — 27%, к аминогликозидам (гентамицин) — 38%, тетрациклином — 29%. В семействе фторхинолонов наибольшую активность к *S. aureus* проявил моксифлоксацин (чувствительными были 81% культур). Анализ распределения штаммов *S. aureus* по значениям МИК (рис. 4) позволяет дифференцировать культуры по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов. Так, к бензилпенициллину подавляющее большинство штаммов сформировало высокий уровень устойчивости, к оксациллину резистентны

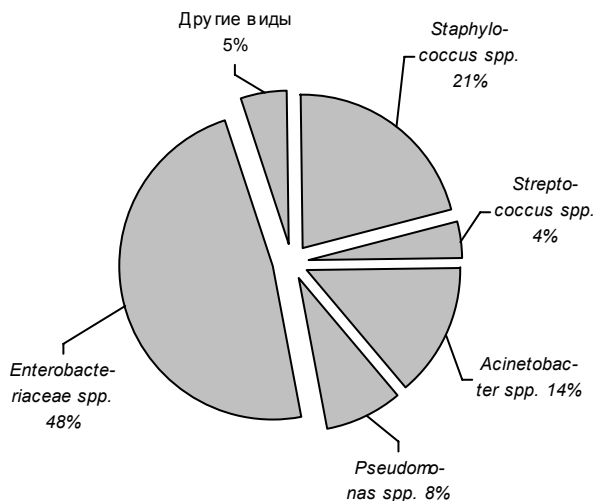


Рис. 1. Удельный вес основных таксономических групп бактерий в этиологической структуре ГСИ

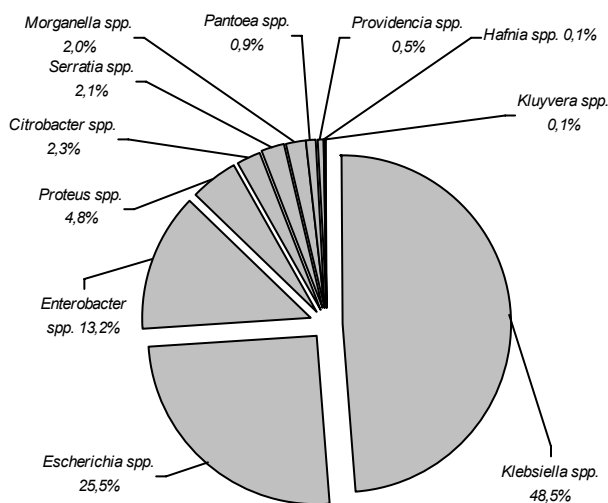


Рис. 2. Видовая структура энтеробактерий, являющихся этиологическим фактором развития ГСИ

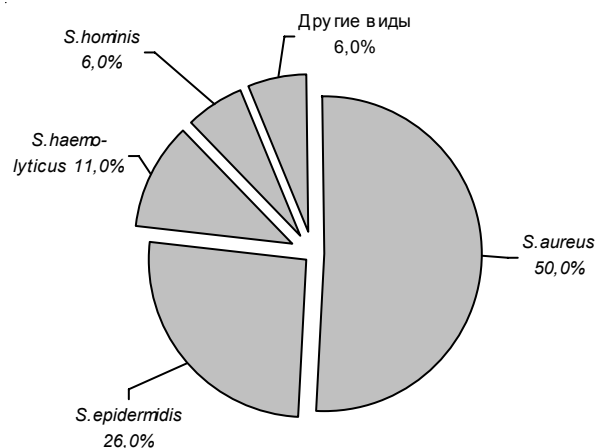


Рис. 3. Видовая структура стафилококков, являющихся этиологическим фактором развития ГСИ

Таблица 1

Чувствительность штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* к антибиотикам

Антимикробный препарат	Количество штаммов		Breakpoints, S/(I+R)		Чувствительные, %		Умеренно устойчивые, %		Устойчивые, %	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Бензилпенициллин	251	114	≤0,12/≥0,25	≤0,12/≥0,25	9	2	0	0	91	98
Оксациллин	252	114	≤2/≥4	≤0,25/≥0,5	60	5	0	0	40	95
Эритромицин	252	129	≤0,5/≥1	≤0,5/≥1	55	14	0	2	45	84
Клиндамицин	252	129	≤0,5/≥1	≤0,5/≥1	73	39	0	1	27	60
Гентамицин	252	114	≤4/≥8	≤4/≥8	60	30	2	9	38	61
Тетрациклин	252	129	≤4/≥8	≤4/≥8	71	63	0	1	29	36
Ципрофлоксацин	252	129	≤1/≥2	≤1/≥2	71	26	0	6	29	68
Левифлоксацин	124	61	≤2/≥4	≤2/≥4	71	23	15	41	14	36
Моксифлоксацин	252	129	≤1/≥2	≤1/≥2	81	63	15	17	4	20
Рифампицин	252	114	≤1/≥2	≤1/≥2	79	68	0	3	21	29
Фузидин	252	114	≤2/≥4	≤2/≥4	98	76	2	12	0	12
Ко-тримоксазол	252	129	≤2/≥4	≤2/≥4	98	67	0	0	2	33
Линезолид	252	129	≤4/≥8	≤4/≥8	100	100	0	0	0	0
Ванкомицин	252	129	≤4/≥8	≤4/≥8	100	96	0	4	0	0
Тейкопланин	252	129	≤4/≥8	≤4/≥8	100	87	0	9	0	4

40% культур, большинство чувствительных штаммов имеют запас активности с учетом значения breakpoints. В отношении эритромицина, клиндамицина, гентамицина, тетрациклина и ципрофлоксацина распределение штаммов по значениям МИК имеет два пика, находящихся на расстоянии нескольких разведений от breakpoints. По отношению к левифлоксацину и моксифлоксацину штаммы стафилококка более гетерогенны по уровням устойчивости. Фузидин, ко-тримоксазол, ванкомицин, тейкопланин и линезолид являются высокоактивными в отношении подавляющего большинства или всех штаммов *S. aureus*. Эти АМП имеют достаточный запас активности (большинство чувствительных штаммов располагаются на расстоянии нескольких разведений от breakpoints).

Штаммы эпидермального стафилококка, вызывающие развитие различных нозологических форм ГСИ, характеризуются очень высокой устойчивостью к бензилпенициллину (98%) и оксациллину (95%) (см. табл. 1).

84% культур были резистентны к макролидам, 60% — к линкозамидам, 61% — к аминогликозидам,

36% — тетрациклинам. В семействе фторхинолонов наибольшую активность в отношении *S. epidermidis* проявил моксифлоксацин (63% культур). К фузидину и ко-тримоксазолу были чувствительны 76% и 67% штаммов соответственно. К линезолиду устойчивых штаммов эпидермального стафилококка не обнаружено. К ванкомицину и тейкопланину нечувствительными были 4% и 13% культур соответственно.

Анализ распределения штаммов *S. epidermidis* по значениям МИК антимикробных препаратов (рис. 5) позволяет дифференцировать культуры по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов.

В отношении эритромицина, клиндамицина, гентамицина, тетрациклина, ципрофлоксацина и левифлоксацина распределение штаммов по значениям МИК имеет два пика, находящихся на расстоянии нескольких разведений от breakpoints. Таким образом, популяция стафилококков включает высокорезистентные и высокочувствительные варианты. По отношению к моксифлоксацину штаммы стафилококка более гете-

Таблица 2

Чувствительность штаммов *E. coli* к антибиотикам

Антимикробный препарат	Количество штаммов	Breakpoints, S/(I+R)	Чувствительные, %	Умеренно устойчивые, %	Устойчивые, %
Ампициллин	161	≤8/≥16	29	1	70
Амоксициллин/клавуланат	122	≤8/≥16	55	31	14
Цефазолин	39	≤8/≥16	49	0	51
Цефуросим	161	≤8/≥16	50	3	49
Цефотаксим	161	≤8/≥16	55	0	45
Цефепим	161	≤8/≥16	75	2	23
Имипенем	39	≤4/≥8	100	0	0
Меропенем	161	≤4/≥8	99	0	1
Гентамицин	161	≤4/≥8	65	1	34
Амикацин	122	≤16/≥32	93	1	6
Ципрофлоксацин	161	≤1/≥2	52	1	47
Левифлоксацин	39	≤2/≥4	64	8	28
Тетрациклин	39	≤4/≥8	56	3	41
Нитрофурантоин	122	≤32/≥64	73	12	15
Ко-тримоксазол	161	≤2/≥4	58	0	42

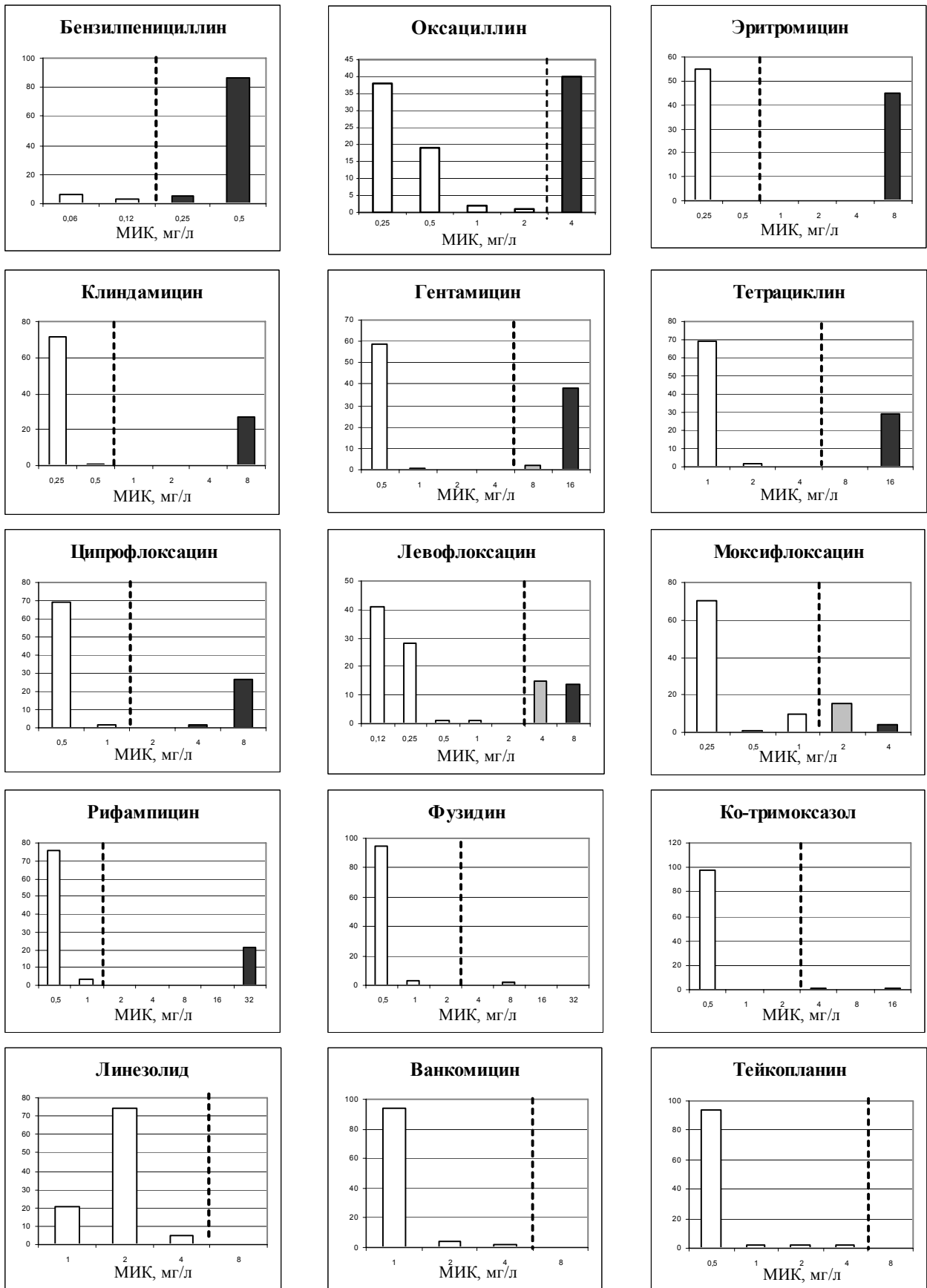


Рис. 4. Анализ распределения штаммов *S. aureus* по значениям МИК антимикробных препаратов.
Примечание: здесь и на рис. 5—8: □ — чувствительные; ▒ — умеренно устойчивые; ■ — устойчивые

20 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

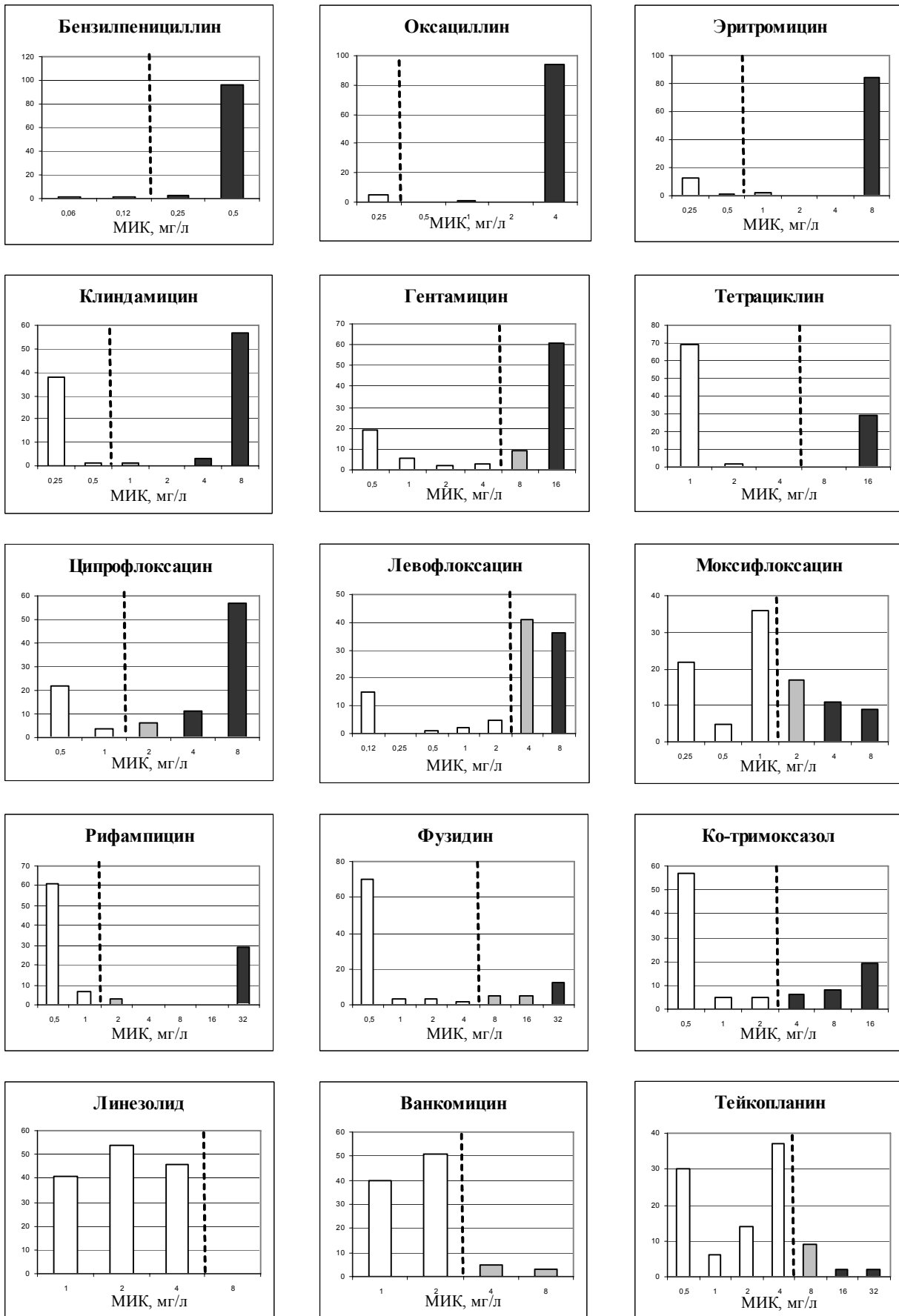


Рис. 5. Анализ распределения штаммов *S. epidermidis* по значениям МИК антимикробных препаратов

рогенны по уровням устойчивости. Фузидин, ко-тримоксазол, ванкомицин, тейкопланин и линезолид являются высокоактивными в отношении большинства или всех штаммов *S. epidermidis*. Эти антимикробные препараты имеют достаточный запас активности.

Штаммы кишечной палочки (табл. 2) характеризуются высокой устойчивостью к ампициллину (70%). Вместе с тем удельный вес нечувствительных штаммов к амоксициллину/клавуланату составил 45%.

Активность цефалоспоринов увеличивается с каждым последующим поколением препаратов. Так, чувствительными к цефазолину были 49% штаммов *E. coli*, к цефепиму — 75%. Высокая устойчивость к этим антибиотикам свидетельствует о распространении β-лактамаз широкого и расширенного спектров действия, которые приводят к ферментативной инактивации β-лактамных антибиотиков. К имипенему и меропенему чувствительными оказались все или почти все штаммы *E. coli* (99—100%).

Из аминогликозидных антибиотиков наибольшей активностью по отношению к кишечной палочке характеризуется амикацин, нечувствительными были 7% штаммов. Устойчивость к гентамицину регистрируется достоверно чаще (34%), что, возможно, связано с широким применением этого препарата в стационарах республики. Чувствительные к фторхинолонам штаммы *E. coli* обнаруживались с частотой 52—64% в зависимости от препарата. Почти половина штаммов (47%) являются устойчивыми к ципрофлоксацину. Тетрациклиновые антибиотики в настоящее время имеют ограниченное применение вследствие их высокой токсичности и бактериостатического типа действия. Нечувствительными к тетрациклину оказались 44% штаммов кишечной палочки. К нитрофурантоину были чувствительны 73%, к триметоприму/сульфаметоксазолу — 58% культур *E. coli*.

Анализ распределения штаммов *E. coli* по значениям МИК (рис. 6) позволяет дифференцировать культуры по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов.

Так, к ампициллину большинство штаммов *E. coli* сформировало высокий уровень устойчивости (МИК 32 мг/л и более), к ингибиторозащищенному амоксициллину наблюдается активный процесс селекции устойчивых форм, что подтверждает значительное число культур с умеренной резистентностью к этому препарату. Анализируя распределение штаммов по значениям МИК цефалоспоринов, можно отметить, что диаграммы имеют два подъема: первый обусловлен наличием в популяции высокочувствительных штаммов, второй представлен высокорезистентными штаммами. Карбапенемы (имипенем, меропенем) характеризуются высокой активностью в отношении *E. coli* (при этом учитываются значения breakpoints), запас ее у этих препаратов достаточно велик. Аминогликозиды в отношении кишечной палочки проявляют вариабельность. При этом старые препараты (гентамицин) утратили активность в отношении 35% штаммов, тогда как к современным препаратам (амикацин) устойчивость проявили только 6% штаммов. Наблюдается процесс селекции в сторону резистентности, о чем свидетельствуют данные диаграммы по амикацину. Фторхинолоны, широко используемые в клинической практике, утрачивают свои пози-

ции в отношении энтеробактерий, о чем свидетельствуют данные диаграммы по ципрофлоксацину и левофлоксацину. Значительная часть штаммов (42—44%) была нечувствительна к тетрациклину и ко-тримоксазолу. Чувствительные и устойчивые варианты *E. coli* находятся на расстоянии 2—3 разведений от линии breakpoints. Это свидетельствует об уже реализованном процессе селекции резистентных вариантов, те культуры, которые смогли стать устойчивыми, — высокорезистентны; изоляты, не обладающие соответствующими механизмами, — высокочувствительны. Распределение штаммов по уровням устойчивости к нитрофурантоину более равномерное, большинство культур сохраняют чувствительность.

Штаммы клебсиелл (табл. 3) характеризуются высокой устойчивостью к ампициллину (95%). Удельный вес нечувствительных штаммов к амоксициллину/клавуланату составил 74%. Активность цефалоспоринов незначительно растет с каждым последующим поколением препаратов.

К имипенему и меропенему чувствительными оказалось подавляющее большинство штаммов *K. pneumoniae* (93—95%). Из аминогликозидных антибиотиков наибольшей активностью по отношению к клебсиеллам обладает амикацин, нечувствительными были 52% штаммов. Устойчивость к гентамицину регистрируется достоверно чаще (68%), что, возможно, связано с широким применением этого препарата в стационарах республики. Чувствительность к фторхинолонам штаммов *K. pneumoniae* обнаруживалась с частотой 21—39% в зависимости от препарата. Большинство штаммов (76%) являются устойчивыми к ципрофлоксацину. Нечувствительными к тетрациклину оказались 56% штаммов клебсиелл, к нитрофурантоину — 90%, к триметоприму/сульфаметоксазолу — 31% культур. Анализ распределения штаммов *K. pneumoniae* по значениям МИК (рис. 7) позволяет дифференцировать культуры по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов. Так, к ампициллину практически вся популяция клебсиелл сформировала высокую устойчивость (МИК 32 мг/л и более), к ингибиторозащищенному амоксициллину почти половина штаммов приобрела резистентность и наблюдается активный процесс селекции устойчивых форм.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что большинство штаммов сформировало устойчивость к цефалоспорином I—III поколений. К цефепиму сохранили чувствительность 30% культур, распределяющихся по значениям МИК достаточно равномерно. Более 60% штаммов высокорезистентны к данному препарату. Карбапенемы характеризуются высокой активностью в отношении *K. pneumoniae*, при этом учитываются значения breakpoints, эти препараты обладают достаточным запасом активности. Аминогликозиды в отношении клебсиелл утрачивают позиции: активность старых препаратов (гентамицин) снизилась в отношении 68% штаммов. К современным препаратам (амикацин) устойчивость проявили 50% штаммов. Тем не менее наблюдается процесс селекции в сторону резистентности, о чем свидетельствуют диаграммы по амикацину. Фторхинолоны, широко используемые в клинической

22 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

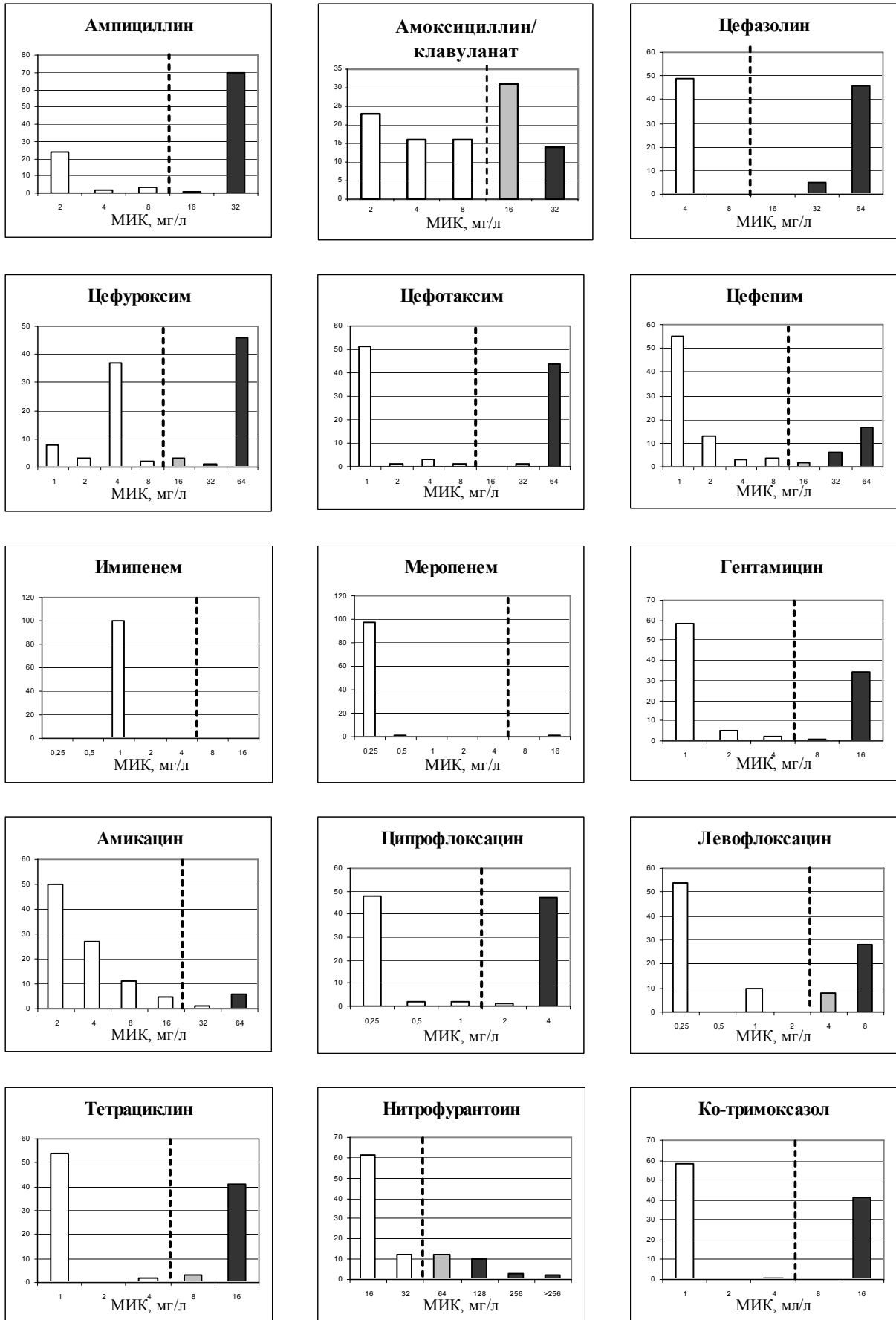
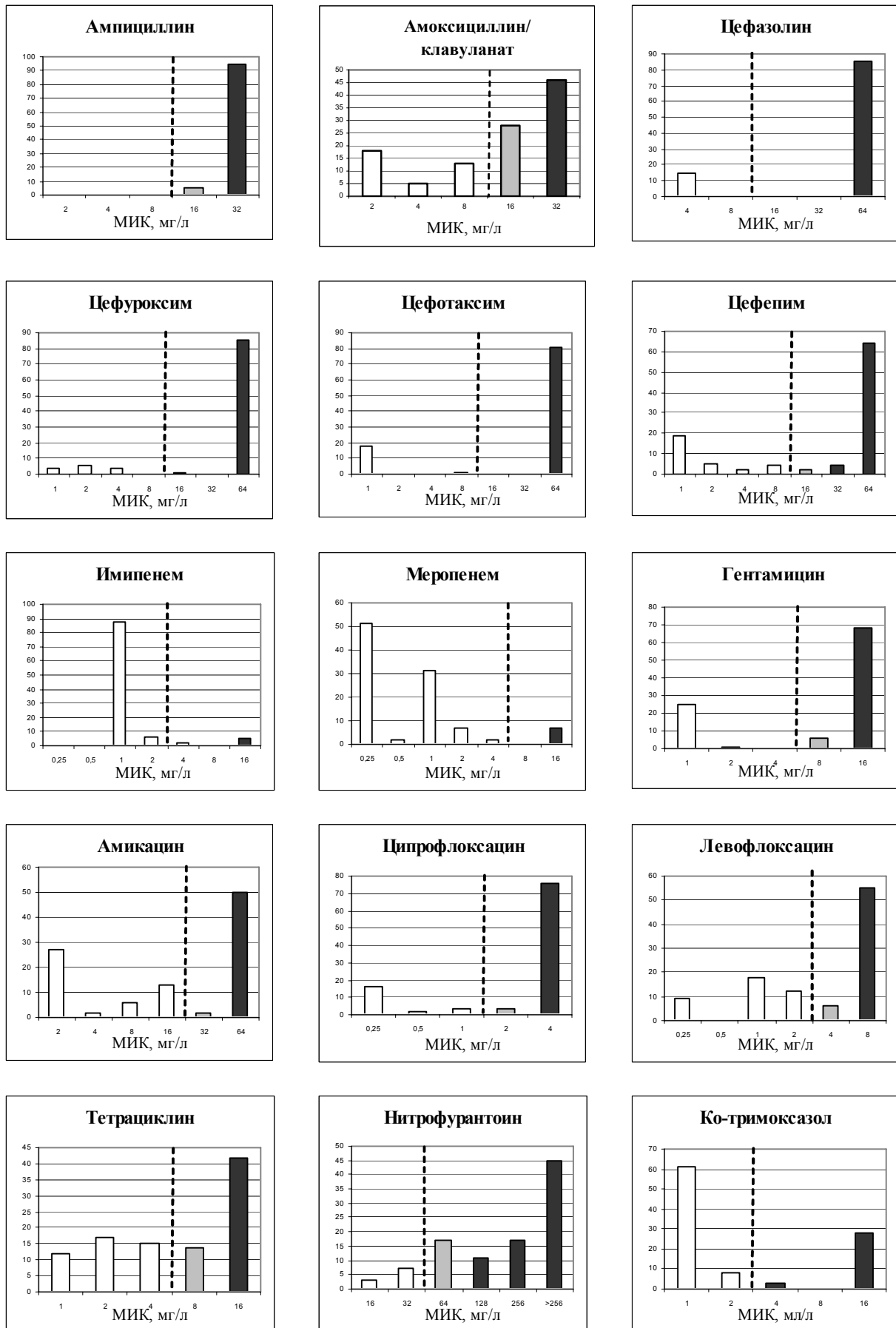


Рис. 6. Анализ распределения штаммов *E. coli* по значениям МИК антимикробных препаратов

Рис. 7. Анализ распределения штаммов *K. pneumoniae* по значениям МИК антимикробных препаратов

24 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Таблица 3

Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к антибиотикам

Антимикробный препарат	Количество штаммов	Breakpoints, S/(I+R)	Чувствительные, %	Умеренно устойчивые, %	Устойчивые, %
Ампициллин	186	≤8/≥16	0	5	95
Амоксициллин/клавуланат	142	≤8/≥16	36	28	46
Цефазолин	92	≤8/≥16	15	0	85
Цефуроксим	138	≤8/≥16	14	1	85
Цефотаксим	185	≤8/≥16	19	0	81
Цефепим	186	≤8/≥16	30	2	68
Имипенем	92	≤4/≥8	95	0	5
Меропенем	138	≤4/≥8	93	0	7
Гентамицин	186	≤4/≥8	26	6	68
Амикацин	143	≤16/≥32	48	2	50
Ципрофлоксацин	186	≤1/≥2	21	3	76
Левифлоксацин	44	≤2/≥4	39	6	55
Тетрациклин	91	≤4/≥8	34	14	42
Нитрофурантоин	143	≤32/≥64	10	17	73
Ко-тримоксазол	186	≤2/≥4	69	0	31

Таблица 4

Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам

Антимикробный препарат	Количество штаммов	Breakpoints, S/(I+R)	Чувствительные, %	Умеренно устойчивые, %	Устойчивые, %
Пиперациллин	186	≤64/≥128	50	0	50
Цефтазидим	142	≤8/≥16	26	13	61
Цефепим	92	≤8/≥16	28	16	56
Имипенем	138	≤4/≥8	37	5	58
Меропенем	185	≤4/≥8	34	1	65
Азтреонам	186	≤8/≥16	21	15	64
Гентамицин	167	≤4/≥8	22	9	69
Амикацин	31	≤16/≥32	29	13	58
Ципрофлоксацин	167	≤1/≥2	21	1	78

практике, утрачивают свои позиции в отношении энтеробактерий (данные диаграммы по ципрофлоксацину и левофлоксацину — 55—76% устойчивых штаммов). Значительная часть штаммов были нечувствительны к нитрофурантоину, тетрациклину и ко-тримоксазолу (90%, 56% и 31% соответственно). Чувствительные и устойчивые варианты *K. pneumoniae* относительно равномерно распределены по значениям МИК, что характеризует активность процесса селекции устойчивости. Однако эти препараты не имеют практического значения при терапии ГСИ, обусловленных клебсиеллами.

Результаты тестирования чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* представлены в табл. 4. Наименьшая частота резистентности выявлена к пиперациллину: нечувствительными были 50% штаммов.

Представители семейства цефалоспоринов (цефтазидим и цефепим) имели сходные уровни активности в отношении штаммов *P. aeruginosa*. Нечувствительными к ним были 74% и 72% штаммов соответственно, из которых резистентными являлись 61% и 56%. Умеренной активностью характеризуются карбапенемы. Нечувствительными к имипенему были 63%, к меропенему — 66% штаммов, из которых резистентными являлись 58% и 65% соответственно. Наиболее часто устойчивость к цефтазидиму у *P. aeruginosa* связана с гиперпродукцией хромосомных β-лактамаз класса С. Однако в последние годы описаны штаммы, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Опи-

саны три класса БЛРС у штаммов *P. aeruginosa* (классы А, В и D), способные гидролизовать цефтазидим, не влияющие на активность карбапенемов. Нечувствительными к амикацину были 71%, к гентамицину — 78% штаммов *P. aeruginosa*. Из них 13% и 9% соответственно обладали промежуточным уровнем резистентности. Следует отметить, что количество устойчивых к ципрофлоксацину штаммов *P. aeruginosa* в Беларуси в последние 15 лет возросло в 2 раза (39% — в 1996 г., 71% — в 2005 г., 79% — в 2010 г.). Одной из причин резистентности может быть модификация мишеней действия фторхинолонов (ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) за счет мутаций в генах *gyrA* и *parC*.

При анализе характера распределения штаммов *P. aeruginosa* по значениям МИК для всех препаратов установлен значительный сдвиг в сторону высоких значений ингибирующих концентраций (рис. 8).

Чувствительные штаммы распределяются по значениям МИК достаточно равномерно. Это свидетельствует о преобладании в популяции *P. aeruginosa* резистентных штаммов и наличии культур с различными значениями МИК в категории «чувствительных штаммов». Терапия ГСИ, вызванных такими штаммами *P. aeruginosa*, должна осуществляться только на основании данных антибиотикограммы. Представленные исследования позволяют дифференцировать культуры микроорганизмов по степени резистентности и прогнозировать скорость селекции устойчивых вариантов.

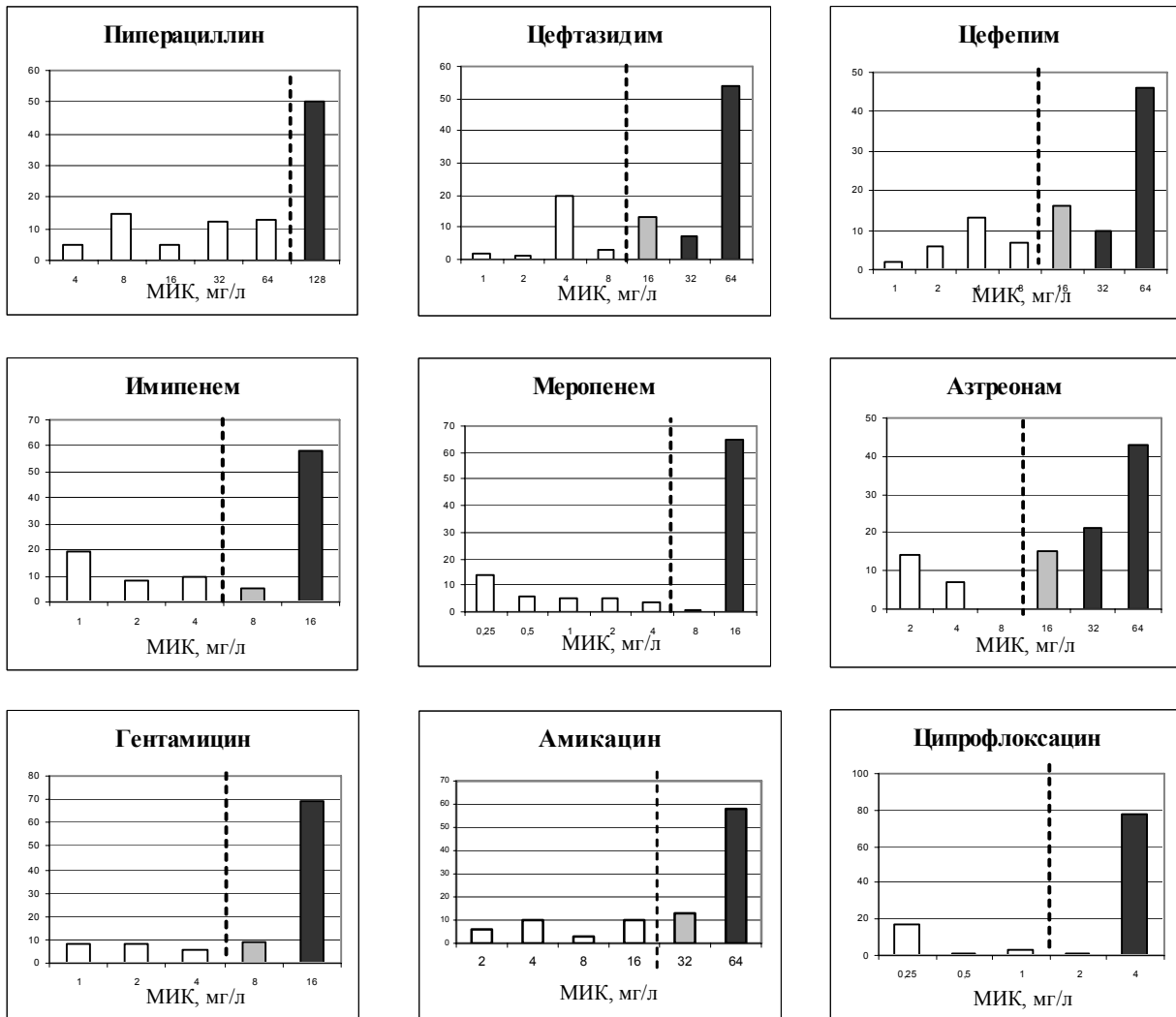


Рис. 8. Анализ распределения штаммов *P. aeruginosa* по значениям МИК антимикробных препаратов

Выводы

1. Для рационального применения антибиотиков в отделениях многопрофильных стационаров должны быть внедрены в практику формуляры по применению антимикробных средств.

2. Следует отказаться от использования малоэффективных антибиотиков с целью снижения уровня резистентности микроорганизмов; назначать препараты необходимо с учетом чувствительности микрофлоры.

3. Чтобы снизить антибиотикорезистентность штаммов возбудителей, необходимо: проводить мониторинг клинически значимых микроорганизмов и осуществлять контроль за устойчивыми штаммами, изучать особенности эпидемического процесса при внутрибольничных инфекциях, определять резерв антимикробных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Внутрибольничные инфекции* / Под ред. Р.П. Венцела. — М., 1990.
2. Титов Л. П., Адарченко А. А., Гудкова Е. И. // *Мед. новости.* — 1999. — № 8. — С. 8—10.
3. Bronzwaer S. L. A. M., Goettsch W., Ollson-Liljequist B., et al. // *Eurosurveillance.* — 1999. — Vol. 4. — P. 41.

Поступила 19.07.11.

ETIOLOGICAL STRUCTURE AND RESISTANCE OF PATHOGENIC AGENTS CAUSING PYOSEPTIC INFECTIONS TO ANTIBIOTICS

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

Many resistant to antibiotics pathogenic agents causing pyoseptic infections in public health institutions of the Republic were selected, their resistance/sensitivity to antimicrobial formulations was verified. The minimal inhibiting concentrations were determined for the antibiotics administered most frequently. The ratio of the gram positive and gram negative bacteria in the etiological structure of bacterial pyoseptic infections registered in medical institutions was determined. For carrying out a complex of measures aimed at reducing the resistance of pathogenic agents strains to antibiotics it is necessary to monitor the clinically relevant microorganisms and to control the resistant strains, to study the special features of the epidemic process course under in-hospital infections, to determine the antimicrobial drugs reserve.

Key words: pathogenic agents causing pyoseptic infections, resistance to antibiotics, monitoring.

Адрес для корреспонденции:

Ермакова Татьяна Сергеевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23;

сл. тел. (8-017) 237-69-89.

С. Э. ГЛАЗКОВА, Ф. А. ЛЕБЕДЕВ, Л. П. ТИТОВ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ *NEISSERIA MENINGITIDIS* К АНТИБИОТИКАМ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Впервые представлены данные определения уровней минимальных ингибирующих концентраций (МИК) у 9 антибиотиков методом разведений в питательной среде в отношении менингококков, циркулирующих в Беларуси. Исследовано 26 изолятов менингококка: 13 — от больных менингитом, 12 — от контактных лиц и 1 — от носителя. Не было выявлено штаммов бактерий, обладающих высокими уровнями устойчивости к исследованным антибиотикам. МИК₉₀ ампициллина составила $\geq 0,25$ мг/л, цефотаксима — 0,008 мг/л, цефтриаксона — $\geq 0,004$ мг/л, меропенема — $\geq 0,03$ мг/л, доксициклина — $\geq 2,0$ мг/л, азитромицина — $\geq 0,06$ мг/л, левомицетина — $\leq 4,0$ мг/л, рифампицина — 0,03 мг/л. Из всех исследованных штаммов 15% обладали сниженной чувствительностью к ампициллину в концентрациях 0,25 мг/л и 0,5 мг/л, 23% менингококков были умеренно чувствительны к ампициллину в концентрации 0,125 мг/л. Штаммы, обладающие умеренной устойчивостью к левомицетину, составили 54% (МИК 2,0 мг/л). Среди 26 штаммов 12% обладали сниженной чувствительностью к доксициклину (МИК 2,0 мг/л). Все изоляты менингококка были чувствительны ко всем исследованным концентрациям ципрофлоксацина.

Ключевые слова: менингококки, чувствительность к антибиотикам, минимальная ингибирующая концентрация.

Проблема менингококковой инфекции остается весьма актуальной для здравоохранения Республики Беларусь, несмотря на относительное улучшение эпидситуации в 2010 г. и снижение заболеваемости до 1,2 на 100 тыс. населения [1]. Уровень летальности больных с генерализованными формами менингококковой инфекции сохраняется достаточно высоким (12 случаев в 2010 г.) и практически не имеет тенденции к снижению [2].

Во избежание осложненного течения заболевания и летального исхода пациенту необходимы эффективные антибиотики, профилактическое назначение которых обеспечивает эрадикацию назофарингеального носительства возбудителя и применяется для элиминации передачи патогена в кругу лиц, находившихся в тесном контакте с больным [3]. В последнее время увеличилось число публикаций, свидетельствующих о возрастании частоты выявления штаммов менингококка, резистентных или обладающих сниженной чувствительностью к антимикробным препаратам [4—6].

Менингококки характеризуются разнообразными механизмами формирования и приобретения резистентности к антибиотикам: горизонтальный перенос генов, внутригеномные рекомбинации, точечные мутации хромосомных генов [7]. Например, сниженная чувствительность к пенициллину обусловлена изменениями структуры пенициллинсвязывающего белка (ПСБ2), кодируемого геном *penA* [7, 8]. ПСБ2 имеет массу 60 кДа и является мишенью для β -лак-

тамных антибиотиков [4, 5, 7, 8]. Антибактериальный эффект пенициллина основан на ковалентном связывании молекулы антибиотика с ПСБ2 и ингибции транспептидазной активности этих белков. Генетические рекомбинации и мутации гена *penA* сопровождаются изменениями структуры ПСБ2, понижающими его аффинность к молекуле пенициллина и, соответственно, чувствительность к этому классу антибиотиков [7, 8]. Повышение резистентности к рифампицину у *N. meningitidis* (МИК >1 мг/л) обусловлено несинхронными мутациями в фрагменте гена *groV*, кодирующего β -субъединицу РНК полимеразы в четырех сайтах (D542, H552, S548 и S557) [9—12]. В формировании устойчивости менингококков к фторхинолонам участвуют различные механизмы: модификация мишени для антибиотика (точечные мутации в генах *gyrA* и *parC*), снижение проницаемости клеточной мембраны бактерий (замещение аминокислот в белке PorG), увеличение эффлюкса антибиотика из клетки (мутации в промоторе или кодирующей области гена *mtrR*) [13].

Для повышения эффективности контроля менингококковой инфекции необходим постоянный мониторинг чувствительности/резистентности популяции возбудителя к применяемым антибактериальным средствам с использованием современных подходов к определению минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотика и контрольных точек (breakpoints), позволяющих отнести тестируемые изоляты к чувствительным или резистентным вариантам, и таким образом предсказать эффективность/неэффективность курса антибиотикотерапии. Ранее в Республике Беларусь мониторинг устойчивости менингококков к антимикробным препаратам не проводился, имеются лишь единичные публикации о характере фенотипической резистентности [14].

Целью настоящего исследования явилось изучение уровней фенотипической чувствительности/резистентности к антибиотикам штаммов *N. meningitidis*, выделенных от больных менингитом и контактных лиц в различных ЛПО Беларуси в 2009—2010 гг.

Материал и методы

Материалом для исследования явились 26 культур менингококков, выделенных от больных (n=13), контактных лиц (n=12) и бактерионосителя (n=1) в различных регионах Беларуси (Минск, Минская, Брестская, Гомельская и Могилевская области) в 2009—2010 гг.

Культивирование бактерий осуществляли с использованием GC-агара, с добавлением коммерческого фактора роста IsoVitaleX, V-C-N-ингибитора и лошадиной сыворотки в микроанаэрозоле при 37°C в течение 24 ч [15].

Биохимическая реидентификация менингококков проводилась с использованием автоматического биологического анализатора — прибора «Vitek 2 Compact» («BioMérieux», Франция), согласно инструкции производителя.

Исследование чувствительности чистых культур *N. meningitidis* к антибиотикам проводили методом

серийных разведений антибиотиков в агаре Мюллера—Хинтона («BioMerieux», Франция) с добавлением лошадиной сыворотки (20%). МИК антибиотиков (мг/мл) определяли в следующем диапазоне: ампициллин (0,5—0,015), цефотаксим (0,125—0,008), цефтриаксон (0,008—0,0015), меропенем (0,06—0,004), доксициклин (4,0—0,25), азитромицин (2,0—0,03), левомицетин (8,0—0,5), рифампицин (0,5—0,008), ципрофлоксацин (0,5—0,06). Определение МИК₅₀ и МИК₉₀ (концентрации антибиотиков, ингибирующие 50% и 90% штаммов соответственно) и оценку полученных данных проводили в соответствии со стандартами Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности — EUCAST. Для отнесения исследованных штаммов к чувствительным (S), резистентным (R) или обладающим сниженной чувствительностью (I) использовали следующие значения breakpoints (мг/л), рекомендованные EUCAST: ампициллин — 0,03/0,5; цефотаксим — 0,125/0,125; цефтриаксон — 0,125/0,125; меропенем — 0,25/0,25; доксициклин — 1,0/2,0; азитромицин — 0,25/0,5; левомицетин — 2,0/4,0; рифампицин — 0,25/0,25 и ципрофлоксацин — 0,032/0,64.

Серогрупповую принадлежность штаммов менингококков определяли методом ПЦР согласно ранее описанной методике [16]. Экстракцию ДНК из клинических образцов осуществляли при использовании наборов «DNA extraction kit» («Fermentas», Литва).

Ввод, статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерных программ «Microsoft Excel» 7.0 и STATISTICA 6.0 ($P < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Определение серогрупповой принадлежности менингококков с помощью ПЦР

В ходе исследования выявлено, что серогруппе В принадлежали 73% исследованных изолятов, менингококки серогруппы С, наравне с нетипируемыми штаммами, составили по 13,5%. Все изоляты от больных относились к серогруппе В, распределение штаммов от контактных лиц по серогруппам выглядело следующим образом: серогруппа В — 38%, С и нетипируемые — по 31%, штамм от бактерионосителя отнесен к серогруппе С.

МИК штаммов менингококков от больных и контактных лиц к антимикробным препаратам основных классов

Исследованы уровни чувствительности/резистентности к антимикробным препаратам у 26 культур менингококков, выделенных от больных, контактных лиц и бактерионосителя в различных регионах страны в 2009—2010 гг. В таблице приведены данные МИК₅₀ и МИК₉₀ у 9 антимикробных препаратов основных классов в отношении исследованных штаммов. Представленные данные свидетельствуют, что часть штаммов обладала сниженной чувствительностью к пенициллинам (ампициллину), тетрациклинам (доксициклину) и хлорамфениколу. Уровень устойчивости к другим классам антибиотиков (цефалоспорины, карбапенемы, макролиды, рифампицин и фторхинолоны) был ниже предложенных EUCAST, что позволяет судить о на-

МИК₅₀ и МИК₉₀ антибиотиков в отношении культур менингококков, выделенных в 2009—2010 гг.

Группа антибиотиков	МИК ₅₀ , мг/л	МИК ₉₀ , мг/л	Breakpoints S/R, мг/л
Пенициллины: ампициллин	0,06	>0,25	≤0,12/>1,0
Цефалоспорины: цефотаксим цефтриаксон	≤0,008 0,002	0,008 ≥0,004	≤0,12/>0,12 ≤0,12/>0,12
Карбапенемы: меропенем	0,015	>0,03	≤0,25/>0,25
Тетрациклины: доксициклин	≥1,0	> 2,0	≤1,0/>2,0*
Макролиды: азитромицин	0,03	≥0,06	≤0,25/>0,5*
Хлорамфеникол: левомицетин	≥2,0	≤4,0	2,0/>4,0
Рифампицин	0,015	0,03	≤0,25/>0,25
Фторхинолоны: ципрофлоксацин	S	S	≤0,03/>0,06

Примечание. МИК₅₀ и МИК₉₀ — концентрация антибиотика, которая ингибирует рост 50% и 90% исследованных изолятов менингококка соответственно; S/R — уровни чувствительности/устойчивости менингококков к некоторым антибиотикам согласно установленным EUCAST; *уровни чувствительности/устойчивости у *S. pneumoniae* согласно установленным EUCAST, как предложено в [17].

личии чувствительности менингококков к препаратам данных классов.

Сравнение полученных уровней МИК₉₀ с зарубежными данными [17] показало, что не отличается только уровень чувствительности/устойчивости к ампициллину (>0,25 мг/л) и цефотаксиму (0,008 мг/л).

Пенициллины. На рис. 1 представлена частота выявления резистентных штаммов менингококков от больных и контактных лиц к разным концентрациям ампициллина. Как свидетельствуют полученные данные, штаммы из разных источников характеризуются практически одинаковым уровнем резистентности, что, вероятно, отражает широкое применение препарата в амбулаторной практике и редкое использование в условиях стационара (согласно приказу Минздрава Республики Беларусь «Клинические протоколы диагностики и лечения детского населения с инфекционными и паразитарными болезнями» от 13.06.2006 (Приложение № 484)).

На рис. 2 представлена частота выявления штаммов менингококков, обладающих умеренной устойчивостью (I) к ампициллину (МИК 0,125—1,0 мг/л). Среди всех штаммов их доля составляет более 50%, и в зависимости от МИК они выявлялись в 15% (МИК 0,25—0,5 мг/л) и 23% (МИК 0,125 мг/л).

Цефалоспорины. Все штаммы менингококков, выделенные от контактных лиц и носителя, были чувствительны ко всем исследованным концентрациям цефотаксима. На рис. 3 представлено распределение уровней МИК цефотаксима у штаммов от больных менингитом (n=13).

Уровни МИК₉₀ цефтриаксона (рис. 4) были существенно ниже зарубежных данных (≥0,004 мг/л и >0,12 мг/л соответственно), что позволяет предположить их менее широкое применение в клинике и, следовательно, большую эффективность.

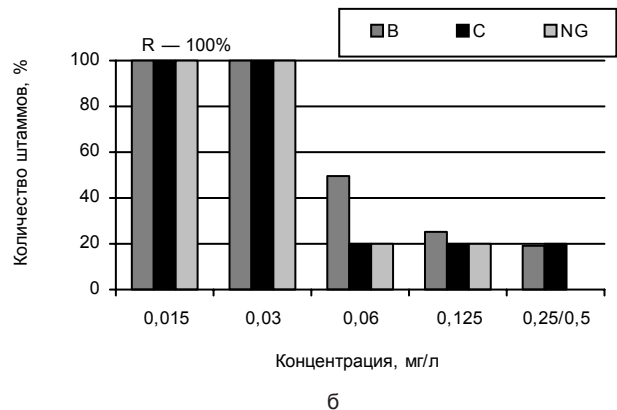
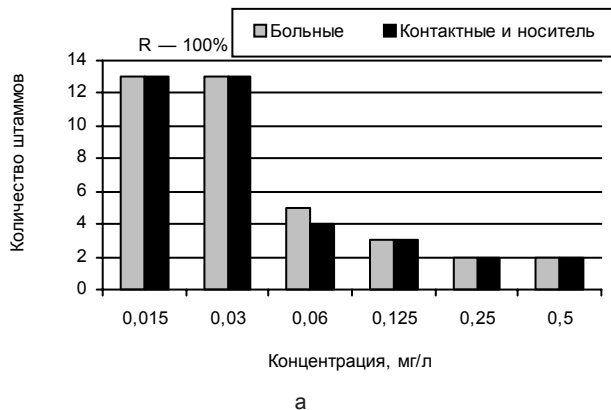


Рис. 1. Уровни резистентности штаммов менингококков к разным концентрациям ампициллина (а) и распределение резистентности среди различных серогрупп менингококков (б)

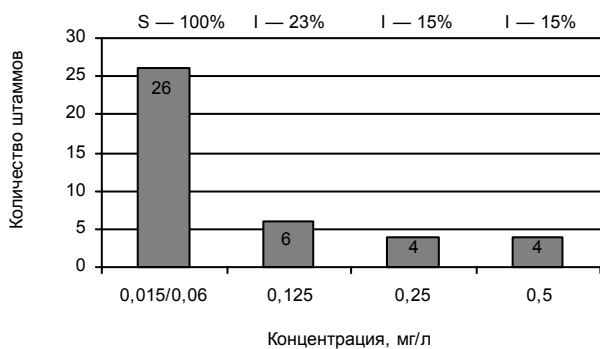


Рис. 2. Распределение МИК ампициллина среди штаммов менингококков

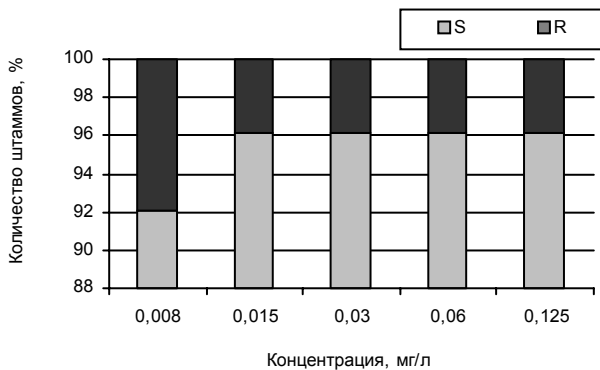


Рис. 3. Распределение МИК цефотаксима у штаммов менингококков, выделенных от больных менингитом

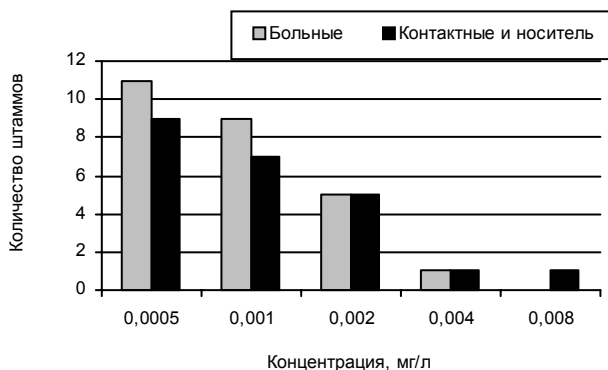


Рис. 4. Уровни резистентности к цефтриаксону среди штаммов менингококков

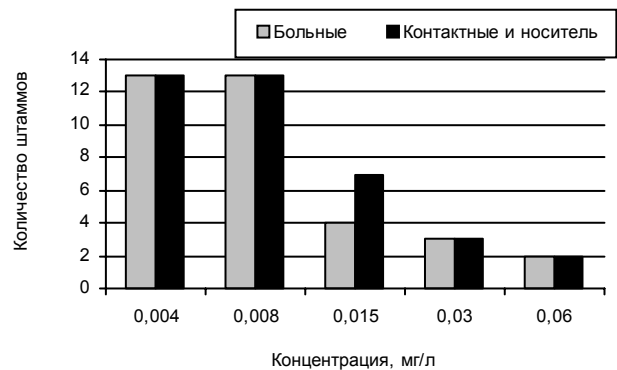


Рис. 5. Уровни резистентности к меропенему среди штаммов менингококков

Карбапенемы. Уровни устойчивости к меропенему (рис. 5) были достаточно низкими в сравнении с принятыми EUCAST breakpoints ($R > 0,25$ мг/л, тогда как MIK_{90} составила $> 0,03$ мг/л).

Тетрациклины. Уровни MIK_{90} доксициклина (рис. 6) были выше ($> 2,0$ мг/л) данных J. H. Jorgensen и соавт. (1 мг/л) [17], причем среди всех исследованных штаммов 12% обладали сниженной чувствительностью к доксициклину (рис. 7).

Макролиды. Уровни MIK_{90} азитромицина (рис. 8) были существенно ниже зарубежных данных ($\geq 0,06$ мг/л и 0,5 мг/л соответственно), и все штаммы были чувствительны к данному препарату согласно breakpoints EUCAST.

Хлорамфеникол. Уровни MIK_{90} левомицетина (рис. 9) были достаточно высокими ($\leq 4,0$ мг/л) в сравнении с данными J. H. Jorgensen и соавт. [17].

На рис. 10 показан уровень штаммов, обладающих умеренной устойчивостью к левомицетину ($MIK \geq 2,0 - 4,0$ мг/л). Они составили 54% ($MIK \geq 2,0$ мг/л).

Рифампицин. Уровни МИК рифампицина (рис. 11) были существенно ниже данных J. H. Jorgensen и соавт. [17] и breakpoints, предложенных EUCAST ($R > 0,25$ мг/л, тогда как MIK_{90} составила 0,03 мг/л), что позволяет предположить их менее широкое применение в клинике и, соответственно, большую эффективность.

Фторхинолоны. Все исследованные изоляты менингококка были чувствительны только к ципро-

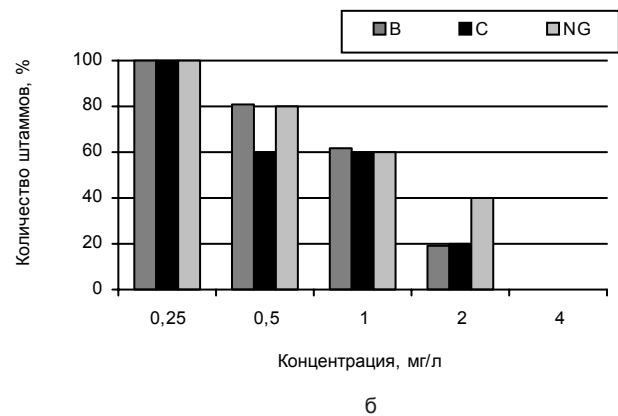
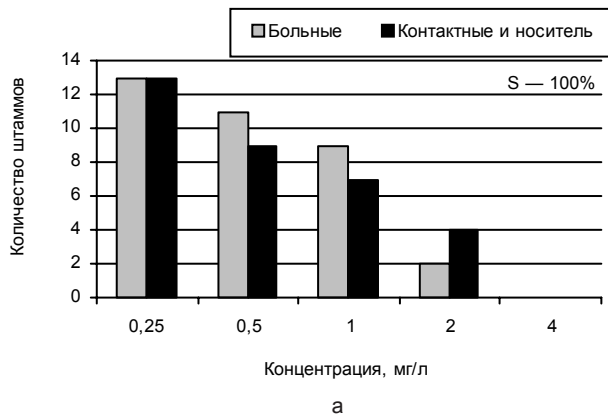


Рис. 6. Уровни резистентности к доксициклину среди штаммов менингококков (а) и распределение уровней резистентности среди различных серогрупп менингококков (б)

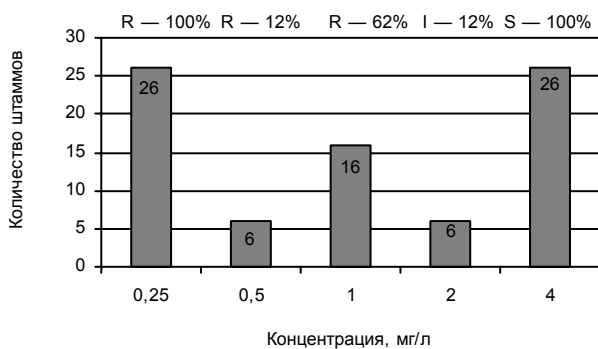


Рис. 7. Распределение МИК доксициклина среди штаммов менингококков

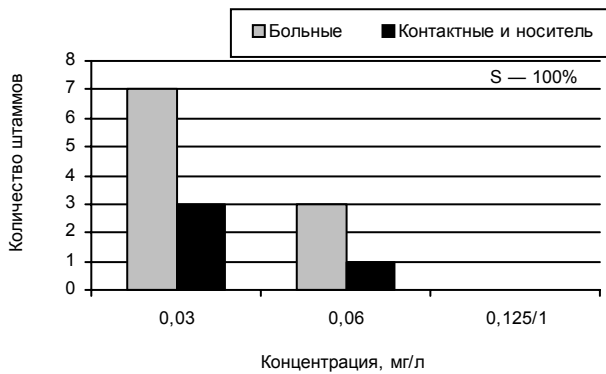


Рис. 8. Уровни резистентности к азитромицину среди штаммов менингококков

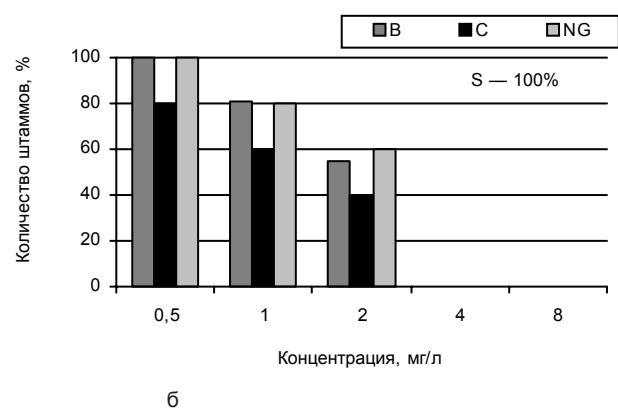
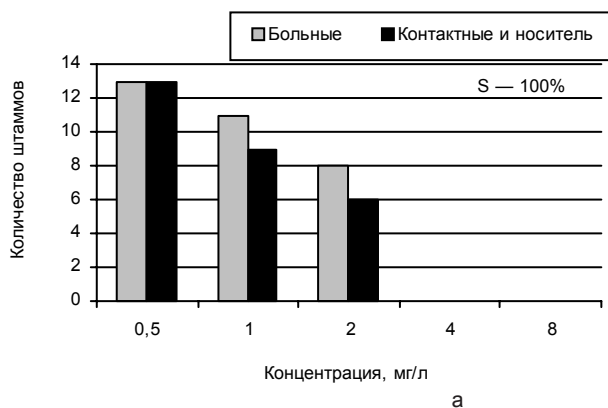


Рис. 9. Уровни резистентности к левомицетину среди штаммов менингококков (а) и распределение уровней резистентности среди различных серогрупп менингококков (б)

флорксацину, который наиболее редко используется в клинике и рекомендуется для химиопрофилактики вторичных случаев инфекции.

Для совершенствования мер борьбы с менингококковой инфекцией и повышения эффективности эпидемиологического наблюдения необходимо введение дозорного надзора за инфекцией, установление случаев инфекции путем их подтверждения клинически и лабораторно, определение серогрупповой принадлежности, резистентности к антибиотикам и сиквенс-типирования. Контроль распространения устойчивости к антибиотикам в популяции менингококка является важным элементом системы эпиднадзора [2, 13].

В настоящее время имеется достаточно сведений о существовании антибиотикорезистентных штаммов менингококков. Постоянно появляются данные о выделении менингококков со сниженной чувствительностью к разным антибиотикам: пенициллину, левомицетину, тетрациклину и др., причем частота выделения пенициллинрезистентных штаммов менингококка увеличивается [3, 4—8, 18]. Поэтому в развитых странах при лечении менингококковой инфекции обычно используют цефалоспорины 3-го поколения, к которым менингококки сохраняют достаточно высокую чувствительность [3, 6]. Использование ципрофлоксацина, цефтриаксона и рифампицина также является более эффективным по сравнению с препаратами пенициллинового ряда при санации контактных лиц

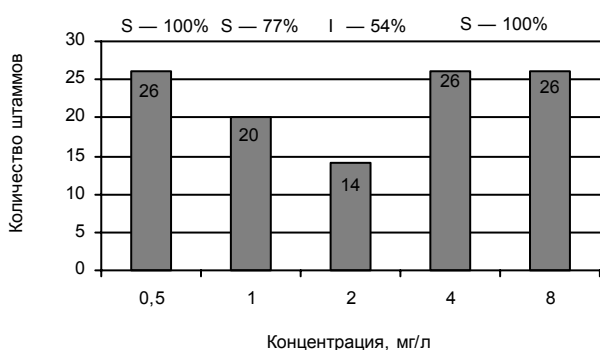


Рис. 10. Распределение МИК к левомицетину среди штаммов менингококков

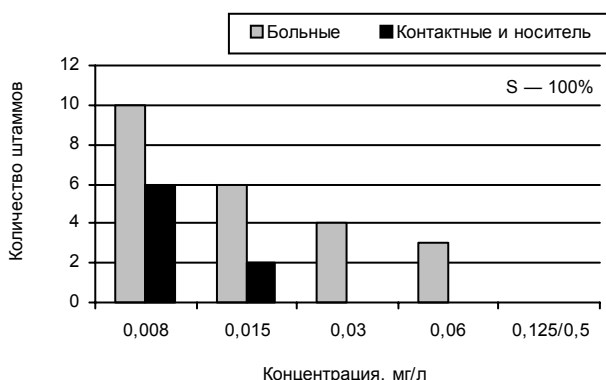


Рис. 11. Уровни резистентности к рифампицину среди штаммов менингококков

и проведении профилактики здорового носительства, однако не следует забывать о формировании устойчивости у менингококков к рифампицину [6, 12, 13].

В настоящей работе впервые представлены результаты исследования уровней чувствительности/устойчивости менингококков к препаратам выбора с помощью МИК. Частота выявления штаммов менингококков, обладающих умеренной устойчивостью (I) к ампициллину (МИК — 0,125—1,0 мг/л), среди всех штаммов менингококков составила более 50%, и в зависимости от МИК они выявлялись в 15% (МИК — 0,25—0,5 мг/л) и 23% (МИК — 0,125 мг/л). Штаммы инвазивных менингококков обладают повышенной устойчивостью к ряду препаратов: уровни МИК доксициклина и левомицетина были выше при сравнении с таковыми в странах Западной Европы [17]. Исследуемые штаммы имели повышенную чувствительность и/или устойчивость к препаратам пенициллинового ряда (бензилпенициллин, оксациллин) и цефалоспорином. Уровни МИК остальных антибиотиков были ниже, что позволяет судить об их менее широком применении в клинике. Из исследуемых антибиотиков все изоляты чувствительны ко всем использованным концентрациям только ципрофлоксацина, который наиболее редко используется в клинике.

В соответствии с приказом Минздрава Республики Беларусь «Клинические протоколы диагностики и лечения детского населения с инфекционными и паразитарными болезнями» от 13.06.2006 (Приложение № 484), препаратами выбора при лечении менинго-

кокковой инфекции у детского населения являются бензилпенициллин, цефотаксим или цефтриаксон, у взрослого населения — бензилпенициллин (при непереносимости возможно применение хлорамфеникола или меропенема). Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что менингококки, выделенные от больных и контактных лиц, обладают сниженным уровнем чувствительности к препаратам пенициллинового ряда и левомицетину. Следует отметить, что сниженная чувствительность или резистентность у менингококков к антибиотикам выбора может ассоциироваться со снижением эффективности или неэффективностью химиотерапии заболевания или химиопрофилактики здорового носительства и требует коррекции соответствующих протоколов. Поэтому важным моментом в системе проведения мониторинга за популяцией менингококков в республике является анализ уровней антибиотикоустойчивости к широко применяемым препаратам.

Выводы

1. Возбудители менингококковой инфекции, выделяемые от больных и контактных лиц в Республике Беларусь, характеризуются сниженной чувствительностью к пенициллинам.
2. Выявлены штаммы менингококков, обладающие сниженной чувствительностью к препаратам тетрациклинового ряда и хлорамфениколу. Уровни МИК доксициклина и левомицетина у менингококков, циркулирующих на территории страны, были выше по сравнению со странами Западной Европы.
3. Впервые установлено, что уровни чувствительности штаммов менингококков к цефалоспорином и карбапенемам существенно ниже таковых в западных странах.
4. Согласно принятым EUCAST breakpoints уровни резистентности менингококков к макролидам, как и к рифампицину, охарактеризованы как низкие.
5. Изученные изоляты менингококка были в 100% чувствительны ко всем исследованным концентрациям ципрофлоксацина.
6. Впервые установлены различия в уровнях и спектре чувствительности/устойчивости менингококков в зависимости от источника выделения и серогрупповой принадлежности. Штаммы менингококков, выделенные от больных менингитом, высоко устойчивы к цефалоспорином, макролидам, хлорамфениколу и рифампицину, от контактных лиц — умеренно чувствительны к ампициллину, но более устойчивы к карбапенемам. Менингококки серогруппы В, а также нетипируемые более устойчивы к ампициллину, доксициклину и левомицетину, тогда как серогруппы С более чувствительны ко всем препаратам выбора.
7. Мониторинг антибиотикорезистентности циркулирующих в республике менингококков к противомикробным препаратам оправдан, является научно обоснованным и необходимым элементом повышения эффективности терапевтических и профилактических мероприятий в борьбе с менингококковой инфекцией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glazkova S., Thulin S., Domeika M., et al. // *Proceed. of 11th EMGM meeting.*— Ljubljana, 2011.— P. 99—100.
2. Тумов Л. П. // *Здравоохранение.*— 2010.— № 12.— С. 15—23.
3. Alcalá B., Salcedo C., Fuente de la I., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.*— 2004.— Vol. 53.— P. 409.
4. Vazquez J. A. // *Rev. Medical Microbiol.*— 2001.— Vol. 12.— P. 39—45.
5. Hedberg-Thulin S., Fredlund H., Nicolas P., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2009.— Vol. 53.— P. 1561—1566.
6. Wu H. M., Harcourt B. H., Hunter C. P., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009.— Vol. 60.— P. 886—892.
7. Antignac A., Kriz P., Tzanakaki G., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.*— 2001.— Vol. 47.— P. 285—296.
8. Canica M., Dias R., Ferreira E. // *Emerg. Infect. Dis.*— 2004.— Vol. 10, № 3.— P. 526—529.
9. Taha M. K., Hedberg S. T., Szatanik M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2010.— Vol. 54, № 9.— P. 3651—3658.
10. Carter P. E., Abadi F. J., Yakubu D. E., Pennington T. H. // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 1994.— Vol. 38.— P. 1256—1261.
11. Stefanelli P., Fazio C., La Rosa G., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2001.— Vol. 47.— P. 219—222.
12. Nolte O., Muller M., Reitz S., et al. // *J. Med. Microbiol.*— 2003.— Vol. 52.— P. 1077—1081.
13. Вережагин В. А., Ильина Е. Н., Малахова М. В. и др. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.*— 2005.— № 1.— С. 23—27.
14. Кудин А. П., Барановская Г. В., Астапов А. А., Ключко Н. С. // *Мед. новости.*— 2000.— № 3.— С. 60—63.
15. Diggle M. A., Clarke S. C. // *Expert. Rev. Mol. Diagn.*— 2006.— Vol. 6.— P. 79—87.
16. Глазкова С. Э., Носова Е. С., Тумов Л. П. // *Мед. журнал.*— 2007.— № 4.— С. 47—50.

17. Jorgensen J. H., Crawford S. A., Fiebelkorn K. R. // *J. Clin. Microbiol.*— 2005.— Vol. 43.— P. 3162—3171.
18. Arreaza L., Fuente de la L., Vazquez A. // *Antimicrob. Agents Chemother.*— 2000.— Vol. 44, № 6.— P. 1705—1707.

Поступила 18.07.11.

NEISSERIA MENINGITIDIS STRAINS SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS

S. E. Glazkova, F. A. Levedev, L. P. Titov

The data obtained while determining levels of minimal inhibiting concentrations (MIC) for nine antibiotics in relation to meningococci circulating in the Republic of Belarus by the method of dilutions in the nutritional media are presented for the first time. Twenty six meningococcus isolates were studied: thirteen had been isolated in patients with meningitis, twelve — in contact persons, and one — in a carrier. None of the bacteria strains isolated demonstrated high resistance to the antibiotics studied. MIC₉₀ for ampicillin was ≥ 0.25 mg/l, cefotaxime — 0.008 mg/l, ceftriaxone — ≥ 0.004 mg/l, meropenem — ≥ 0.03 mg/l, doxycycline — ≥ 0.02 mg/l, azitromycin — ≥ 0.06 mg/l, chloramphenicol I — ≤ 4.0 mg/l, rifampicin — 0.03 mg/l. Among the strains studied 15% of strains had a reduced sensitivity to ampicillin when the drug concentrations were 0.25 mg/l and 0.5 mg/l and 23% of the meningococci demonstrated a moderate sensitivity to ampicillin with the concentration 0.125 mg/l. 54% of the strains were moderately resistant (MIC=2.0 mg/l) to chloramphenicol. Among 26 strains 12% of strains demonstrated a reduced sensitivity (MIC=2.0 mg/l) to doxycycline. All the meningococci isolates were sensitive to ciprofloxacin in all the concentrations studied. **Key words:** meningococci, sensitivity to antibiotics, minimal inhibiting concentration.

Адрес для корреспонденции:

Глазкова Славяна Эдуардовна.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 237-69-89.

Н. В. ГРИБКОВА, Н. П. ШМЕЛЕВА, Н. В. СИВЕЦ

ЭПИДЕМИЯ ГРИППА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ В ПЕРВЫЙ ПОСТПАНДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН (2010—2011 гг.)

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Характеристика первого постпандемического эпидемического сезона по гриппу в Республике Беларусь.

Материал и методы. Выявление РНК вирусов гриппа, парагриппа и респираторно-синцитиального вируса проведено методом полимеразной цепной реакции. Выделение изолятов пандемического вируса гриппа осуществляли в культуре клеток MDCK. Результаты серологических исследований представлены базовыми лабораториями. Анализ заболеваемости осуществляли на основании статистических данных, представленных Республиканским научно-практическим центром медицинских технологий, информатизации, управления и экономики здравоохранения.

Результаты. Первая постпандемическая эпидемия гриппа началась в характерные для республики сроки, была

продолжительной (10 к. н.), средней интенсивности. По этиологической структуре эпидемия носила смешанный характер. Частота выявления РНК вирусов гриппа в период эпидемии составила 21,9%. Выделенные вирусы были типированы как вирусы гриппа А, аналогичные пандемическому вирусу гриппа A/California/7/2009(H1N1) и вирусы гриппа В, аналогичные эталонному штамму B/Brisbane/60/2008 (эволюционная линия B/Victoria/2/87). Результаты серологических исследований свидетельствуют о спорадических случаях, ассоциированных с вирусом гриппа А(H3N2). Наиболее часто отягощающими факторами являлись ожирение, диабет, хроническая сердечно-сосудистая патология, хронические заболевания органов дыхания и иммунодефицитные состояния. В возрастной структуре заболевших дети от 0 до 14 лет составили 46,8%. Наиболее высокая заболеваемость была зарегистрирована среди детей в возрасте от 5 до 14 лет (50,5% от всех зарегистрированных случаев заболеваний среди детей).

Заключение. Эпидемия гриппа в Республике Беларусь была продолжительной, средней интенсивности и носила смешанный характер. Наиболее часто заболевания регистрировались у детей 5—14 лет.

Ключевые слова: вирус гриппа, эпидемия гриппа, заболеваемость гриппом, полимеразная цепная реакция.

В 2009 г. мировое сообщество пережило очередную пандемию гриппа, вызванную распространением нового для человеческой популяции вируса грип-

па A/California/7/2009 (H1N1). Пандемический вирус циркулирует, пока не произойдет «взаимная адаптация человека и вируса после первоначального насыщения человеческой популяции вирусом» [1]. Это позволяет предполагать его активное участие в эпидемическом процессе следующих 2—3 лет. Первый постпандемический сезон всегда привлекает особое внимание в связи с продолжением циркуляции вируса, вызвавшего пандемию гриппа, более высокой заболеваемостью и преобладанием тяжелых форм заболевания. Мониторинг гриппа в Республике Беларусь осуществляется в соответствии с СанПиН № 132 в рамках дозорного надзора [2]. Согласно этому нормативному документу эпидемический сезон по гриппу в стране начинается с 40-й календарной недели (к. н.) предшествующего года и продолжается по 21-ю к. н. последующего года. Период с 22-й по 39-ю к. н. определен как межэпидемический.

Целью данной работы является характеристика первого постпандемического эпидемического сезона по гриппу в республике.

Материал и методы

Для выявления и выделения вирусов гриппа использовали назофарингиальные мазки, которые получали на протяжении эпидемического сезона по гриппу от больных с диагнозом «Острая респираторная вирусная инфекция» (ОРВИ), а также секционные материалы от умерших в результате респираторного заболевания. Материал для исследования поступал из всех административных регионов страны.

Для выявления РНК вирусов гриппа, парагриппа и респираторно-синцитиального вируса поступившие образцы исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени. В работе использовали диагностические наборы «АмплиСенс» (Россия). Постановку ПЦР проводили на приборе «Rotor Gen 6000» (Австралия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Выделение изолятов вирусов гриппа из клинических и секционных образцов, в которых методом ПЦР был выявлен вирусный генетический материал, осу-

ществляли пассированием в культуре клеток MDCK в соответствии с инструкцией «Комплексная лабораторная диагностика гриппа» №121-1210 от 18.01.2011 [3] и рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [4]. Репродукцию вируса оценивали микрометодом в реакции гемагглютинации, используя 0,75% суспензию эритроцитов человека 0 (I) группы крови.

Типирование выделенных изолятов проводили по стандартной методике в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с использованием диагностического набора ВОЗ на эпидемический сезон 2010—2011 гг.

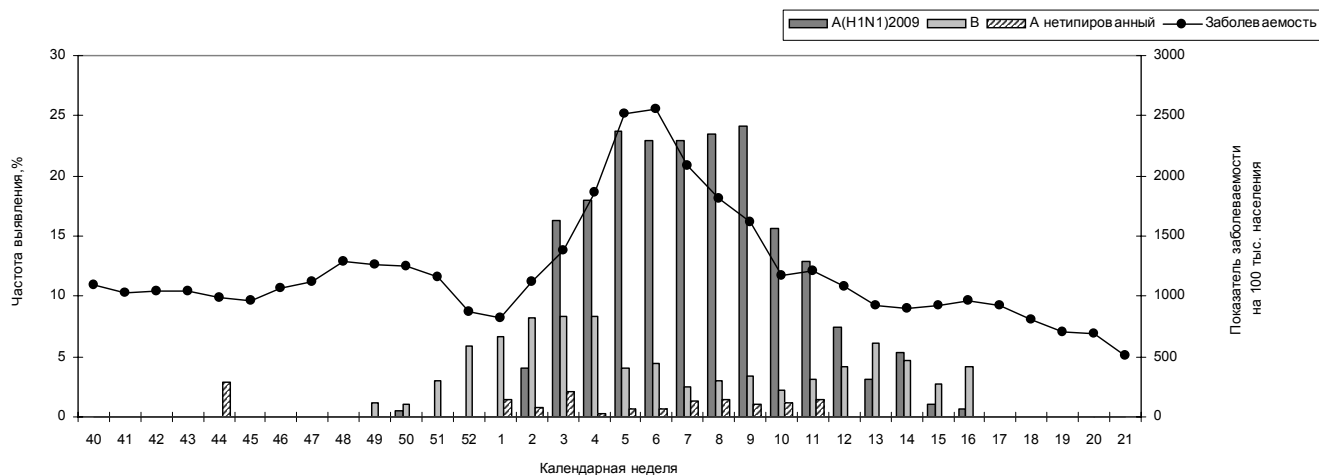
Результаты серологических исследований представлены базовыми лабораториями Национального центра по гриппу (НЦГ) — вирусологическими подразделениями микробиологических лабораторий областных Центров гигиены, эпидемиологии и общественного здравоохранения.

Статистические данные о респираторной заболеваемости представлены Республиканским научно-практическим центром медицинских технологий, информатизации, управления и экономики здравоохранения (РНПЦ МТ) в соответствии с нормативными документами [2].

Результаты и обсуждение

Эпидемическому сезону по гриппу предшествовала довольно высокая респираторная заболеваемость, не превышающая, однако, эпидемических уровней (рисунок). В период с 40-й по 48-й к. н. вирусы гриппа определялись в исследуемых образцах лишь спорадически. В клинических образцах, поступающих в НЦГ из всех административных регионов страны, с 49-й к. н. с возрастающей частотой стали выявлять генетический материал вирусов гриппа В. Включение на 3-й к. н. в эпидемический процесс вирусов гриппа А сопровождалось резким подъемом респираторной заболеваемости, превысившей эпидемический уровень (см. рисунок).

Из рисунка следует, что эпидемический рост респираторной заболеваемости в стране зарегистрирован на 3-й к. н. (17—23.01.11). Максимальных значе-



Динамика развития и этиология эпидемии гриппа в Республике Беларусь в эпидемический сезон 2010—2011 гг.

ний (2556 на 100 тыс. населения) показатель заболеваемости достиг к 5—6-й к. н. (31.01—13.02.11), затем он стал снижаться и к 12-й к. н. достиг неэпидемических значений (1083 на 100 тыс. населения). Длительность эпидемии составила 10 к. н.

В предыдущих работах авторов было показано, что эпидемии гриппа в Республике Беларусь, как правило, регистрируют в конце января — начале февраля [5]. Анализ статистических данных о респираторной заболеваемости в 2011 г. также свидетельствует о начале эпидемии в обычные для страны сроки (таблица). Вместе с тем, в отличие от эпидемий предыдущих лет, эпидемия 2011 г. характеризуется большей длительностью, интенсивностью и высоким показателем заболеваемости на пике развития эпидемии (см. таблицу).

Всего за период эпидемии заболело 17,3% населения контрольных городов. Среди взрослого населения самую высокую заболеваемость регистрировали у лиц 18—29 и 30—64 лет (45,4% и 51,1% соответственно), что сравнимо с наиболее пораженными возрастными группами в период пандемии 2009 г. [6]. Лица старше 65 лет болели реже, на их долю в возрастной структуре заболевших приходилось всего 3,5% случаев.

Во время пандемии 2009 г. заболеваемость детей от 0 до 14 лет была низкой, среди исследованных в НЦГ образцов 10,7% положительных находок приходилось на эту возрастную категорию [6, 7]. В период эпидемии 2010—2011 гг. 50% образцов, содержащих РНК вирусов гриппа, было получено от детей с респираторной симптоматикой в возрасте от 0 до 14 лет. Во время первой постпандемической эпидемии, как и в эпидемии, предшествовавшие пандемии, дети от 0 до 14 лет в возрастной структуре заболевших составили 46,8%. Как известно, более высокая интенсивность эпидемий гриппа среди детей по сравнению с таковой среди взрослых характерна для сезонных эпидемий гриппа на протяжении последних

20 лет [8]. Интенсивность эпидемии гриппа среди детского населения контрольных городов в последние годы не превышала 25%, однако в 2010—2011 гг. среди детей она была выше аналогичного показателя предпандемических лет и значительно превышала интенсивность эпидемического процесса в целом по стране, составив 53%. Наиболее высокая заболеваемость была отмечена среди детей в возрасте от 5 до 14 лет, на долю которых приходилось 50,5% зарегистрированных случаев респираторных заболеваний.

Анализ интенсивности эпидемий с 2005 по 2011 г. показал, что эпидемии гриппа в годы, предшествовавшие пандемии, были низкой интенсивности. Это было обусловлено длительной циркуляцией близкородственных штаммов вирусов гриппа (см. таблицу). С учетом основных показателей, приведенных в таблице, эпидемию гриппа в стране в первый постпандемический год можно отнести к эпидемиям средней интенсивности. Это могло быть связано как с продолжением активной циркуляции вирусов гриппа, родственных пандемическому вирусу A(H1N1)-2009, так и с эпидемическим распространением вирусов гриппа типа В.

По этиологической структуре эпидемия 2010—2011 гг., как и предшествовавшие пандемии эпидемии гриппа, носила смешанный характер, поскольку на протяжении всей эпидемии циркулировали вирусы гриппа А и В (см. рисунок). Этиологический пейзаж эпидемии претерпел изменения по мере развития процесса. Так, на первом этапе развития эпидемии (2—4-я к. н.) в этиологической структуре преобладали вирусы гриппа В, которые были типированы в РТГА как вирусы гриппа В, родственные эталонному штамму В/Brisbane/60/2008 (линия В/Victoria/2/87). Как показали лабораторные исследования, эпидемический рост респираторной заболеваемости с 4-й по 11-ю к. н. был связан с доминированием в исследуемых образцах вирусов гриппа А(H1N1)-2009. Выделенные вирусы гриппа А были типированы ПЦР и РТГА как вирусы гриппа,

Характеристика эпидемий гриппа в Республике Беларусь с 2006 по 2011 гг.

Основной показатель	Эпидемический сезон					
	2005—2006 гг.	2006—2007 гг.	2007—2008 гг.	2008—2009 гг.	2009—2010 гг. (пандемия)	2010—2011 гг.
Подъем заболеваемости	10-я к. н.	7-я к. н.	4-я к. н.	4-я к. н.	43-я к. н.	3-я к. н.
Продолжительность эпидемии	4 к. н.	5 к. н.	6 к. н.	9 к. н.	7 к. н.	10 к. н.
Показатель заболеваемости на пике эпидемии на 100 тыс. населения	1270	1850	1510	1790	3200	2556
Процент заболевших от всего населения контрольных городов	3,4	5,3	4,85	9,9	27	17,3
Из них дети до 14 лет, %	51,0	40,5	47,5	50,9	10,7*	46,8
Характер эпидемии	Смешанный	Смешанный	Смешанный	Смешанный	Моноинфекция	Смешанный
Преобладающие вирусы	А (H3N2), В/Yamagata/ 16/88	А(H3N2), В/Yamagata/16/ 88	А (H1N1), В/Yamagata/16/ 88	А(H3N2); В/Victoria/2/87	А(H1N1)-2009	А(H1N1)-2009; В/Victoria/2/87

*Среди положительных образцов, исследованных в НЦГ.

родственные пандемическому вирусу A/California/7/2009(H1N1). Результаты типирования выделенных в период эпидемии изолятов вирусов гриппа A(H1N1) и гриппа B свидетельствуют об их соответствии вакцинным штаммам, использовавшимся в стране для профилактики гриппа в эпидемический сезон 2010—2011 гг.

Преобладание пандемических вирусов гриппа в анализируемых образцах наблюдали вплоть до 12-й к. н. В последующие недели эпидемического сезона доминирующим типом вновь стал вирус гриппа типа B (см. рисунок). Следует отметить, что аналогичный этиологический пейзаж эпидемии наблюдали и в ряде европейских стран [9]. Результаты генетического анализа выделенных в европейских странах вирусов гриппа A(H1N1)-2009 свидетельствуют о гомогенности циркулировавших вирусов гриппа, что позволяет ожидать их участие в развитии эпидемии гриппа в предстоящем сезоне. Вместе с тем проведенные исследования выявили генетические различия у небольшого числа эпидемических вирусов гриппа. На основании этих различий вирусы гриппа A(H1N1)-2009 были объединены в несколько кластеров [10]. Данная информация свидетельствует о начавшихся дрейфовых изменениях в популяции вирусов гриппа A(H1N1)-2009.

За 10 нед эпидемии в НЦГ поступило 540 клинических и секционных образцов. В 118 образцах методом ОТ-ПЦР была выявлена РНК вирусов гриппа А и В. Частота выявления вирусов гриппа в период эпидемии в анализируемых образцах составила 21,9%. Среди положительных образцов преобладали вирусы гриппа А, аналогичные пандемическим вирусам гриппа A/California/7/2009(H1N1) (83 или 70,3% случая), и вирусы, ассоциированные с вирусом гриппа В (35 или 29,7% случаев).

В зависимости от тяжести клинической картины в соответствии с СанПиН №132 респираторные заболевания подразделяются на гриппоподобные заболевания (ГПЗ) и тяжелые острые респираторные инфекции (ТОРИ) [2]. Из 540 исследованных в НЦГ образцов 303 (56,1%) получены от больных с ГПЗ. Частота выявления вирусной РНК составила 25,4% (77 случаев). В 48 (62,3%) случаях ГПЗ были ассоциированы с пандемическим вирусом A/California/7/2009(H1N1) и в 29 (37,7%) — с вирусом гриппа В.

Из исследованных 540 случаев к категории ТОРИ отнесено 237 (43,9%) образцов. Частота выявления РНК вирусов гриппа в этой категории образцов составила 17,3% (41 образец). Этиологическая структура ТОРИ следующая: 33 (80,5%) случая были ассоциированы с вирусами, подобными A/California/7/2009(H1N1), и 8 (19,5%) — связаны с вирусами гриппа В.

В период эпидемии из группы ТОРИ в НЦГ исследовано 76 (14,1%) случаев, закончившихся летально. Генетический материал респираторных вирусов выявлен в 16 (21%) образцах. В 15 случаях обнаружена РНК вирусов гриппа А и В. В подавляющем числе образцов (14 случаев) выявлена РНК пандемического вируса A(H1N1)-2009. Вирус гриппа типа В отмечен лишь в одном случае. Еще один ле-

тальный исход ассоциирован со смешанной вирусной инфекцией: методом ПЦР в материале выявлен генетический материал вируса парагриппа 2-го типа и респираторно-синцитиального вируса. В других летальных случаях генетический материал вирусов гриппа А и В не выявлен.

Примечательно, что исследованные случаи с летальным исходом характеризовались наличием одного или более факторов риска, осложнивших течение заболевания. Наиболее часто среди сопутствующих заболеваний отмечались сахарный диабет, ожирение, заболевания сердечно-сосудистой системы, другие хронические соматические заболевания и иммунодефицитные состояния. Следует также отметить, что в сопроводительных документах к этим образцам ни в одном случае не было указания на проведенную вакцинопрофилактику гриппа. Отсутствие иммунизации против гриппа в условиях полного совпадения вакцинных и эпидемических штаммов могло осложнить течение заболевания у пациентов, относящихся к группам риска развития постгриппозных осложнений.

В своей деятельности НЦГ опирается на базовые лаборатории, расположенные на всех административных территориях Беларуси, что позволяет получить общее представление о развитии эпидемического процесса в стране. Базовые лаборатории НЦГ за период эпидемии исследовали 619 парных сывороток от пациентов, перенесших респираторные заболевания. Как показал проведенный в НЦГ анализ этих результатов, в 37% исследованных пар был выявлен диагностический прирост титров антител к вирусам гриппа А. Среди положительных сывороток в 9,6% случаев в РТГА выявлен диагностический прирост антител к вирусу гриппа А(H3N2), что свидетельствует о спорадических заболеваниях, вызванных этим субтипом вируса гриппа.

Учитывая этиологическую структуру эпидемии гриппа и эпидемическую ситуацию в Беларуси, в сопредельных и в странах дальнего зарубежья, можно полагать, что эпидемия гриппа 2011—2012 гг. в стране будет средней тяжести. В этиологической структуре будут преобладать вирусы гриппа A(H1N1)-2009 и вирусы гриппа А(H3N2). Вирусы гриппа В двух эволюционных линий также могут принимать участие в развитии эпидемического процесса. Среди заболевших будут преобладать дети, преимущественно от 0 до 14 лет. Риску заболевания будут подвержены также лица старше 65 лет и лица, входящие в группу риска развития заболевания и постгриппозных осложнений.

Принимая во внимание генетический анализ изолятов вирусов гриппа, полученных диагностическими центрами ВОЗ со всех регионов мира на протяжении эпидемического сезона 2010—2011 гг., эксперты ВОЗ рекомендовали для профилактики гриппа в 2011—2012 гг. для стран Северного полушария следующий состав противогриппозной вакцины:

- подобные A/California/7/2009 (H1N1);
- подобные A/Perth/16/2009 (H3N2);
- подобные B/Brisbane/60/2008 [11].

Выводы

1. Эпидемия гриппа 2011 г. в Республике Беларусь началась в характерные для страны сроки, была продолжительной (10 к. н.) и средней интенсивности (заболело 17,3% населения контрольных городов).

2. Данные лабораторной диагностики свидетельствуют о смешанном характере эпидемии. Начало и завершение эпидемии были связаны с циркуляцией вирусов гриппа В, аналогичных эталонному штамму В/Brisbane/60/2008 (эволюционная линия В/Victoria/2/87). В период развития эпидемии в этиологической структуре преобладали вирусы гриппа А, аналогичные пандемическому вирусу гриппа А/California/7/2009(H1N1). Результаты исследования парных сывороток свидетельствуют также о спорадических заболеваниях, вызванных вирусами гриппа А(H3N2).

3. Штаммовый состав трехвалентной гриппозной вакцины, которую использовали в стране для профилактики гриппа в эпидемический сезон 2010—2011 гг., соответствовал вирусам гриппа, циркулировавшим во время эпидемии, что могло способствовать снижению заболеваемости гриппом или уменьшению тяжести заболевания среди привитых.

4. Дети от 0 до 14 лет в возрастной структуре заболевших составили 46,8%. Наиболее высокая заболеваемость была зарегистрирована среди детей в возрасте от 5 до 14 лет, на долю которых приходилось 50,5% зарегистрированных случаев респираторных заболеваний среди детского населения контрольных городов.

5. Полученная статистическая информация о заболевших в период эпидемии свидетельствует о том, что, как и во время пандемии, факторами риска развития осложнений были такие сопутствующие заболевания, как сахарный диабет, ожирение, заболевания сердечно-сосудистой системы, иммунодефицитные состояния и другие хронические заболевания. Обращает на себя внимание и тот факт, что большинство лабораторно обследованных лиц, входивших в так называемые группы риска развития заболеваний и осложнений, не были вакцинированы против гриппа.

6. Исследования, проведенные в рамках дозорного надзора за гриппом в период пандемии 2009 г. и эпидемии гриппа в первый постпандемический сезон, подтвердили необходимость регулярного динамического мониторинга циркуляции вирусов гриппа в стране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Килбурн Е. Д. Вирусы гриппа и грипп / Под ред. Е. Д. Килбурна.— М., 1978.
2. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» № 132 от 12 октября 2010 г.
3. Инструкция «Комплексная лабораторная диагностика гриппа» № 121-1210 от 18.01.2011 г., утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь.

4. WHO Information for laboratory diagnosis of new influenza A (H1N1) virus in humans // [Electronic resource].— 2011.— Mode of access: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf.

5. Грибкова Н. В., Коржунов В. М., Кожемякин А. К., Тумов Л. П. // *Здравоохранение*.— 1997.— № 1.— С. 29—31.

6. Грибкова Н. В., Шмелева Н. П., Сивец Н. В. *Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. тр.*— Минск, 2010.— Вып. 3.— С. 21—24.

7. Сергиенко Е. Н., Германенко И. Г., Грибкова Н. В. и др. // *Мед. панорама*.— 2011.— № 2.— С. 3—7.

8. Иванников Ю. Г., Парсагашвили Е. З., Жуков А. О. // *Вестн. АМН*.— 1995.— № 9.— С. 3—7.

9. *EuroFlu* № 400 // http://www.euroflu.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi.

10. *EuroFlu* №401 // http://www.euroflu.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi.

11. *Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2011—2012 northern hemisphere influenza season* // *Weekly Epidemiol. Record*.— 2011.— Vol. 86, № 10.— P. 81—91.

Поступила 18.07.11.

INFLUENZA EPIDEMIC IN THE REPUBLIC OF BELARUS DURING THE FIRST POSTPANDEMIC SEASON OF 2010 – 2011

N. V. Gribkova, N. P. Shmelyova, N. V. Sivets

Objective. Description of the first influenza postpandemic season in the Republic of Belarus.

Materials and methods. The influenza, parainfluenza, and respiratory syncytial virus RNAs were detected in the polymerase chain reaction. The influenza pandemic virus isolates were isolated in the MDCK cells culture. The serological assay results were presented by the basic laboratories. The morbidity prevalence was analyzed basing on the statistical values presented by the Republican Scientific and Practical Center of Medical Technologies, Management and Economy of Public Health.

Results. The first postpandemic influenza epidemic started in the terms characteristic for the Republic, it was long (10 c. w.) and of a moderate intensity. The epidemic etiological structure had a mixed character. The viruses RNA isolation occurrence during the epidemic was 21.9%. The viruses isolated were typed as influenza A viruses similar the influenza pandemic virus A/California/7/2009(H1N1) and influenza B viruses similar the referent strain B/Brisbane/60/2008 (B/Victoria/2/87 evolution line). The serological assay findings evidenced about sporadic cases associated with the influenza A (H3N2) virus. The prevailing burdening factors were the following: obesity, diabetes, chronic cardiovascular pathology, chronic respiratory disease and immunity deficiency associated states. Children aged 0 to 14 years accounted for 46.8% in the age structure of those fallen ill. The highest incidence rate was registered among children aged 5 to 14 years (50.5% of the number of cases registered for children).

Conclusion. The influenza epidemic in the Republic of Belarus was long, moderate and had a mixed character. The disease was registered most often in children aged 5 to 14 years.

Key words: influenza virus, influenza epidemic, influenza incidence, polymerase chain reaction.

Авторы выражают благодарность за предоставление результатов серологических исследований сотрудникам базовых лабораторий НЦГ — вирусологических подразделений микробиологических лабораторий областных Центров гигиены, эпидемиологии и общественного здравоохранения.

Адрес для корреспонденции:

Грибкова Наталья Васильевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 237-62-95.

Н. В. ПОКЛОНСКАЯ, Т. В. АМВРОСЬЕВА,
А. А. БЕЗРУЧКО, П. И. ГРИНКЕВИЧ, А. В. ХИЛО,
Е. П. КИШКУРНО

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии
Минздрава Республики Беларусь, Белорусская
медицинская академия последипломного образования

Цель исследования. Дать сравнительную оценку вклада норовирусной инфекции в заболеваемость детей острыми кишечными инфекциями вирусной этиологии в 2009—2011 гг. (на примере Минского региона) и разработать схему их молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Материал и методы. У 253 детей, госпитализированных в детскую инфекционную клиническую больницу Минска с различными формами острой кишечной инфекции, были взяты пробы фекалий. Диагностику норовирусной инфекции проводили методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем. Полученные результаты показали, что частота выявления норовирусов в 2011 г. увеличилась в 2,5—1,88 раза по сравнению с 2009 г.

Результаты. Разработка схемы молекулярно-эпидемиологических исследований норовирусов включала: выбор оптимального участка генома, выбор/дизайн праймеров и разработку условий амплификации исследуемого фрагмента ДНК, а также выбор оптимальной модели эволюции и метода филогенетической реконструкции. В качестве мишени выбраны фрагменты генов VP1 и RdRp, подобраны оптимальные условия их накопления. Установлено, что при использовании для филогенетического анализа фрагмента гена VP1 статистически достоверный результат генотипирования может быть получен с помощью филогенетической реконструкции методом присоединения ближайшего соседа или Байесовского эволюционного анализа.

Заключение. При использовании фрагмента гена RdRp филогенетическая реконструкция методом присоединения ближайшего соседа может приводить к получению статистически недостоверного результата, поэтому для генотипирования норовирусов по региону RdRp следует использовать Байесовский эволюционный анализ.

Ключевые слова: норовирус, кишечная инфекция, генотип, молекулярно-эпидемиологический мониторинг.

Норовирусы (НВ) — широко распространенные вирусные агенты острого гастроэнтерита (ОГЭ). По частоте вызываемых заболеваний у детей НВ уступают только ротавирусам, у взрослых они занимают лидирующее положение [1]. В последнее десятилетие установлена доминирующая роль НВ в развитии вспышек ОГЭ, особенно в развитых странах. Проведенные ранее исследования показали, что в 1997—2000 гг. НВ вызвали 93% от всех вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ), зарегистрированных в США, в странах Европы в 1995—2000 гг. — 85% [2, 3]. Зимой 2008 г. значительный подъем заболеваемости ОКИ вследствие норовирусной инфекции был зарегистрирован в Великобритании: еженедельно фиксировали около 200 000 случаев заболевания, общее количество заболевших составило 2,8 млн человек. В этот период экономика Великобритании теряла, по оценкам экспертов, в среднем около 12 млн фунтов стерлингов в неделю [4].

Чрезвычайно высокая генетическая и антигенная изменчивость НВ делают сложной задачу по разработке специфических средств вакцинопрофилактики. Поэтому сегодня единственным эффективным средством снижения заболеваемости, вызванной НВ, является тщательный эпидемический надзор за их циркуляцией, основанный на результатах лабораторного контроля, и проведение соответствующих противозидемических мероприятий. Исходя из этого, в различных странах мира активно разрабатываются и внедряются национальные системы эпиднадзора за НВ. В 1999 г. лаборатории 13 европейских стран объединились в единую сеть по надзору за кишечными вирусами, контаминирующими продукты питания, — FBVEnet. В ходе проведенных ими исследований было установлено, что именно НВ обладают наибольшей эпидемической значимостью и наносят значительный ущерб экономике и здоровью населения различных стран [5]. После этого основные усилия FBVEnet были сосредоточены на проведении эпиднадзора за возбудителями норовирусной инфекции. Со временем к этой сети присоединилось значительное количество государств, в настоящее время она трансформировалась в международную сеть эпидемиологического надзора за НВ — NoroNet, включающую лаборатории США, Канады, Никарагуа, Венесуэлы, Чили, России, Нидерландов, Великобритании, Германии, Венгрии, Франции, Швеции, Израиля, Японии, Китая, Индии, Малайзии, Новой Зеландии и Австралии. Основным звеном NoroNet является система молекулярно-эпидемиологического мониторинга — сбор и обмен информацией о генетических характеристиках циркулирующих вариантов НВ, их генотипах и субгенотипах [6].

Создание национальной системы надзора за возбудителями норовирусной инфекции в Республике Беларусь является сегодня одной из актуальных задач. Базовое звено такой системы — эффективная лабораторная диагностика данной патологии, а также разработка и внедрение критериев для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований НВ.

Целью работы была сравнительная оценка вклада норовирусной инфекции в заболеваемость детей ОКИ вирусной этиологии в 2009—2011 гг. (на примере Минского региона) и разработка схемы их молекулярно-эпидемиологических исследований, включающей выбор участков генома для генотипирования с последующей оптимизацией условий амплификации и секвенирования, а также оценка эффективности использования филогенетического анализа в применении к двум различным регионам генома для генотипирования НВ.

Материал и методы

Материалом для исследований служили пробы фекалий, полученные от 253 детей, госпитализированных в городскую детскую инфекционную клиническую больницу (ГДИКБ) Минска с различными формами ОКИ.

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

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции «RevertAid», включающего обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей Молони («Fermentas», Литва). Для инициации реакции обратной транскрипции использовали *gandom*-праймеры (синтетические гексануклеотиды случайной последовательности). РНК подвергали предварительному нагреванию до 70°C в течение 5 мин для денатурации вторичных структур с последующим отжигом праймеров при 37°C в течение 15 мин (25°C, 25 мин в случае использования *gandom*-праймеров) и синтезом кДНК при 42°C в течение 60 мин.

Диагностику норовирусной инфекции проводили с использованием коммерческого набора «Norovirus 1,2 genotypes-EPh» («АмплиСенс»), а также нескольких наборов праймеров, ранее описанных в литературе [7—10]. Результаты амплификации учитывали с помощью горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом свете. Для определения размера ампликонов использовали ДНК-маркер «GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus» («Fermentas»).

Для секвенирования участков генома НВ, обнаруженных в пробах фекалий, использовали фрагмент 340 нт, локализованный в пределах 3' RdRp и амплифицируемый с помощью праймеров JV12/JV13, а также фрагмент 280 нт, локализованный в гене VP1. Матрицу для проведения реакции секвенирования получали путем вырезания из геля с помощью стерильных инструментов фрагмента, содержащего амплифицированную ДНК нужного размера, которую затем очищали с помощью набора «GenElute Gene Extraction Kit» («Sigma», США). Количество ДНК в очищенной пробе определяли спектрофотометрически с помощью спектрофотометра «Beckman Coulter DU730».

Обратную транскрипцию, ПЦР и реакцию термодинамического секвенирования проводили на ПЦР-амплификаторе «MJ mini» («BioRad», США). Для секвенирования участков ДНК использовали метод терминации цепи в термодинамической реакции на ДНК-анализаторе «CEQ8000» с использованием коммерческого набора «DTCS Quick Start Kit» (все — производства «Beckman coulter»). В соответствии с инструкцией количество ДНК-матрицы, вносимой в реакцию, составляло 50—100 фемтомоль.

Полученные нуклеотидные последовательности (прямую и обратную) для каждой исследуемой пробы выравнивали относительно друг друга для удаления неясных оснований и получения консенсусных последовательностей, которые использовали для дальнейшей работы.

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных NCBI с помощью программы BLAST [11]. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, филогенетическую реконструкцию и определение достоверности ее топологии) осуществляли с помощью программы MEGA 5.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) [12]. Определение оптимальной математической модели нуклео-

тидных замен проводили методом максимального правдоподобия с использованием скорректированного информационного критерия Акаике (AICc). Модель с минимальным значением AICc была выбрана в качестве оптимальной. Для филогенетической реконструкции использовали метод присоединения ближайшего соседа (NJ) имплементированный в MEGA 5.0 [13]. Достоверность топологии филогенетических древ оценивали методом псевдореплик (bootstrapping). Для оценки достоверности топологии по каждому дереву были проанализированы 1000 псевдореплик [14].

В качестве альтернативного метода филогенетической реконструкции использовали Байесовский статистический подход, имплементированный в BEAST 1.6.1 [16]. При использовании данного подхода применялась SRD06-модель нуклеотидных замен с учетом гамма-распределения уровня вариабельности сайтов, а также алгоритм Монте-Карло с применением цепи Маркова (10 млн генераций). Эволюционная история была суммирована в виде дерева с максимальной достоверностью топологии.

Результаты и обсуждение

Для определения распространенности норовирусной инфекции и ее вклада в заболеваемость ОКИ на территории нашей страны в 2009—2011 гг. проводилась лабораторная диагностика НВ в образцах фекалий детей, госпитализированных в ГДИКБ с различными формами ОКИ. Всего было обследовано 253 пациента, в том числе 96 больных в 2009 г., 94 — в 2010 г., 63 — в 2011 г. Диагностику проводили в период наибольшей активности НВ (январь—март). Полученные результаты позволили установить присутствие норовирусной инфекции у 20,8% пациентов в 2009 г., 28,7% — в 2010 г. и у 39,6% — в 2011 г. Эти данные свидетельствовали о значительном росте заболеваемости норовирусной инфекцией в 2011 г. по сравнению с предшествующими годами (рис. 1). Из представленных данных видно, что наибольшая доля норовирусной инфекции у больных ОКИ была зарегистрирована в марте 2010 г. (34,6%) и январе — феврале 2011 г. (43,5% и 42,3% соответственно). По сравнению с 2009 г. частота выявления НВ у больных ОКИ увеличилась в 1,88—2,5 раза. Такой значительный

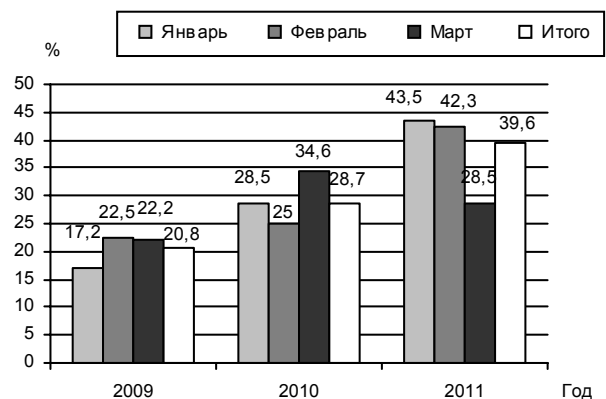


Рис. 1. Заболеваемость норовирусной инфекцией детей Минска в 2009—2011 гг.

подъем заболеваемости, согласно литературным данным, может быть обусловлен появлением нового эпидемического варианта НВ, представляющего собой новый геновариант, или даже генотип возбудителя [6, 10]. Идентификация нового геноварианта НВ, появившегося в Минске в 2010 г., осуществлена в предыдущих исследованиях. Было высказано предположение о возможности подъема заболеваемости норовирусной инфекцией в 2011 г. [15]. Результаты лабораторной диагностики, представленные в настоящей работе, подтвердили это предположение.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения более масштабного молекулярно-эпидемиологического мониторинга НВ с регулярной идентификацией циркулирующих генотипов и геновариантов. Осуществление подобных исследований невозможно без разработки и внедрения четкой схемы молекулярно-эпидемиологического мониторинга НВ, включающей:

- выбор оптимального участка генома НВ;
- выбор/дизайн праймеров и разработка условий амплификации исследуемого фрагмента ДНК;
- выбор оптимальной модели эволюции и метода филогенетической реконструкции.

Для осуществления эффективного генотипирования и выделения отдельных генетических групп крайне важным является корректный выбор исследуемого фрагмента генома возбудителя. Наиболее информативным (но и сложным) является, безусловно, анализ полного генома вируса, позволяющий учитывать различную скорость эволюции в отдельных генах, а также влияние рекомбинационных процессов при их наличии. Однако такой анализ, как правило, не является необходимым для решения отдельных задач молекулярной эпидемиологии, из-за значительной сложности он чаще используется для изучения фундаментальных вопросов вирусной эволюции или получения детальной характеристики отдельных штаммов, обладающих уникальными и представляющими значительный интерес свойствами. В исследованиях, посвященных генотипированию и/или молекулярно-эпидемиологическому мониторингу вирусов, проводят анализ небольших регионов генома — от 200 до 1000 нт. В этом случае некорректный выбор участка генома для анализа может привести к получению неправильного результата из-за излишней консервативности выбранного фрагмента, что влечет за собой отсутствие статистически значимых нуклеотидных различий, позволяющих сгруппировать эволюционно до-

статочно близкие геноварианты вируса. В противоположном случае, когда используется гипервариабельный участок, анализ может быть затруднен присутствием «эволюционного шума». Поэтому выбор фрагмента генома, в отношении которого будет проводиться дальнейший анализ, должен четко соответствовать поставленным целям и задачам исследования.

Анализ литературы показал, что наиболее часто для генотипирования НВ используют фрагменты генов РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) и основного капсидного белка VP1 [7]. Применение каждого из этих регионов имеет свои плюсы и минусы. Ген RdRp обладает достаточно высокой степенью консервативности, что характерно для неструктурных белков вирусов, однако из-за высокой вариабельности норовирусного генома в целом в нем обнаруживается достаточный уровень различий для выявления и идентификации вирусов, принадлежащих к одному или разным генотипам. Кроме того, из-за относительно невысокой вариабельности накопление исследуемого фрагмента в пределах RdRp возможно с использованием невырожденных или 2—4-кратно вырожденных праймеров, что обеспечивает высокую чувствительность реакции. Так как НВ являются некультивируемыми вирусами, накопление достаточного количества их генетического материала в условиях лаборатории не представляется возможным, поэтому высокая чувствительность реакции, направленной на амплификацию фрагмента из клинической пробы для его последующего секвенирования, является безусловным плюсом. Исследование фрагмента гена VP1 позволяет идентифицировать не только генотипы, но и отдельные эпидемические варианты вирусов, так как гены, кодирующие капсидные белки, традиционно характеризуются максимальной степенью вариабельности у различных групп вирусов. По этой причине все больше исследователей в настоящее время используют именно фрагмент гена VP1 для молекулярно-эпидемиологического мониторинга НВ. Однако его рутинное применение в качестве мишени для амплификации значительно затрудняется необходимостью использования высоковырожденных праймеров, заведомо обладающих меньшей чувствительностью, а также необходимостью регулярной замены и/или модификации праймеров (через 3—4 года) из-за быстрого накопления нуклеотидных замен в исследуемом регионе.

Основываясь на вышеизложенном, было выбрано 4 набора праймеров для амплификации исследуемых регионов генома НВ (таблица), один из которых

Праймеры, использованные для амплификации фрагментов генов RdRp и VP1 норовирусов

Праймер	Последовательность праймеров	Локализация в геноме НВ	Источник
JV12/ JV13	ATACCACTATGATGCAGATTA TCATCATCACCATAGAAAGAG	RdRp	[7]
G1—SKF G1—SKR	CTGCCCGAATTYGTAATGA CCAACCCARCCATRTACA	VP1	[8]
COG2F G2—SKR	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	-/-	[9]
Cap C Cap D3 Cap D1	CCT TYC CAK WTC CCA YGG TGY CTY ITI CCH CAR GAA TGG TGT CTR STC CCC CAG GAA TG	-/-	[10]

был представлен невырожденными праймерами, локализованными в гене RdRp. Для эффективной амплификации фрагмента гена VP1 выбрано 3 различных набора праймеров с целью дальнейшего определения их чувствительности и возможности практического применения.

Все 4 набора праймеров использованы для накопления соответствующих фрагментов генома НВ из проб клинического материала, присутствие вирусов в которых подтверждено с использованием коммерческих ПЦР тест-систем. Полученные результаты показали, что эффективная амплификация достигалась только с помощью 1-го и 4-го наборов (рис. 2, 3), тогда как 2-й и 3-й наборы демонстрировали низкую чувствительность и отсутствие накопления специфического продукта.

Определены оптимальные условия амплификации с каждым из использованных наборов праймеров. Установлено, что оптимальные условия амплификации для праймеров JV12/N13 были следующими: 95°C — 15 с, 42°C — 45 с, 72°C — 30 с, 42 цикла амплификации. В отношении праймеров Cap C, D1, D3 оптимальными признаны условия: 95°C — 15 с, 50°C — 1 мин, 72°C — 30 с, 42 цикла амплификации.

Амплифицированные фрагменты ДНК 6 различных НВ, соответствующие участкам генов RdRp и VP1, были секвенированы и подвергнуты сравнительному анализу для определения оптимального алгоритма генотипирования. Для выбора оптимальной модели эволюции на первом этапе с помощью программы MEGA 5.0 рассчитаны значения максимального правдоподобия для 24 математических моделей нуклеотидных замен, а также показатели AICc для сравне-

ния значений максимального правдоподобия для каждой из них. Полученные результаты показали, что оптимальной моделью нуклеотидных замен для филогенетической реконструкции на основании блоков данных, включающих нуклеотидные последовательности фрагментов генов RdRp и VP1, была двухпараметрическая модель Кимуры, учитывающая различные уровни замен для разных сайтов последовательности (G-распределение). Значение параметра α , определяющего форму гамма-распределения, составило 0,29 — для гена RdRp и 0,36 — для гена VP1. С использованием этих параметров методом NJ была осуществлена филогенетическая реконструкция по каждому из исследуемых регионов генома. Помимо анализируемых нуклеотидных последовательностей 6 НВ, циркулировавших в 2009—2010 гг. в Минске, в анализ были включены нуклеотидные последовательности 19 прототипных штаммов различных генотипов НВ генотипа II (GII.1—GII.19). В качестве внешней группы использовали соответствующие фрагменты генома вируса *Norwalk*, который по современной классификации относится к генотипу 1 GI.1. Полученные результаты показали, что все 6 исследованных НВ группировались в общий кластер с прототипным штаммом *Hu/GII.4/Bristol/1993/UK* как по региону RdRp, так и по региону VP1 (рис. 4, а и 4, б соответственно). Однако бутстреп-показатель для данного кластера по региону RdRp составил 37% (см. рис. 4, а), что значительно ниже порогового значения 70%, принятого для оценки статистической достоверности филогенетического группирования. На филогенетическом древе, построенном по фрагменту гена VP1 (см. рис. 4, б), значение бутстреп-показателя для кластера, в который входят исследуемые нуклеотидные последовательности НВ и прототипный штамм *Hu/GII.4/Bristol/1993/UK*, составило 99%, что позволило сделать статистически обоснованный вывод о принадлежности исследуемых нуклеотидных последовательностей к генотипу GI.4. Полученные результаты продемонстрировали преимущество использования фрагмента гена VP1 НВ в качестве мишени при проведении филогенетического анализа методом NJ.

Параллельно с использованием тех же двух блоков данных, включающих фрагменты нуклеотидных последовательностей генов VP1 и RdRp, проведена филогенетическая реконструкция с помощью Байесовского эволюционного анализа [17]. Получены 2 филогенетических древа (рис. 5) с максимальной достоверностью топологии. Судя по рисунку, исследуемые нуклеотидные последовательности группировались с прототипным штаммом *Hu/GII.4/Bristol/1993/UK* с высокой достоверностью как по региону RdRp, так и по региону VP1 (для фрагмента RdRp значение апостериорной вероятности составило 0,88, для фрагмента VP1 — 1,0). Таким образом, применение Байесовского эволюционного анализа для филогенетической реконструкции позволило получить корректный результат генотипирования НВ по двум использованным регионам генома.

В ходе выполнения исследований экспериментально обоснована схема проведения молекулярно-

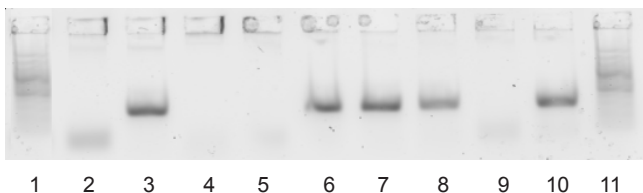


Рис. 2. Накопление фрагмента гена RdRp НВ для его последующего секвенирования: дорожки 1, 11 — маркер молекулярного веса, 2 — ОК, 3—10 — пробы, содержащие кДНК НВ: накопление фрагмента гена RdRp 340 нт зарегистрировано в 3, 6, 7, 8, 10 дорожках

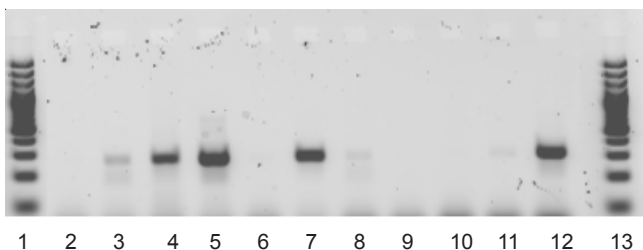
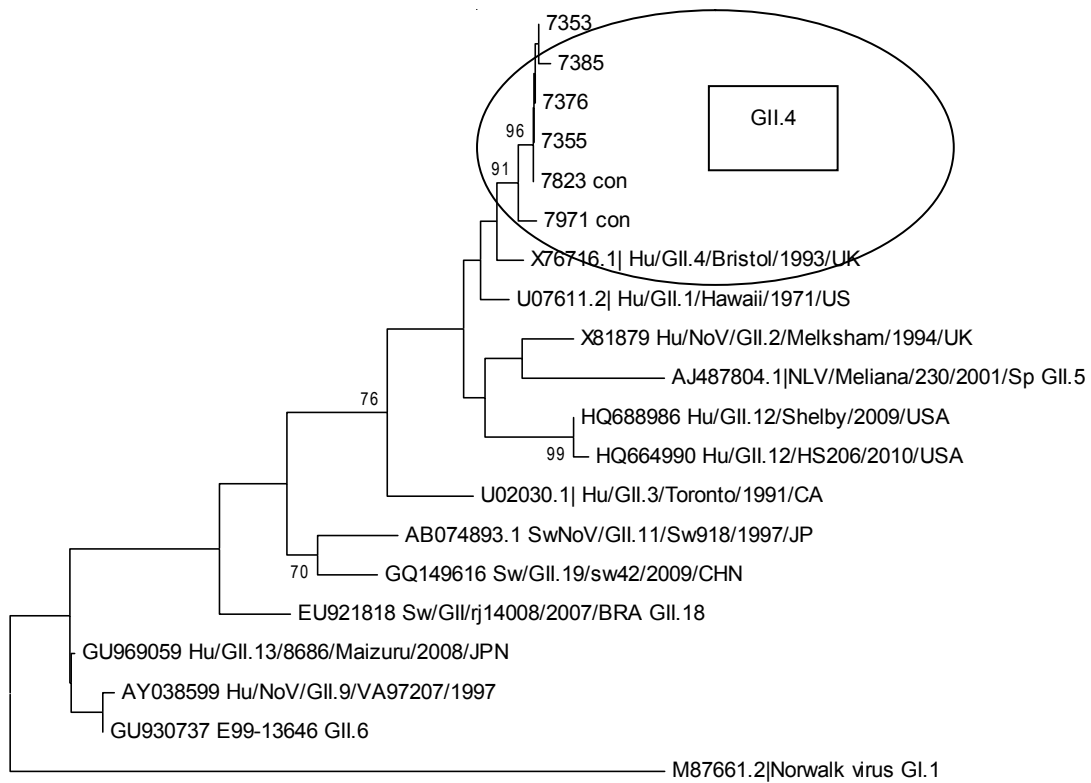


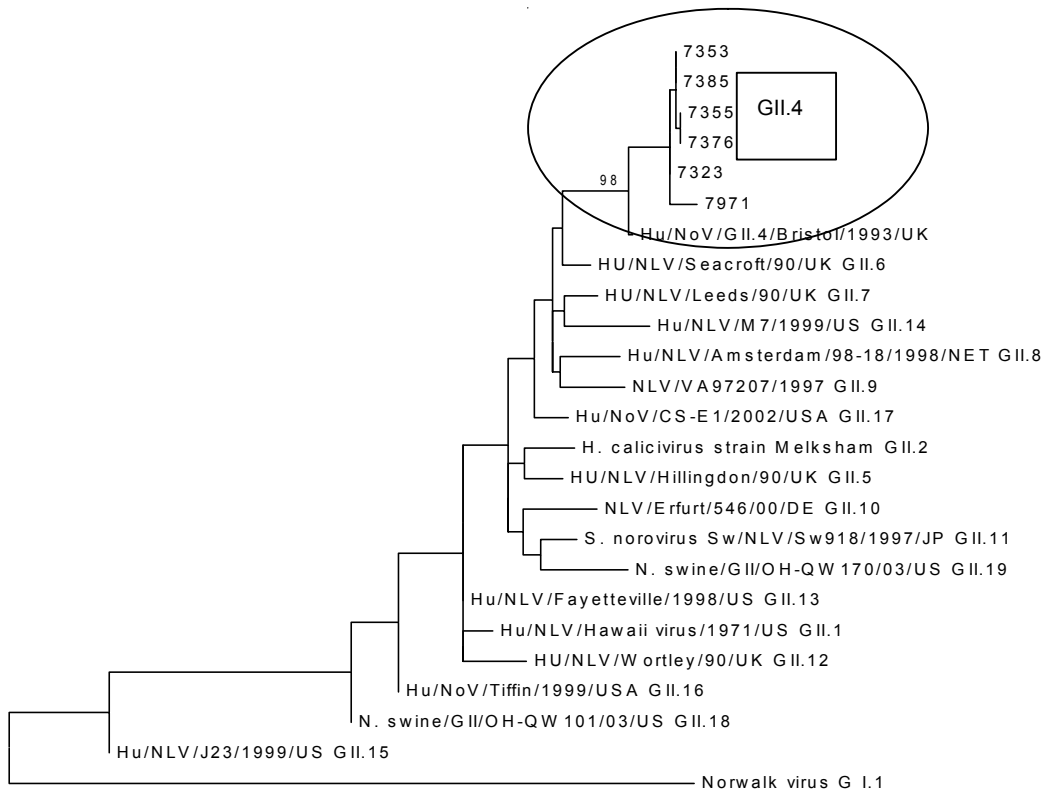
Рис. 3. Накопление фрагмента гена VP1 НВ для его последующего секвенирования: дорожки 1 — маркер молекулярного веса, 2, 13 — ОК, 3—10 — пробы, содержащие кДНК НВ: накопление фрагмента гена VP1 280 нт зарегистрировано в 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12 дорожках

40 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней



0.1

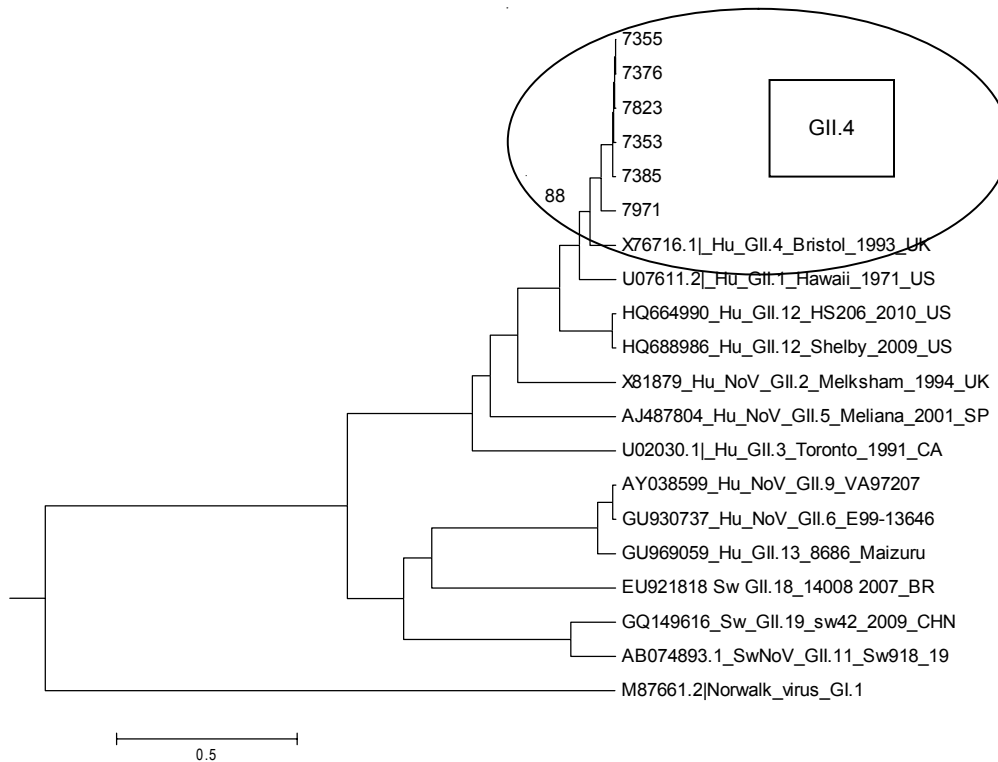
a



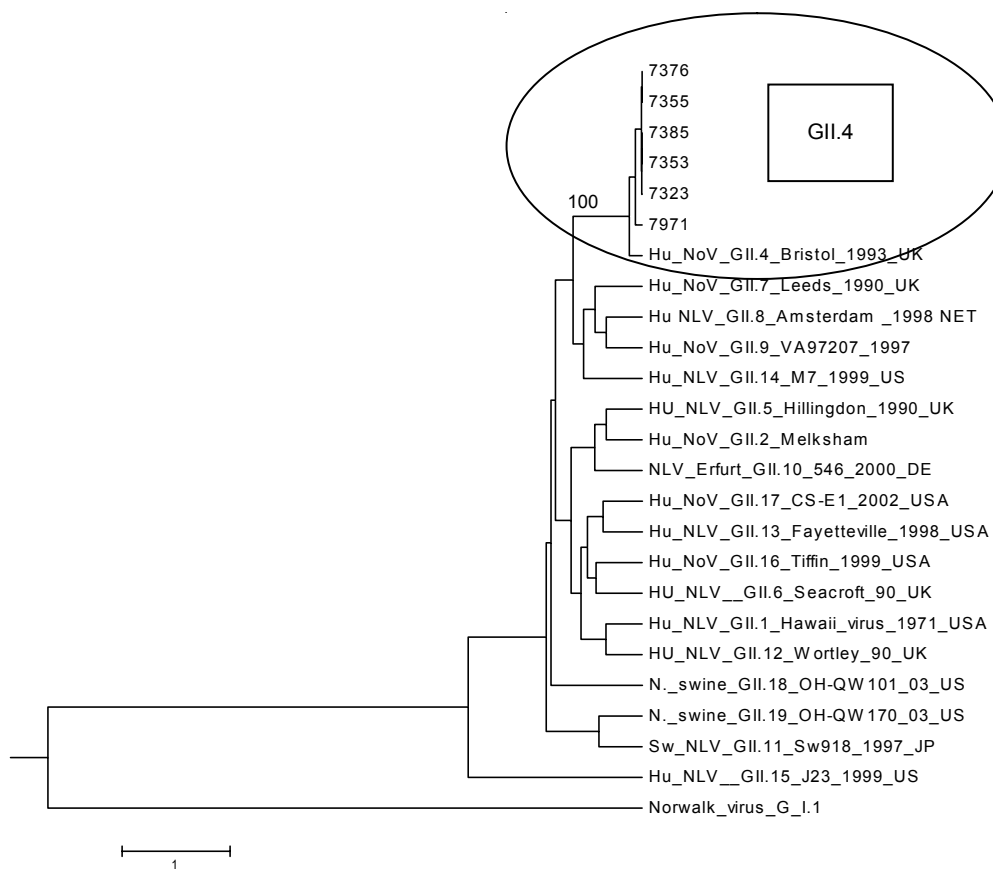
0.5

б

Рис. 4. Филогенетические деревья, построенные на основании фрагментов генов RdRp (а) и VP1 (б) НВ методом NJ. Цифры в узлах дерева — значения бутстреп-теста



a



б

Рис. 5. Филогенетические деревья, построенные на основании фрагментов генов RdRp (а) и VP1 (б) НВ методом Байесовского эволюционного анализа. Цифры в узлах деревьев — значения апостериорной вероятности

эпидемиологических исследований НВ. В качестве мишени выбраны фрагменты генов VP1 и RdRp, подобраны оптимальные условия их накопления и установлено, что при использовании для филогенетического анализа фрагмента гена VP1 статистически достоверный результат генотипирования может быть получен с помощью филогенетической реконструкции методом NJ или Байесовского эволюционного анализа. При использовании фрагмента гена RdRp филогенетическая реконструкция методом NJ может приводить к получению статистически недостоверного результата, поэтому для генотипирования НВ по региону RdRp следует использовать Байесовский эволюционный анализ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wilhelmi I., Roman E., Sanchez-Fauquier A. // Clin. Microbiol. Infect.*— 2003.— Vol. 9.— P. 274—262.
2. *Fankhauser R. L., Monroe S. S., Noel J. S., et al. // J. Infect. Dis.*— 2002.— Vol. 186.— P. 1—7.
3. *Lopman B. A., Reacher M. H., Van Duynhoven Y., et al. // Emerg. Infect. Dis.*— 2003.— Vol. 1.— P. 90—96.
4. *Fletcher H. and agencies // Times.*— January 3, 2008.
5. *Food-borne viruses in Europe. Rapid detection of transnational food-borne viral infections and elucidation of transmission routes through molecular tracing and development of a common database: Final report.*— 2004.
6. *Siebenga J. J., Vennema H., Zheng D. P., et al. // J. Infect. Dis.*— 2009.— Vol. 200, № 5.— P. 802—812.
7. *Vinje J., Vennema H., Maunula L., et al. // J. Clin. Microbiol.*— 2003.— Vol. 41, № 4.— P. 1423—1433.
8. *Kojima S. T., Kageyama S., Fukushi F. B., et al. // J. Virol. Meth.*— 2002.— Vol. 100.— P. 107—114.
9. *Hansman G. S., Katayama K., Maneekarn N., et al. // J. Clin. Microbiol.*— 2004.— Vol. 42.— P. 1305—1307.
10. *Bull R. A., Tu E. T., McIver C. J., et al. // J. Clin. Microbiol.*— 2006.— Vol. 44.— P. 327—333.
11. *Altschul S. F., Gish W., Miller W., et al. // J. Mol. Biol.*— 1990.— Vol. 215, № 3.— P. 403—410.
12. *Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. // Mol. Biol. Evol.*— 2007.— Vol. 24.— P. 1596—1599.
13. *Huelsenbeck J. // Ann. Rev. Ecol. Syst.*— 1997.— Vol. 28.— P. 437—466.
14. *Felsenstein J. // Evolution.*— 1985.— Vol. 43.— P. 63—68.
15. *Поклонская Н. В., Амеросьева Т. В., Безручко А. А. и др. // Здравоохранение.*— 2010.— № 10.— С. 30—36.
16. *Drummond A., Rambaut A. // BMC Evol. Biol.*— 2007.— Vol. 7.— P. 214.
17. *Drummond A., Nicholls A., Rodrigo A., Solomon W. // Genetics.*— 2002.— Vol. 161.— P. 1307—1320.

Получена 19.07.11.

GENOTYPING OF PATHOGENIC AGENTS CAUSING NOROVIRAL INFECTION

N. V. Poklonskaya, T. V. Amvrosiyeva, A. A. Bezruchko, P. I. Grinkevich, A. V. Khilo, E. P. Kishkurno

Objective. To assess the share of norovirus caused infections in occurrence of the acute intestinal infections of viral etiology for 2009 — 2011 (on the data for Minsk region) and to develop a scheme for their molecular-epidemiological monitoring.

Materials and methods. Feces samples were taken from 253 children admitted to Minsk Infectious Clinical Hospital for Children with acute intestinal infection various forms. Noroviral infection was diagnosed by PCR method applying commercial test-systems. The findings obtained evidenced that the norovirus isolation frequency in 2011 increased 1.88 — 2.5 times as compared with 2009.

Results. While developing a scheme for the noroviruses molecular-epidemiological studies the following aspects were considered: selection of the genome optimal site, primers selection/design and development of terms for the DNA fragment selected amplification, and selection of an optimal evolution model and of a method for the phylogenetic reconstruction. The genome VP1 and RdRp fragments were accepted as the target, the optimal conditions of their accumulation were determined. It was stated that when the genome VP1 fragment was used for the phylogenetic analysis a statistically reliable result of genotyping could be obtained in phylogenetic reconstruction by the method of the nearest neighbor joining or Bayes evolutionary analysis.

Conclusion. When the genome RdRp fragment is used the phylogenetic reconstruction by the method of the nearest neighbor joining could result in a statistically unreliable result, therefore for the noroviruses genotyping in the RdRp region Bayes evolutionary analysis should be applied.

Key words: norovirus, intestinal infection, genotype, molecular-epidemiological monitoring.

Адрес для корреспонденции:

Поклонская Наталья Владимировна.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.
220114. г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 265-08-96.

Медицинская литература России

- Сапин М. Р., Никитюк Д. Б., Литвиненко Л. М. **Атлас анатомия человека для стоматологов.**— М., 2011.
- Справочник врача скорой и неотложной медицинской помощи / Авт.-сост. А. Н. Инькова, Е. Г. Кадиева, А. Л. Исаев и др.**— М., 2010.
- Справочник по формулированию клинического диагноза болезней нервной системы / Под ред. В. Н. Штока, О. С. Левина.**— М., 2010.
- Струков А. И., Серов В. В. **Патологическая анатомия: Учебник.**— М., 2011.
- Съркин А. Л., Новикова Н. А., Терехин С. А. **Острый коронарный синдром.**— М., 2010.
- Хантов Р. М., Ярилин А. А., Пинегин Б. В. **Иммунология: Атлас.**— М., 2011.
- Хенеган К., Баденоч Д. **Доказательная медицина: Карманный справочник.**— М., 2011.
- Хорошилкина Ф. Я. **Ортодонтия: Дефекты зубов. Зубных рядов, аномалии прикуса, морфофункциональные нарушения челюстно-лицевой области и комплексное лечение.**— М., 2010.
- Храпылина Л. П., Хряков В. В., Бочкарев А. Ю. **Экономика и управление социальным развитием курортов: Учеб. пособие для вузов.**— М., 2011.
- Челнэр Б. Э., Линч Т. Дж., Лонго Д. Л. **Руководство по онкологии.**— М., 2011.

Н. В. ВИНОКУРОВА, Е. П. СЧЕСЛЕНКО,
Г. А. КЛАВСУТЬ, П. А. СЕМИЖОН, А. Г. КРАСЬКО,
С. А. БУСЕЛ, Ф. М. ФИДАРОВ, А. С. ВЛАДЫКО

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

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

Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции проведен анализ 95 проб ткани легкого грызунов, отловленных в природных очагах на территории Могилевской и Минской областей. Выявлена РНК возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в пробах от 2 рыжих полевок и 1 полевой мыши. Показана принадлежность возбудителя ГЛПС к серотипу Пуумала, что позволяет предположить о преимущественной циркуляции вируса Пуумала на территории Республики Беларусь.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, природные очаги ГЛПС, метод обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, генотипирование.

Возбудители геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), вирусной природно-очаговой зоонозной инфекции человека, относятся к роду *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae*. В настоящее время циркулирует более 20 генотипов/серотипов хантавирусов в различных регионах мира. Наиболее значимыми в этиологии заболеваний человека являются 4 основных ГЛПС-ассоциированных хантавируса, вызывающих заболевания различной степени тяжести: вирусы Хантаан и Добrava/Белград, которые приводят к тяжелой форме ГЛПС с летальностью 5—35%, вирус Сеул — заболевание средней степени тяжести с летальностью 2—5%, вирус Пуумала, являющийся этиологическим агентом эпидемической нефропатии и вызывающий легкую форму ГЛПС с летальностью 0,3—1,0% [1, 2]. В Республике Беларусь с 1991 по 2010 г. зарегистрировано 63 случая заболевания ГЛПС (отмечены летальные исходы). Наибольшее количество случаев зафиксировано в 2006 г. и в 2010 г. — 9 и 14 соответственно. Возросший в 2006 г. уровень заболевания населения ГЛПС по сравнению с 2005 г. (0,09 и 0,01 соответственно) свидетельствовал об активизации природных очагов хантавирусной инфекции. В настоящее время в республике зарегистрировано 573 природных и 7 антропоургических очагов инфекции [3]. Основным природным резервуаром вируса ГЛПС являются мышевидные грызуны. Каждый возбудитель заболевания ассоциирован с определенным (или несколькими) видом грызунов, с которым он коэволюционировал. В настоящее время

в качестве носителей и основных резервуаров вирусов ГЛПС среди грызунов рассматривают полевую мышь (*Apodemus agrarius*) — основного хозяина вируса Хантаан, дальневосточную полевку (*Microtus fortis*), которая является основным хозяином вируса Сеул, рыжую полевку (*Clethrionomys glareolus*) — основного хозяина вируса Пуумала, желтогорлую мышь (*Apodemus flavicollis*), являющуюся основным хозяином вируса Добrava/Белград. В городах резервуаром инфекции могут быть домовые крысы и мыши. В Беларуси, а также в большинстве стран Европы, где регистрируется ГЛПС, доминирует вирус Пуумала, носителем которого является рыжая полевка. В то же время в восточноевропейских странах циркуляция вируса Добrava/Белград обнаружена в популяциях полевой мыши [4]. Это позволяет предположить о возможной циркуляции вируса и на территории республики.

Целью настоящей работы явилось выявление и идентификация методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) возбудителей ГЛПС, циркулирующих на территории Республики Беларусь.

Материал и методы

Исследовали пробы ткани легкого грызунов, отловленных в природных очагах ГЛПС Минской и Могилевской областей. Отлов мелких грызунов и забор материала проводили сотрудники Республиканского центра эпидемиологии, гигиены и общественного здоровья с использованием специализированной мобильной станции.

Вирусную РНК из ткани органов грызунов выделяли экстракцией коммерческим препаратом «QIAzol Lysis Reagent», США. К 100 мкг ткани легкого добавляли 1 мл реагента и инкубировали при комнатной температуре 5 мин, после чего вносили 0,2 мл хлороформа и интенсивно встряхивали в течение 15 с. После 2—3 мин инкубирования при комнатной температуре смесь центрифугировали 15 мин при 12 000 об./мин и 4°C. Верхнюю фазу в количестве 0,5—0,6 мл отбирали в полипропиленовую пробирку, добавляли равный объем изопропанола и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. РНК осаждали центрифугированием на протяжении 10 мин при 12 000 об./мин и температуре 4°C. Затем осадок РНК отмывали 75% раствором этанола, после чего осадки подсушивали под вакуумом и растворяли в 20 мкл воды. Для лучшего растворения инкубировали 10—15 мин при 55—60°C.

Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-L» (производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии). Для выявления РНК хантавирусов методом ОТ-ПЦР использовали родоспецифические праймеры (таблица) [5].

Характеристика родоспецифических праймеров

Праймер	Последовательность	Позиция нуклеотидов	Продукт (п.о.)
HG2F1	TGGGCTGCTAGTGC	M-сегмент 2000-2013	365
HG2R1	CAACCCAGCTAGTTTCA	M-сегмент 2368-2350	

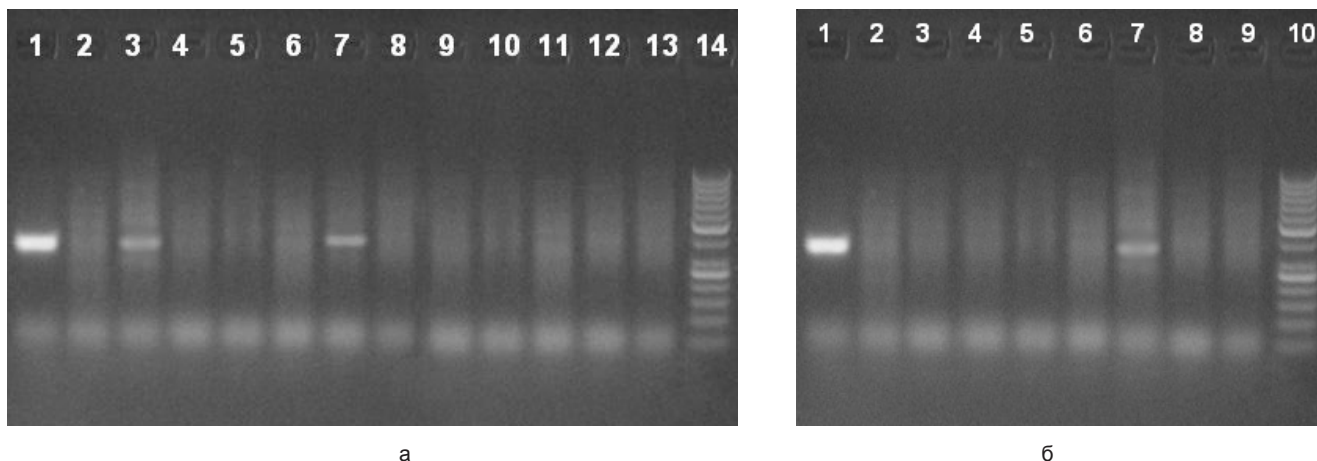


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов амплификации в 2% агарозном геле: 1 — положительный контроль (РНК вируса Пуумала, штамм К-27/Уфа); 2—13 — исследуемые образцы ткани легкого; 14 — 50 bp DNA Ladder (а); 1 — положительный контроль; 2—9 — исследуемые образцы ткани легкого; 10 — 50 bp DNA Ladder (б)

Для постановки реакции использовали следующий режим амплификации ПЦР-продукта: 94°C — 3 мин; 94°C — 30 с, 45°C — 45 с, 72°C — 1 мин (35 циклов); 72°C — 6 мин; 60°C — 1 мин.

Для проведения типовой дифференциации возбудителей ГЛПС применяли метод «гнездовой» ПЦР. Для 1-й стадии ПЦР использовали общую пару праймеров: прямой — MOF103 (5'-GGACCAAGGTGCA-GCTTGTGAAGC-3') и обратный — MOR204 (5'-ACCTCACAAACCATTTGAACC-3'). Во 2-й стадии ПЦР для вируса Пуумала использовали праймеры: прямой — PUU G1F (5'-GTGTCCAGAGATTCCGTGGT-3') и обратный — PUU G1R (5'-GAACATAAGTATGCGA-ATCGAA-3'); для вируса Добrava/Белград: прямой — DOB G1F (5'-ATGCCAGCGAGTCGACCAA-3') и обратный — DOB G1R (5'-GAGСТАТТА-TGTAAGATTGC-3').

Синтезированные методом ПЦР фрагменты ДНК анализировали в 2% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении тока 10 В/см геля в трис-ацетатном буфере, pH 8,0. ДНК визуализировали окрашиванием геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ на трансиллюминаторе.

Результаты и обсуждение

Отлов мелких грызунов в природных очагах ГЛПС проводили в Минской и Могилевской областях, поскольку за последние 4 года случаи заболевания ГЛПС отмечали только в этих регионах. В 2009 г. в Могилевской области было зарегистрировано 2 случая заболевания ГЛПС, показатель заболеваемости — 0,18 на 100 тыс. населения, в 2010 г. данный показатель для области значительно увеличился и составил 1,26 на 100 тыс. населения, что является высоким даже по сравнению со средним показателем заболеваемости ГЛПС для Российской Федерации — 0,5. Возросшая заболеваемость ГЛПС в Могилевской области свидетельствует об активизации природных очагов хантавирусной инфекции, что связано с увеличением численности и пораженностью возбудителем ГЛПС мышевидных грызунов. На территории Могилевской области зарегистрировано 87 природных очагов ГЛПС, причем в 2009 г. выявлены новые для

области природные очаги, наибольшее количество которых обнаружено в Могилевском районе [6].

В настоящее время метод ОТ-ПЦР широко используют для идентификации хантавирусов с целью мониторинга ГЛПС, поскольку он является практически единственным методом, позволяющим давать прямое доказательство наличия вирусного антигена в различных биологических материалах, полученных как от человека, так и от животных [7].

По данным S. Y. Xiao и соавт., олигонуклеотиды (праймеры), обозначенные HG2F1 и HG2R1 и фланкирующие фрагмент М-гена, кодирующего N-концевую часть G2-гликопротеида, являются родоспецифическими [5]. В связи с этим данную пару праймеров использовали для постановки ОТ-ПЦР с целью выявления антигена возбудителей ГЛПС в органах грызунов, отловленных в природных очагах. Методом ОТ-ПЦР с родоспецифическими праймерами на наличие РНК хантавирусов проанализировали 95 проб ткани легких грызунов, отловленных в Могилевской и Минской областях: 35 — от рыжей полевки, 33 — от полевой мыши, 10 — от лесной мыши, 5 — от полевки-экономки, 1 — от бурозубки и 5 — от домовых мыши. В результате анализа в трех пробах ткани легких, выделенных от 2 рыжих полевок и 1 полевой мыши, выявили специфический ДНК-фрагмент амплификации (рис. 1, а, дорожки 3 и 7; рис. 1, б, дорожка 7) размером 365 п.о. относительно положительно-го контроля (РНК вируса Пуумала, штамм К-27/Уфа). Амплификация специфическими продуктами методом ОТ-ПЦР с родоспецифическими праймерами свидетельствует о наличии в исследуемых пробах РНК возбудителя ГЛПС.

С целью проведения типовой дифференциации возбудителей ГЛПС, циркулирующих на территории республики, пробы ткани легкого, для которых было показано наличие специфической РНК, анализировали методом ОТ-ПЦР с использованием пар праймеров, позволяющих идентифицировать РНК вируса Пуумала и РНК вируса Добrava/Белград. Использование метода «гнездовой» ПЦР со специфическими праймерами позволило провести идентификацию

хантавирусов, выявленных в органах грызунов. На рис. 2 представлены результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации хантавирусной РНК со специфическими парами праймеров. Из данного рисунка следует, что при использовании пары праймеров, позволяющей идентифицировать РНК вируса Пуумала на матрице РНК анализируемых проб, амплифицировались специфические фрагменты ДНК (327 п.о.), что свидетельствует о принадлежности возбудителя ГЛПС к серотипу Пуумала.

Таким образом, проведенные исследования позволяют предположить о преимущественной циркуляции вируса Пуумала на территории Республики Беларусь.

Возросший уровень заболеваемости ГЛПС свидетельствует об активизации ее природных очагов. Использование метода ОТ-ПЦР позволит повысить эффективность лабораторных исследований с целью мониторинга природных очагов хантавирусной инфекции, установить принадлежность возбудителя ГЛПС и обнаружить основных природных хозяев, являющихся переносчиками данной инфекции, что в свою очередь позволит выявить корреляцию между уровнем заболеваемости и показателем инфицированности популяции грызунов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee P. W., Gibbs C. J., Jr. Gaudusek D. S., Yanagihara R. // *Clin. Microbiol.*— 1989.— Vol. 22.— P. 940—944.
 2. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. // *J. Virol.*— 1996.— Vol. 77.— P. 2677—2687.
 3. Счесленок Е. П., Владыко А. С., Фомина Е. Г. и др. // *Здравоохранение.*— 2006.— № 11.— С. 29—32.
 4. Слонова Р. А., Ткаченко Е. А., Иванис В. А. и др. *Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.*— Владивосток, 2006.
 5. Xiao S. Y., Chu Y. K., Knauert R., et al. // *J. Gen. Virol.*— 1992.— Vol. 73.— P. 567—573.
 6. Счесленок Е. П., Школина Т. В., Клавсуть Г. А. и др. // *Здравоохранение.*— 2010.— № 10.— С. 49—51.
 7. Гаранина С. Б., Журавлев В. И., Шипулин Г. А. и др. // *Эпидемиол. и инфекцион. болезни.*— 2005.— № 6.— С. 37—41.
- Поступила 18.07.11.

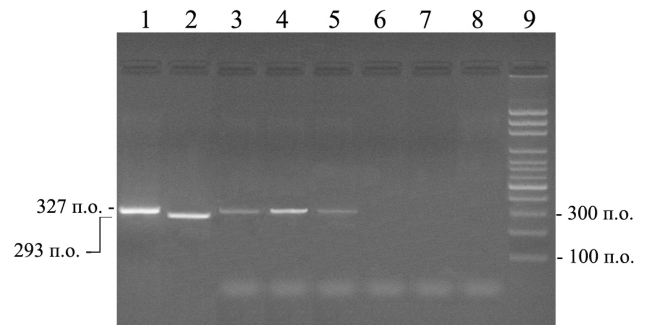


Рис. 2. Анализ продуктов амплификации «гнездовой» ПЦР в 2% агарозном геле: 1 (положительный контроль) — продукт амплификации со специфическими праймерами на матрице РНК, выделенной из вируса Пуумала; 2 (положительный контроль) — продукт амплификации со специфическими праймерами на матрице РНК, выделенной из вируса Добрава/Белград; 3, 4, 5 — продукты амплификации анализируемых РНК с праймерами, идентифицирующими РНК вируса Пуумала; 6, 7, 8 — продукты амплификации анализируемых РНК с праймерами, идентифицирующими РНК вируса Добрава; 9 — ДНК маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder

IDENTIFICATION OF PATHOGENIC AGENTS CAUSING HEMORRHAGIC FEVER ACCOMPANIED BY RENAL SYNDROME CIRCULATING ON TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

N. V. Vinokurova, E. P. Scheslenok, G. A. Klavsut, P. A. Semizhon, A. G. Krasko, S. A. Busel, F. M. Fidarov, A. S. Vladyyko

Using methods of reverse transcription and polymerase chain reaction 95 samples of lung tissue of rodents caught in natural foci on the territories of Mogilyov and Minsk regions were analyzed. The RNA of the pathogenic agent causing hemorrhagic fever accompanied by renal syndrome (HFRS) was found in the samples from two red field mice and from one field mouse. It was shown that the pathogenic agent causing HFRS belonged to Puumala serotype allowing suppose that Puumala viruses circulated predominantly on the territory of the Republic of Belarus.

Key words: hemorrhagic fever accompanied by renal syndrome, natural foci of HFRS, methods of reverse transcription and polymerase reaction, genotyping.

Адрес для корреспонденции:

Счесленок Елена Павловна.
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 268-04-19.

Медицинская литература России

- Абдурахманов Д. Т. **Хронический гепатит В и D.**— М., 2010.
- Абышев А. З., Трусов С. Н., Ложкин А. В. **Лекарственные препараты антиангинального действия — антагонисты ионов кальция (фенилалкилы, 1,4-дигидропиридины и бензотиазепины): Учеб.-метод. пособие.**— СПб., 2010.
- Акушерство: Национальное руководство /** Под ред. Э. К. Айламазяна, В. И. Кулакова, В. Е. Радзинского и др. Альперович Б. И. **Хирургия печени.**— М., 2010.
- Антропов Ю. Ф. **Психиатрия детско-подросткового возраста: Ч. 1: Общая психопатология.**— М., 2010.
- Челибанова И. Е., Репина О. В. **Справочник по лекарственным препаратам.**— М., 2010.
- Чернявский А. М., Марченко А. В., Караськов А. М. **Хирургическое лечение ишемической болезни сердца, осложненной сердечной недостаточностью: Монография.**— Новосибирск, 2010.
- Шевелев И. А. **Нейроны-детекторы зрительной коры /** Отв. ред. М. А. Островский.— М., 2010.
- Шумский В. Б. **Экзистенциальная психология и психотерапия: Теория. Методология, практика: Учеб. пособие.**— М., 2010.



В. Н. БЕЛЯКОВСКИЙ, А. Н. ВОЛЧЕНКО,
Е. В. ВОРОПАЕВ, А. Е. СИЛИН

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСОВ ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ДРУГИХ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ ПРОФИЛАКТИКЕ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Гомельский государственный медицинский университет,
Гомельский областной клинический
онкологический диспансер,
РНПЦ радиационной медицины и экологии человека

Цель исследования. Определить частоту выявления ДНК уrogenитальных инфекций у женщин при проведении профилактических осмотров. Выявить преобладающие генотипы папилломавирусов и связь носительства инфекций с дисплазией шейки матки.

Материал и методы. В исследование включены 1023 женщины, без цервикального рака и дисплазии шейки матки в анамнезе. Им проведено гинекологическое обследование, взяты мазки из цервикального канала. При обнаружении ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) или неудовлетворительном цитологическом заключении выполняли углубленное обследование с применением кольпоскопии и прицельной биопсии. Для выявления ДНК ВПЧ ВКР и других уrogenитальных инфекций применяли метод полимеразной цепной реакции.

Результаты. Суммарно ДНК одного или нескольких возбудителей обнаружена у 65,8% женщин, ДНК ВПЧ ВКР — у 35,6%. Наибольший уровень инфицированности отмечен в группах пациенток до 30 лет, а также у лиц с выявленными уrogenитальными инфекциями ($P=0,0001$), за исключением хламидийной, частота встречаемости которой не была связана с ВПЧ-статусом ($P=0,2$).

При тяжелых дисплазиях шейки матки ДНК ВПЧ ВКР ($P=0,00001$), ДНК HSV I—II ($P=0,002$) и ДНК *Ureaplasma spp.* ($P=0,02$) встречались чаще, чем у женщин с нормальной цитогаммой. ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Chlamydia trachomatis* определяли одинаково часто в исследуемых группах ($P=0,3$ и $P=0,4$ соответственно). Преобладающий генотип в популяции — ВПЧ-16 — обнаружен у 29,4% инфицированных женщин, на 2-м месте — ВПЧ-56, на 3-м — ВПЧ-31. В 39,0% случаев обнаружено несколько генотипов вируса одновременно, у этих женщин чаще определяли ДНК *Ureaplasma spp.* ($P=0,03$) и ДНК *Chlamydia trachomatis* ($P=0,03$).

Заключение. Целесообразно обследование на инфекции, передаваемые половым путем, пациенток с положительным ВПЧ-статусом, а также на наличие ВПЧ у женщин с диагностированными уrogenитальными инфекциями, для последующего лечения с целью уменьшения риска развития рака шейки матки.

Ключевые слова: вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска, преобладающие генотипы, полимеразная цепная реакция, уrogenитальные инфекции, дисплазия шейки матки.

Уrogenитальные инфекции являются одной из самых значимых проблем в охране репродуктивного здоровья, которая подрывает демографическую безопасность Республики Беларусь [1]. В то же время вирус папилломы человека (ВПЧ) — одна из наиболее распространенных вирусных инфекций, передаваемых

половым путем (ИППП), которым инфицирована большая часть сексуально активного населения. Наибольший уровень инфицированности регистрируется в молодом возрасте и снижается после 30 лет [2].

В результате проведенных эпидемиологических и молекулярно-генетических исследований установлено, что инфицирование ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) является главным этиологическим фактором в иницировании и прогрессировании злокачественной трансформации эпителия, что приводит к цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) и раку шейки матки (РШМ) [3, 4]. Эпидемиологические исследования, проводимые в различных странах, позволяют выявить географические типоспецифические особенности папилломавирусной инфекции (ПВИ) и преобладающие генотипы, вызывающие поражения многослойного плоского эпителия (МПЭ) шейки матки [5]. Изучение распространения ВПЧ ВКР и эпидемиологии РШМ стимулировало создание вакцин, которые внедряются в высокоразвитых странах. Однако в связи с их высокой стоимостью продвижение первичной профилактики ПВИ в странах с низким экономическим развитием проблематично [6, 7]. Фактические данные о распространенности генотипов ВПЧ ВКР в Республике Беларусь являются важными для разработки национальной программы вакцинопрофилактики РШМ.

В республике ПВИ не включена в перечень заболеваний, подлежащих обязательному государственному учету и регистрации, также отсутствует система эпидемиологического надзора за ВПЧ (как для сифилиса, гонореи, хламидийной инфекции и др.), что связано со стертостью клинической картины латентной инфекции и невозможностью рутинного определения вируса другими методами, кроме молекулярно-генетических.

Широкое распространение ВПЧ ВКР обуславливает рост заболеваемости РШМ среди женского населения [2]. По данным Белорусского канцер-регистра, в стране наблюдается увеличение заболеваемости РШМ (с 15,7 впервые выявленных случаев на 100 тыс. женского населения в 2000 г. до 18,5 случаев, зарегистрированных в 2008 г.), причем отмечается оно в основном в группе женщин детородного возраста [8, 9]. В 2009 г. показатель заболеваемости впервые установленным РШМ составил 17,9 случаев на 100 тыс. населения [9].

Многие исследования показали, что ВПЧ носит в основном временный характер и только изредка может длительно персистировать и приводить к поражению МПЭ [10]. Продолжительная персистенция вируса часто связана с носительством других ИППП [11]. Существуют доказательства ассоциации уrogenитальных инфекций и диспластических поражений шейки матки, в частности хламидийной [10] и герпетической инфекций (HSV I—II) [12, 13], а также уреоплазменной инфекции в высоких концентрациях [14], хотя специфическая роль этих микроорганизмов в цервикальном канцерогенезе до конца не выяснена.

Цель настоящей работы — определить частоту выявления генетического материала (ДНК) ВПЧ ВКР, ДНК HSV I—II, ДНК *Chlamydia trachomatis*, ДНК *Ureaplasma spp.* и ДНК *Mycoplasma hominis* на слизистой оболочке шейки матки и цервикального канала у женщин при проведении профилактических медицинских осмотров, выявить преобладающие генотипы ВПЧ и связь носительства урогенитальных инфекций с дисплазией шейки матки.

Материал и методы

Проведено мультицентровое поперечное когортное исследование, в которое включены 1172 женщины, посетившие в 2009—2010 гг. учреждения здравоохранения Гомеля для рутинного профилактического медицинского осмотра. Критерий включения: удовлетворительное качество цервикальных мазков для проведения молекулярно-генетических и цитологических исследований. Критерий исключения: наличие дисплазий и РШМ в настоящее время или в анамнезе.

В соответствии с приведенными критериями для анализа выбрали 1023 женщины в возрасте от 17 до 62 лет (средний возраст $32,0 \pm 0,3$ года). Всем женщинам провели общеклиническое и гинекологическое обследование, в ходе которого брали мазки из цервикального канала и собирали анамнестические данные. При обнаружении ДНК ВПЧ ВКР или при неудовлетворительном цитологическом заключении проводили углубленное обследование с применением расширенной кольпоскопии, прицельной биопсии и последующим гистологическим изучением биоптата.

Для выявления ДНК ВПЧ ВКР применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для детектирования генома папилломавирусов использовали тест-систему «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип FL» (Россия), определяли следующие генотипы ВПЧ ВКР: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59. Также в мазках выявляли ДНК HSV I—II, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* («АмплиСенс HSV I—II EPh», «АмплиСенс HSV I, II-FL», «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-FL», «АмплиСенс® *Mycoplasma hominis* EPh», «АмплиСенс *Ureaplasma spp.* EPh», Россия).

Данные представлены в виде средних значений $M \pm m$, которые анализировали с использованием 95% доверительного интервала (95% ДИ), отношения шансов (ОШ), для определения характера распределения признаков применяли критерий Колмогорова—Смирнова, для сравнения групп — критерий χ^2 , а также χ^2 с поправкой Йейтса.

Исследование выполнено в рамках проекта НИР «Разработать и внедрить протокол диагностики и элиминации вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска (ВПЧ) среди женщин Гомельской области» (государственная регистрация НИР № 20092539 от 28.09.2009).

Результаты и обсуждение

Среди обследованных женщин, включенных в исследование, отмечена различная частота обнаружения

ДНК инфекционных агентов на слизистой оболочке шейки матки и цервикального канала. Так, ДНК ВПЧ ВКР диагностирована у 35,6% (364/1023), (95% ДИ [30,7—40,5]) женщин, ДНК *Chlamydia trachomatis* — у 7,1% (24/337), (95% ДИ [0,0—17,4]); ДНК *Ureaplasma spp.* — у 50,7% (516/1017), (95% ДИ [46,4—55,0]); ДНК *Mycoplasma hominis* — у 13,2% (134/1017), (95% ДИ [7,3—18,9]); ДНК HSV I—II — 1,6% (16/1017), (95% ДИ [0,0—7,7]). Суммарно ДНК одного или нескольких изучаемых возбудителей была выявлена у 65,8% (673/1023), (95% ДИ [62,3—69,5]) женщин (рис. 1).

Наибольшая частота выявления ДНК ВПЧ ВКР ($\chi^2=5,0$, $P=0,03$), как и ДНК возбудителей других генитальных инфекций ($\chi^2=11,6$, $P=0,0007$), отмечена в группе женщин до 24 лет и в группе 25—29 лет ($\chi^2=14,2$, $P=0,0002$, $\chi^2=11,6$, $P=0,0007$ соответственно), то есть у наиболее репродуктивно активной части населения. Высокая инфицированность ИППП в молодом возрасте создает предпосылки для подрыва репродуктивного здоровья и невозможности реализации репродуктивных возможностей, что провоцирует демографическую нестабильность в стране. С возрастом инфицированность постепенно снижается. Минимальная частота определения ДНК ВПЧ ВКР и ДНК других возбудителей генитальных инфекций выявлена в группе женщин старше 50 лет ($\chi^2=26,0$, $P=0,00001$ и $\chi^2=10,5$, $P=0,001$ соответственно).

Также проанализировали частоту выявления ДНК каждого изучаемого инфекционного агента в отдельности по возрастам. Результаты представлены в табл. 1.

Наибольшая частота встречаемости ДНК *Ureaplasma spp.* и ДНК *Chlamydia trachomatis* в цервикальных мазках отмечена в возрастной группе женщин до 24 лет (59,6% и 12,4% соответственно), ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК HSV I—II в группе 25—29 лет — 14,5% и 2,3% соответственно. С возрастом частота обнаружения ДНК изучаемых возбудителей постепенно снижается.

Частота совместного обнаружения ДНК двух и более возбудителей генитальных инфекций представлена в табл. 2.

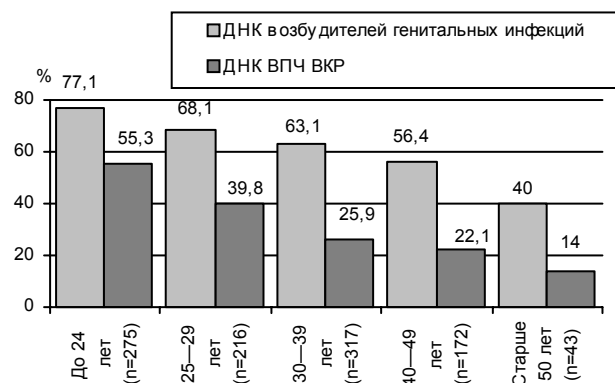


Рис. 1. Частота выявления ДНК ВПЧ ВКР и суммарная частота выявления ДНК возбудителей урогенитальных инфекций (включая ДНК ВПЧ ВКР) на слизистой оболочке шейки матки и цервикального канала в различных возрастных группах

Таблица 1

Выявление (%) ДНК возбудителей отдельных генитальных инфекций на слизистой оболочке шейки матки и цервикального канала у женщин разного возраста

Возбудитель	Возраст				
	До 24 лет	25—29 лет	30—39 лет	40—49 лет	Старше 50 лет
<i>Ureaplasma spp.</i>	59,6	50,5	47,0	48,3	33,3
<i>Mycoplasma hominis</i>	12,5	14,5	13,9	11,6	11,9
<i>Chlamydia trachomatis</i>	12,4	6,7	4,2	3,9	0,0
HSV I—II	1,8	2,3	1,6	0,6	0,0

Таблица 2

Выявление (%) ДНК возбудителей генитальных инфекций у женщин с ВПЧ-положительным и ВПЧ-отрицательным статусом

ИППП	ВПЧ+ (n=361)	ВПЧ- (n=656)	χ^2	P	Значение ОШ	95% ДИ ОШ
HSV I—II	3,3	0,6	11,1	0,0009	5,6	1,8—17,5
<i>Ureaplasma spp.</i>	64,5	43,1	42,6	0,00001	2,4	1,8—3,1
<i>Mycoplasma hominis</i>	18,6	10,2	14,2	0,0002	2,0	1,4—2,9
<i>Chlamydia trachomatis</i>	9,4 (n=139)	5,5 (n=199)	1,8	0,2	1,8	0,8—4,0
ДНК любого возбудителя, одного или нескольких	67,9	47,5	38,8	0,0001	2,3	1,8—3,1

Показано, что инфицированность ВПЧ ВКР статистически значимо выше у лиц с генитальными инфекциями, даже отнесенными к группе условно-патогенных микроорганизмов (*Ureaplasma spp.* и *Mycoplasma hominis*). Вероятность выявления ДНК ВПЧ ВКР на слизистой оболочке шейки матки при обнаружении ДНК изучаемых генитальных инфекций возрастает более чем в 2 раза, а при выявлении ДНК HSV I—II типа вероятность детектирования в цервикальных мазках ДНК ВПЧ ВКР может возрастать до 18 раз (в среднем в 5,6 раз). Исключение составляет *Chlamydia trachomatis*, частота встречаемости которой не связана с ВПЧ-статусом.

Критерием для назначения углубленного обследования явились неудовлетворительные результаты настоящей цитологического исследования на атипичные клетки, обнаружение в цервикальных мазках ДНК ВПЧ ВКР и клинические показания. Из 1023 человек, включенных в исследование, углубленное обследование проводили у 415 лиц, в результате которого у 91 женщины обнаружена дисплазия шейки матки различной степени тяжести, причем у 58 человек — ЦИН II—III стадии. Средний возраст женщин с выявленным тяжелым поражением шейки матки (ЦИН II—III) составил $30,8 \pm 1,0$ год и не отличался от среднего возраста женщин с удовлетворительным результатом цитологического исследования (n=878) — $32,1 \pm 0,3$ (P=0,3), что подтверждает необходимость внедрения программ раннего выявления фоновых и предраковых состояний с целью профилактики РШМ.

ДНК ВПЧ ВКР у женщин с ЦИН II—III выявлена в 93,1% (54/58) случаев. В 4 образцах ДНК ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 56, 58, 59 не обнаружили; вероятно, патологические изменения были вызваны другими генотипами вируса, которые не выявлялись используемой тест-системой [15]. Однако в литературе описаны и ВПЧ-отрицательные поражения шейки матки [16].

У женщин с тяжелой дисплазией проанализировали частоту обнаружения ДНК изучаемых возбудителей. В качестве группы сравнения выбрали обследованных женщин (n=878) с удовлетворительными результатами цитологического исследования, без ВПЧ-эффекта (койлоцитоз, дискариоз). Результаты представлены на рис. 2.

Таким образом, общая инфицированность женщин с дисплазией оказалась статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($\chi^2=5,3$, P=0,02). При тяжелых дисплазиях шейки матки (ЦИН II—III) статистически значимо чаще, чем в группе женщин с нормальной цитограммой без признаков ВПЧ-эффекта, встречались ДНК ВПЧ ВКР ($\chi^2=93,9$, P=0,00001), ДНК HSV I—II ($\chi^2=9,8$, P=0,002) и ДНК *Ureaplasma spp.* ($\chi^2=5,6$, P=0,02). Не выявлено различий в частоте обнаружения ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Chlamydia trachomatis* на слизистой оболочке шейки матки в исследуемых группах ($\chi^2=1,1$, P=0,3 и $\chi^2=0,8$, P=0,4 соответственно).

Высокая распространенность ВПЧ ВКР и частота ко-инфицирования генитальными инфекциями по-

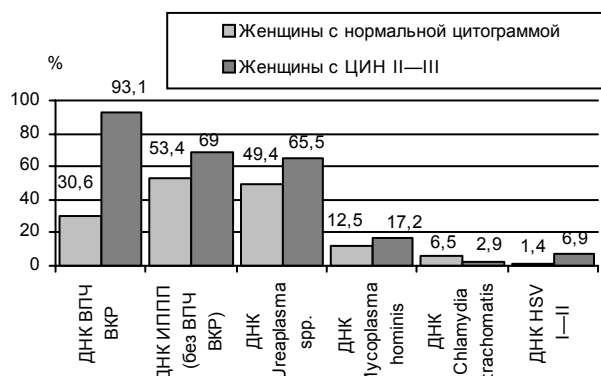


Рис. 2. Частота обнаружения ДНК изучаемых микроорганизмов

казывают ценность скрининга на ИППП лиц с ВПЧ-положительным статусом с целью раннего выявления и лечения. Учитывая, что персистенция часто ассоциирована с носительством ИППП, своевременная элиминация инфекционных агентов предупреждает вероятный синергетический эффект ко-инфицирования на состояние и развитие цервикальных поражений, а возможно, и персистенция ВПЧ [11, 14, 17].

С целью изучения типоспецифических особенностей инфицирования папилломавирусами ВКР исследовали частоту встречаемости различных генотипов ВПЧ ВКР у обследованных женщин. Достоверно чаще встречался ВПЧ-16 ($\chi^2=18,8$, $P=0,00001$) — у 29,4% (95% ДИ [0,8—38,0]) инфицированных женщин. Второе место принадлежит ВПЧ-56 — 15,9%, (95% ДИ [6,5—25,3]), третье место занимает ВПЧ-31 14,3% (95% ДИ [4,8—23,8]) женщин. Далее генотипы вируса по частоте детектирования распределялись следующим образом: 51, 52, 33, 39, 58, 45, 18, 35, 59. ВПЧ-18 оказался на 10-м месте — 9,9% (95% ДИ [0,1—19,7]). Суммарная частота инфицирования ВПЧ-16 и ВПЧ-18, штаммами, против которых разработаны вакцины, составила 39,3% (95% ДИ [31,3—47,3]). Обсуждается возможность развития перекрестного иммунитета к филогенетически наиболее близким для вакцинных генотипов — ВПЧ-31 и ВПЧ-45 [18]. Суммарная частота встречаемости генотипов ВПЧ-16, 18, 31, 45 в группе обследованных составила 63,8% (95% ДИ [57,6—70,0]). Результаты представлены на рис. 3. Такое распределение генотипов является региональной особенностью и доказывает возможность различий в распространенности генотипов ВПЧ даже в соседних государствах. Так, например, в Уральском регионе России преобладают 16 и 35 генотипы вируса [19], в Московском — 16 и 31 генотипы [20].

В 39,0% (95% ДИ [31,0—47,0]) случаев обнаружено несколько генотипов вируса в одном образце одновременно (от 2 до 6), что статистически достоверно реже, чем выявление моногенотипа вируса ($\chi^2=35,2$, $P=0,00001$). В образцах, где была обнаружена ДНК нескольких папилломавирусов, также статистически значимо чаще определялась ДНК *Ureaplasma spp.* ($\chi^2=4,4$, $P=0,03$) и ДНК *Chlamydia*

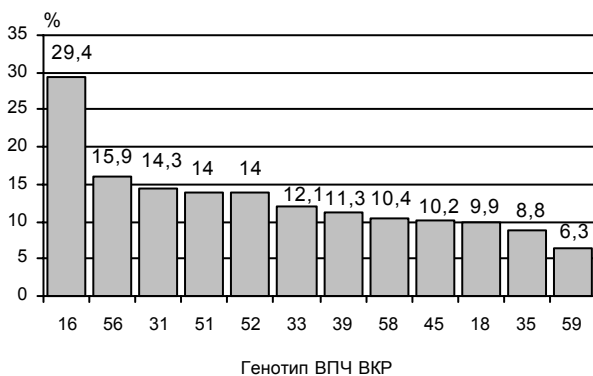


Рис. 3. Частота выявления различных генотипов папилломавирусов среди ВПЧ-инфицированных женщин

trachomatis ($\chi^2=4,7$, $P=0,03$). Инфицирование несколькими генотипами вируса одновременно может являться фактором риска развития персистирующей формы ПВИ [19]. Однако в настоящем исследовании не было обнаружено различий в частоте выявления ЦИН II—III у инфицированных одним генотипом папилломавируса (16,2%, 95% ДИ [4,2—28,2]) или несколькими (12,8%, 95% ДИ [0,0—28,2]), ($\chi^2=0,9$, $P=0,3$), возможно, из-за статистически небольшого количества (54) ВПЧ-ассоциированных дисплазий, выявленных в ходе исследования.

Выводы

1. Среди обследованных женщин отмечена различная частота обнаружения ДНК инфекционных агентов. Суммарно ДНК одного или нескольких возбудителей урогенитальных инфекций выявлена у 65,8% женщин, высокий уровень распространения папилломавирусной инфекции отмечен у 35,6%. Наибольшая частота выявления ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска, как и ДНК возбудителей других генитальных инфекций, отмечена в группе женщин в возрасте до 24 лет и в группе 25—29 лет, то есть у наиболее репродуктивно активной части населения. Инфицированность ВПЧ ВКР статистически значимо выше у лиц с выявленными урогенитальными инфекциями ($P=0,0001$), за исключением хламидийной инфекции, частота встречаемости которой не была связана с ВПЧ-статусом ($P=0,2$).

2. При тяжелых дисплазиях шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия II—III стадии) статистически значимо чаще, чем в группе женщин с нормальной цитолограммой без признаков ВПЧ-эффекта, встречались ДНК ВПЧ ВКР, ДНК HSV I—II и ДНК *Ureaplasma spp.* ДНК *Mycoplasma hominis* и ДНК *Chlamydia trachomatis* определялись в исследуемых группах одинаково часто.

3. Преобладающий генотип в популяции — ВПЧ-16 — обнаружен у 29,4% инфицированных женщин. Второе место принадлежит ВПЧ-56, третье место — ВПЧ-31. Суммарная частота инфицирования ВПЧ-16 и ВПЧ-18, штаммами, для профилактики инфицирования которыми разработаны вакцины, составила 39,3%. Суммарная частота встречаемости генотипов ВПЧ-16, 18, 31, 45 в группе обследованных — 63,8%.

4. В 39,0% случаев обнаружено несколько генотипов вируса в одном образце одновременно (от 2 до 6), что статистически достоверно реже, чем обнаружение моногенотипа вируса. В образцах, где выявлена ДНК нескольких папилломавирусов, также статистически значимо чаще определялись ДНК *Ureaplasma spp.* ($\chi^2=4,4$, $P=0,03$) и ДНК *Chlamydia trachomatis* ($\chi^2=4,7$, $P=0,03$).

5. Рекомендуется обследование на инфекции, передающиеся половым путем, пациенток с положительным ВПЧ-статусом и на наличие ВПЧ женщин с диагностированными урогенитальными инфекциями для лечения с целью уменьшения риска инициирования и прогрессирования злокачественной трансформации эпителия шейки матки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Национальная программа демографической безопасности Республики Беларусь на 2007—2010 годы.— Минск, 2006.
2. Dunne E. F., Unger E. R., Sternberg M., et al. // JAMA.— 2007.— Vol. 297.— P. 813—819.
3. Schiffman M. H., Castle P. // J. Natl. Cancer Inst.— 2003.— Vol. 95.— P. E2.
4. Scheurer M. E., Tortolero-Luna G., Adler-Storthz K. // Int. J. Gynecol. Cancer.— 2005.— Vol. 15.— P. 727—746.
5. Gary M. // Cancer Epidemiol. Biomark. Rev.— 2005.— Vol. 14.— P. 1157—1164.
6. Александрова Ю. Н., Лыцеев А. А., Сафронникова Н. Р. // *Вопр. онкологии*.— 2000.— Т. 6, № 2.— С. 175—179.
7. Роговская С. И. // *Вестн. дерматолога-венеролога*.— 1998.— № 6.— С. 48—51.
8. Поляков С. М., Левин Л. Ф., Щербина О. Ф. *Злокачественные новообразования в Беларуси 1999—2008 / Под ред. И. В. Малаховой, И. В. Залуцкого*.— Минск, 2009.
9. Поляков С. М., Левин Л. Ф., Щебеко Н. Г., Щербина О. Ф. *Злокачественные новообразования в Беларуси 2000—2009 / Под ред. М. М. Сачек, А. И. Ларионовой*.— Минск, 2010.
10. Munoz N., Gastelsague X., Berrington A., Gissmann L. // *Vaccine*.— 2006.— Vol. 24.— P. 1—10.
11. Шевченко Е. А., Успенская О. А. // *Вопр. вирусологии*.— 2009.— № 4.— С. 37—39.
12. Finan R. R., Musharrafieh U., Almawi W. Y. // *Clin. Microbiol. Infect.*— 2006.— Vol. 12, № 9.— P. 927—930.
13. Smith J. S. // *J. Natl. Cancer Inst.*— 2002.— Vol. 94, № 21.— P. 1604—1613.
14. Verteramo R., Pierangeli A., Mancini E., et al. // *BMC Infect. Dis.*— 2009.— Vol. 12.— P. 9—16.
15. Herrington C. S. // *J. Pathol.*— 1999.— Vol. 189.— P. 1—3.
16. Киселева В. И., Крикунова Л. И., Шинкаркина А. П. и др. // *Рос. онкологич. журн.*— 2008.— № 3.— С. 23—26.
17. Wael I., Al-Daraji, John H. F. Smith // *Intl. J. Clin. Exp. Pathol.*— 2009.— Vol. 2.— P. 48—64.
18. De Villiers E. M., Fauquet C., Broczer T. R. // *Virology*.— 2004.— Vol. 324.— P. 17—27.
19. Евстигнеева Н. П. // *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии*.— 2006.— № 1.— С. 52—56.
20. Куведя Д. А., Шупулина О. Ю. *Генодиагностика инфекционных заболеваний: Материалы V Всерос. науч.-практ. конф.*— М., 2004.— С. 332—336.

Поступила 21.03.11.

PAPILLOMA VIRUSES OF HIGH CARCINOGENIC RISK AND OTHER UROGENITAL INFECTIONS DETECTION UNDER CERVICAL CARCINOMA PREVENTION

V. N. Belyakovsky, A. N. Volchenko, E. V. Voropayev, A. E. Silin

Objective. To determine occurrence of the urogenital infections DNA in women while examining them with preventive purpose. To determine the papilloma viruses prevailing genotypes and the infection carriage association with cervical dysplasia.

Materials and methods. One thousand and twenty three women having neither cervical carcinoma nor cervical dysplasia in the anamnesis were included in the study. Every woman was examined by a gynecologist and was taken a vaginal smear. In case the human papilloma virus DNA presenting a high cancerous risk (HCR HPV) or when the cytological findings were not satisfactory a profound examination accompanied by colposcopy and target biopsy was carried out.

For detecting the HCR HPV DNA and other urogenital infections the polymerase chain reaction was applied.

Results. DNA of one or of several pathogenic agents was detected in 65.8% of women, the HCR HPV DNA was found in 35.6%. The contamination highest level was determined in women up to 30 years of age as well as in persons having urogenital infections ($P=0.0001$) except the Chlamydia infection — its occurrence was not associated with the HPV status ($P=0.1$). In case of severe cervical dysplasia the HCR HPV DNA ($P=0.00001$), the HSV I—II DNA ($P=0.002$) and Ureaplasma spp. DNA ($P=0.02$) were detected more often than in women having normal cytograms. The Mycoplasma hominis DNA and the Chlamydia trachomatis DNA were detected with similar frequency in the groups studied ($P=0.3$ and $P=0.4$ respectively). The genotype prevailing in the population — HVP-16 — was found in 29.4% of infected women, the 2nd position was occupied by HVP-56, the 3rd — by HVP-31. In 39.0% of cases several virus genotypes were detected simultaneously — in those women the Ureaplasma spp. DNA ($P=0.03$) and the Chlamydia trachomatis DNA ($P=0.03$) were detected more often.

Conclusion. It is expedient to examine women positive for HVP as well as women having urogenital infections for infections transmitted sexually, they should be treated accordingly for reducing the risk of cervical carcinoma development.

Key words: human papilloma virus DNA presenting a high cancerous risk, prevailing genotypes, polymerase chain reaction, urogenital infections, cervical dysplasia.

Адрес для корреспонденции:

Беляковский Василий Николаевич.

Гомельский государственный медицинский университет.

246012, г. Гомель, ул. Медицинская, 7; сп. тел. (8-0232) 49-15-41.

Внимание!

На журнал «Здравоохранение» можно подписаться не только в ближайшем почтовом отделении, но и не выходя из дома или офиса!

Физические лица могут оплатить подписку с помощью пластиковой электронной карточки Mastercard, эмитированной ОАО «Белгазпромбанк», VISA и Mastercard, эмитированной ОАО «Приорбанк» или ЗАО «Минский Транзитный Банк», системы «Easypay».

Юридические лица, то есть работающие по безналичному расчету, имеют возможность сделать это через систему «Интернет-подписка» на сайте www.belpost.by.

По всем вопросам подписки на периодические издания необходимо обращаться в отделения почтовой связи по месту жительства или районный узел почтовой связи.

С. Л. ВОСКРЕСЕНСКИЙ, Я. Я. КОШЕЛЬКОВ,
С. М. КАДЫРКО, А. А. СЛАВИНСКАЯ

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ И ЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ПРИ АПЛАЗИИ ВЛАГАЛИЩА ДО И ПОСЛЕ КОЛЬПОПОЭЗА СВОБОДНЫМ КОЖНЫМ ЛОСКУТОМ

Белорусская медицинская академия
последипломного образования
Минский городской центр гигиены и эпидемиологии

Цель исследования. Установить спектр микроорганизмов в половых путях у женщин при аплазии влагалища до и после кольпопозза свободным кожным лоскутом, определить их чувствительность к антибиотикам.

Материал и методы. У 21 пациентки с врожденным отсутствием влагалища исследован спектр микробной обсемененности слизистой оболочки входа влагалища, а также определена чувствительность выявленной микрофлоры к антибиотикам до и после кольпопозза свободным кожным лоскутом.

Результаты. Установлено, что наиболее часто высеваемыми микроорганизмами были кишечная палочка ($43 \pm 4,2\%$), стафилококки, стрептококки и протей. Наиболее высокой антибактериальной активностью к микрофлоре, заселявшей половой тракт женщин с аплазией влагалища до и после кольпопозза свободным кожным лоскутом, обладали имипенем, цiproфлоксацин, гентамицин, нитрофурацион, офлоксацин, рифампицин.

Заключение. Вопрос о целесообразности применения системных антибиотиков при кольпопоззе свободным кожным лоскутом остается открытым, необходимо провести дополнительное исследование. Стерильность операционной раны во многом достигается местной обработкой трансплантированного кожного лоскута антисептическими растворами.

Ключевые слова: кольпопозз, микрофлора, чувствительность к антибиотикам.

Аплазия влагалища встречается у 1 из 5 000—10 000 женщин. Данный порок развития корректируется разными способами, но большинству пациенток требуется хирургическое лечение. Любой вариант создания влагалища (кольпопозз): из кишки, брюшины, кожи — предполагает туннелирование клетчатки малого таза [7]. При этом создается раневая поверхность площадью около 150 см^2 (диаметр канала в клетчатке 3—4 см и длина 12—14 см). Последняя в своей дистальной части примыкает к анусу, а в проксимальной части простирается вглубь клетчатки малого таза. Образованная полость в ранний послеоперационный период не имеет естественных путей дренирования, поскольку сразу после коррекции порока она тампонируется для обеспечения тесного контакта трансплантированных тканей со стенками туннеля.

В конечном счете при операции создаются условия для развития гнойно-септических процессов в клетчатке малого таза, что чревато неблагоприят-

ным исходом для жизни пациенток, поэтому в первой половине XX века в медицинских кругах обсуждали целесообразность официального запрета этого вида операций [1, 4]. Споры по данной проблеме постепенно угасли, а вопросы, связанные с микробным обсеменением вновь создаваемого влагалища, так и остались неразрешенными. Поэтому в доступной литературе, посвященной кольпопоззу, не удалось найти сведений о составе микробной флоры в половых путях пациенток с аплазией влагалища.

Цель исследования — установить преобладающий спектр микробной флоры в половых путях у женщин при аплазии влагалища до и после кольпопозза свободным кожным лоскутом, а также определить их чувствительность к антибиотикам.

Материал и методы

В микробиологическое исследование включена 21 пациентка, обратившаяся на кафедру акушерства и гинекологии БелМАПО для создания искусственного влагалища в связи с его врожденным отсутствием. Средний возраст женщин был $21 \pm 0,8$ год, рост — $167 \pm 1,4$ см, масса тела — $55 \pm 1,4$ кг. Типичный женский фенотип имели 19 пациенток, у 2 отмечали элементы маскулинизации: слабое развитие подкожно-жировой клетчатки, молочных желез, гипертрихоз.

Кроме врожденного порока развития половой системы у 3 больных наблюдалась другая патология: тазовая дистопия почки, нейроциркуляторная дистония по кардиальному типу, эпилепсия, первичный гипопаратиреоз.

Кольпопозз выполняли по методике M. Kirschner и G. Wagner [8], основанной на выстилке сформированного туннеля свободным кожным лоскутом (модификация авторов) [5, 6]. В конце операции между марлевыми салфетками, которыми тампонировалось созданное влагалище, и его стенками помещали тонкий катетер для забора микробиологического материала. В марлевых тампонах оставляли дренажную трубку, которую также использовали для промывки полости антисептическими растворами (хлоргексидин, перекись водорода).

По истечении 8 сут установленные во время операции салфетки удаляли. В последующем перевязки проводили ежедневно до момента выписки. Для профилактики развития инфекционных осложнений в послеоперационный период применяли цефтриаксон и метронидазол в средних терапевтических дозах.

Послеоперационный период у 20 пациенток протекал без особенностей. У одной образовалась гематома между лоскутом и окружающими тканями, и соответственно, дефект приживления кожной выстилки в проекции гематомы. Через 1 мес ей повторно выполнили кольпопозз свободным кожным лоскутом.

Состав микрофлоры и степень обсемененности микроорганизмами оценивали путем бактериологического исследования биологического материала, полученного до операции с участка слизистой оболочки,

соответствовавшей входу в атретическое влагалище, а после операции — из раневого отделяемого сформированного влагалища на 1—2-е, 5—7-е, 9—14-е, 15—30-е сутки, в 1—3-й, 3—6-й, 6—12-й и более 12 мес после операции.

Взятый для микробиологического исследования материал помещали в транспортную среду «Himedia» и доставляли в течение 24 ч в бактериологическую лабораторию Минского городского центра гигиены и эпидемиологии. Применяли полуколичественный метод по методике секторных посевов [2, 3]. Бактериологический посев проводили на кровяной агар, простой агар, среду Сабуро, среду накопления (сахарный бульон). Наличие анаэробов определяли путем посева материала на агар Шадлера и культивирования флоры в анаэроостате. В последующем выполняли идентификацию микроорганизмов, определяли количество возбудителя в посевах и их чувствительность к антибиотикам [2, 3].

Резистентность микрофлоры к антибиотикам определена в 74 пробах к следующим препаратам: имипенем, ципрофлоксацин, гентамицин, нитрофурантоин, офлоксацин, рифампицин, цефамандол, доксициклин, цефтриаксон, ко-тримоксазол, тетрациклин, фуразолидон, ампициллин. Восприимчивость микроорганизмов к лекарственным средствам оценивали по трем позициям: чувствительный, умеренно устойчивый, устойчивый.

Для сравнения действенности препаратов в отношении микроорганизмов использовали коэффициент эффективности антибиотика (Кэф). Его вычисляли как отношение количества проб, в которых выявлена чувствительность флоры к исследуемому препарату, к числу проб, указывающих на устойчивость микроорганизмов к данному лекарственному средству. В процессе работы было выполнено 241 микробиологическое исследование.

Результаты и обсуждение

В половом тракте женщин с аплазией влагалища были выявлены следующие микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus группы D*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Lactobacillus*, *Corinebacterium spp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter spp.* На грамположительную флору приходилось 53%, грамотрицательную — 47% микроорганизмов. Из них облигатные аэробы (*P. aeruginosa*) составили 1%, анаэробы (*Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*) — 1%, 98% — факультативные анаэробы. У 13 (62%) пациенток в 23 посевах также были выявлены грибы рода *Candida* (только в послеоперационный период).

Встречаемость микроорганизмов в материале была разная. Одни обнаруживались в большинстве посевов у многих женщин, другие — разово. Поэтому 15 выявленных микроорганизмов разделили на две группы: в 1—2 посевах у 1—2 женщин отнесли к случайным находкам, остальные 6 — к клинически зна-

чимой флоре (91% от всех высевов). В последнюю вошли: *E. coli*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *S. saprophyticus*, *P. mirabilis*.

До оперативного вмешательства *E. coli* выявлена у 12 человек (57±11% посевов), *S. epidermidis* — у 6 (29±10% посевов), *Streptococcus spp.* — у 3 (14±8% посевов), *Enterococcus spp.* — у 1 (5±5% посевов), *S. saprophyticus* — у 1 (5±5% посевов).

После выполнения операции в сформированном влагалище *E. coli* были обнаружены у 16 пациенток (41±5% посевов), *S. epidermidis* — у 8 (16±3% посевов), *Streptococcus spp.* — у 9 (17±3% посевов), *Enterococcus spp.* — у 7 (12±3% посевов), *S. saprophyticus* — у 5 (9±3% посевов), *P. mirabilis* — у 4 (3±2% посевов).

Таким образом, в половых путях женщин с аплазией влагалища до и после кольпопозза наиболее часто выявляли *E. coli*. После операции в посевах преобладали те же виды микроорганизмов, что и до оперативного вмешательства.

P. mirabilis не был дифференцирован по степеням обсемененности по техническим причинам. При этом в суммарном отношении условно-патологическая и патологическая степень обсеменения в послеоперационный период встречались чаще, чем до операции (рис. 1).

Степень обсемененности исследуемой зоны до и после вмешательства микроорганизмами, определенными в качестве значимой флоры, была различной и представила собой следующую картину.

До операции *E. coli*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.* в количестве $\leq 10^3$ не обнаружены ни у одной из пациенток, *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* — в 1 случае у 2 женщин. Обсемененность 10^4 *E. coli*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.* встречалась у 2 пациенток, *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* не обнаружены ни у одной из них. Обсемененность *E. coli* $\geq 10^5$ до операции встречалась у 5, *S. epidermidis* и *Streptococcus spp.* — у 2 пациенток. *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* не обнаружены ни у одной из них.

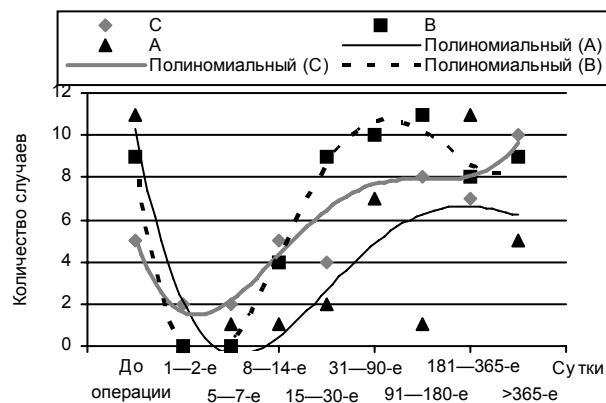


Рис. 1. Тренды обнаружения микрофлоры в зависимости от степени обсемененности: А — 10^5 ; В — 10^4 ; С — 10^3

После операции в количестве $\leq 10^3$ *E. coli* и *Streptococcus spp.* определяли у 5 пациенток для каждого из этих видов, *S. epidermidis* — у 4, *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* — у 3. Со степенью обсемененности 10^4 *E. coli*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.* обнаружены у 3 женщин для каждого из видов, *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* — у 2 для каждого вида. Со степенью обсемененности $\geq 10^5$ *E. coli* выявлены у 7 человек, *S. epidermidis* — у 1, *Enterococcus spp.* — у 2, *S. saprophyticus* и *Enterococcus spp.* не встречались ни у одной из пациенток.

Обсемененность *P. mirabilis* в количественном отношении не определена по техническим причинам (микроб был выявлен только у 4 женщин).

Сравнительная оценка потенциального антибактериального эффекта применения того или иного препарата была проведена с помощью Кэф. При эмпирическом назначении препарата с коэффициентом более 1 (указывает на чувствительность микробов к данному лекарственному средству) вероятность оказания антибактериального действия на выявленную микрофлору превышала бы 50% (рис. 2).

Из 13 тестированных антибиотиков Кэф >1 имели только 6 препаратов: имипенем, цiproфлоксацин, гентамицин, нитрофурантоин, офлоксацин, рифампицин. Следует отметить, что эффективность имипенема и цiproфлоксацина оценивали только в отношении грамотрицательной микрофлоры.

При анализе действия данных антибиотиков установлено, что офлоксацин эффективен в отношении всех 6 микроорганизмов, определенных как значимая флора, гентамицин — у *E. coli*, *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *S. saprophyticus*, рифампицин — у *Streptococcus spp.*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. В отношении *E. coli*, как наиболее встречаемого микроба в до- и послеоперационный период, из отмеченных 6 антибиотиков не был эффективен только рифампицин.

Наибольшим Кэф обладал имипенем (28), наименьшим — ампициллин (0,08). Цефтриаксон, препарат который использовали для профилактики гнойно-септических осложнений, имел Кэф 0,4.

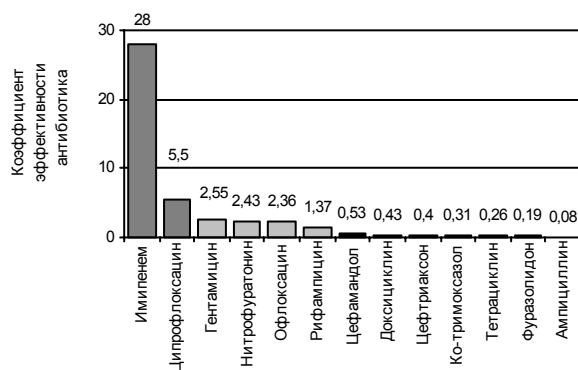


Рис. 2. Ранжирование антибиотиков по чувствительности к ним микрофлоры полового тракта женщин при аплазии влагалища

Заселение микробами зоны оперативного вмешательства имело свои особенности. В 1-ю неделю после операции, когда влагалище промывали антисептиками без смены тампона, в 44 смывах было получено 6 высевов у 3 женщин. Но после первой перевязки и в течение всего времени наблюдения (более года), микроорганизмы в половых путях определяли всегда.

Грамположительная и грамотрицательная флора до операции встречались одинаково часто. После кольпоза на протяжении первых 2 нед грамположительные микроорганизмы преобладали над грамотрицательными, в дальнейшем их соотношение становилось сопоставимым (рис. 3).

Облигатные анаэробы и аэробы не были обнаружены до операции и в ближайшие две недели после нее. В последующем их выявляли в единичных пробах, однако далеко не всегда их наличие подтверждалось при повторных исследованиях.

Грибы в анализах были обнаружены уже в конце 1-й недели после операции, правда, в единичных пробах. Но уже после первой перевязки наблюдалось обильное обсеменение (процесс постепенно угасал в течение полугода).

В послеоперационный период наблюдалось две фазы обсеменения микроорганизмами раневой поверхности. Первая начиналась с момента завершения операции и заканчивалась первой перевязкой в сочетании со сменой постельного режима на активный двигательный, что происходило на 8-е сутки. В эту фазу содержимое раневого отделяемого было преимущественно стерильным.

Во второй фазе послеоперационного периода наблюдалось быстрое заселение микрофлорой трансплантированного кожного лоскута, несмотря на ежедневные смены тампонов и обработку влагалища антисептиками. Сначала выявляли преимущественно грамположительные микроорганизмы и кандиды, а через 1 мес — весь спектр микрофлоры. Видовой состав микроорганизмов становился аналогичным тому, который был до хирургического вмешательства и использования антибиотиков для предотвращения инфекционных осложнений.

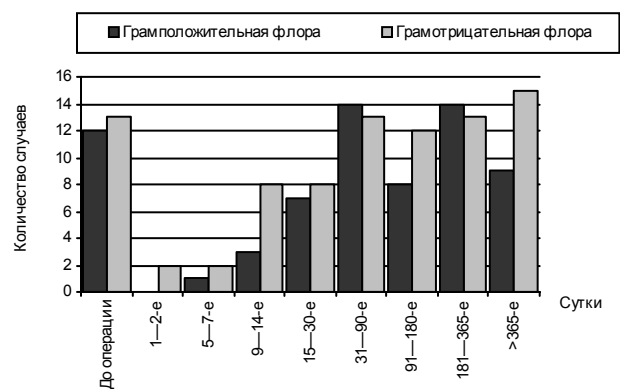


Рис. 3. Динамика обсеменения грамположительной и грамотрицательной микрофлорой сформированного влагалища

Более чем у половины женщин в послеоперационный период были выявлены кандиды. Частота их высеваемости со временем снижалась (обнаруживали на протяжении полугодия). Появление грибов после операции указывает на недостаточную эффективность профилактики кандидоза на фоне проводившейся антибактериальной терапии. Повторное появление кандид в пробах, взятых через 1 год и более, вероятно, связано с новыми случаями заражения.

Системная профилактика инфекционных осложнений осуществлялась цефтриаксоном и метронидазолом. Чувствительность выявленных в процессе исследования микроорганизмов к метронидазолу не была исследована по техническим причинам. Но то, что грамотрицательную флору в половом тракте выявляли в количествах, сопоставимых с грамположительной, только в отсроченный послеоперационный период, косвенно свидетельствует о его действительности. Коэффициент эффективности цефтриаксона к высеваемой микрофлоре показал, что теоретически этот антибиотик в случае развития гнойно-септического осложнения мог бы быть полезен лишь в 1 из 4 случаев. Но его вероятный побочный эффект в виде кандидоза развился более чем у половины женщин. Поэтому использование цефтриаксона после кольпопоза свободным кожным лоскутом для предотвращения гнойно-септических осложнений в ране не оправдано.

Согласно полученным данным для микроорганизмов, выявленных в ходе исследований, наиболее действенным антибиотиком мог бы быть офлоксацин. Достаточно эффективны также ципрофлоксацин, гентамицин, рифампицин и имипенем.

В качестве средств для подавления роста флоры использовали местные антисептики, в частности хлоргексидин и перекись водорода. Они подавляют рост большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, аэробных и анаэробных, в том числе *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Кроме того, перекись уничтожает споры многих спорогенных бактерий, некоторые виды патогенных грибов, вирусы. По всей видимости, именно эти препараты, возможно в совокупности с метронидазолом, обеспечили стерильность раны на протяжении первой фазы послеоперационного периода.

После смены постельного режима на свободный поверхность трансплантированного кожного лоскута становилась значительно доступнее для попадания микроорганизмов извне. Однако, несмотря на быстрое прогрессирующее обсеменение трансплантата, не было отмечено ни одного случая инфекционно-воспалительного процесса. Вероятно, это связано с тем, что уже к 8-му дню происходило достаточное приживание кожного лоскута, которое само по себе играло роль биологического барьера для проникновения микроорганизмов вглубь клетчатки малого таза. Отсутствие воспаления благоприятно сказалось на процессах приживания трансплантата, что позволило достичь ожидаемого результата операции.

Полученные данные указывают на то, что в послеоперационный период преимущественно выделяли те

же виды микроорганизмов, что и до оперативного вмешательства. Более того, обсемененность ими в большинстве случаев была пропорциональна таковой до хирургического вмешательства, что обосновывает определение чувствительности микрофлоры к антибиотикам.

Более значимое разнообразие микробного спектра через 1 мес и более после операции (появление облигатных анаэробов и аэробов) указывало на внешние источники инфицирования трансплантата. Последние реализовались в процессе действий, связанных с уходом за вновь сформированным влагалищем.

Таким образом, в послеоперационный период кольпопоза свободным кожным лоскутом существует высокий риск возникновения гнойно-септических осложнений в зоне оперативного вмешательства, а именно в клетчатке малого таза. Поэтому важно поддержание стерильности кожного трансплантата на протяжении времени его приживания, то есть в течение 8 сут (местная обработка стенки кожного лоскута антисептическими растворами, действенными в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры, и предотвращение непосредственного контакта полости сформированного влагалища с внешней средой). Вопрос о целесообразности применения системных антибиотиков пока остается открытым. Использованный цефтриаксон оказался неэффективным в отношении высеянной флоры в большинстве случаев, а чувствительность микроорганизмов к метронидазолу не была исследована.

В ы в о д ы

1. У женщин с аплазией влагалища до и после операции в этиологически значимом количестве были выявлены *E. coli* (43±4,2%), *Staphylococcus epidermidis* (17±3,2%), *Streptococcus spp.* (16±3,1%), *Enterococcus spp.* (11±2,6%), *Staphylococcus saprophyticus* (7,9±2,2%), *Proteus mirabilis* (2,9±1,4%).

2. Наиболее высокой антибактериальной активностью к микрофлоре, заселявшей половой тракт женщин с аплазией влагалища до и после кольпопоза, обладали имипенем, ципрофлоксацин, гентамицин, нитрофурантоин, офлоксацин, рифампицин.

3. Стерильность операционной раны при кольпопозе свободным кожным лоскутом во многом достигается местной обработкой трансплантированного кожного лоскута антисептическими растворами, действенными в отношении грамположительной и грамотрицательной флоры, и предотвращением непосредственного контакта полости сформированного влагалища с внешней средой на протяжении, по крайней мере, 8 сут.

4. Вопрос об обязательности и целесообразности применения системных антибиотиков при кольпопозе свободным кожным лоскутом остается открытым и нуждается в дополнительных исследованиях.

5. В послеоперационный период существует высокий риск развития кандидоза искусственного влагалища и необходимость проведения профилактического лечения антигрибковыми препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаркави А. В., Елисеев А. Т. // Мед. помощь.— 2000.— № 5.— С. 3—7.
2. Коломиец Н. Д. и др. Микробиологические методы исследования биологического материала: Инструкция по применению № 075-0210, утв. МЗ Республики Беларусь 19.03.2010.— Минск, 2010.
3. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР от 22.04.1985 г. № 535.— М., 1985.
4. Рабинович К. Н. Операции образования искусственного влагалища.— Л., 1939.
5. Способ формирования влагалища из свободного кожного лоскута при аплазии влагалища: пат. 9106 Республики Беларусь, МПК7 А 61В 17/42 / С. М. Кадырко, С. Л. Воскресенский, Я. Я. Кошельков // Афіцыйны бюл. / Нац. центр інтэлектуал. уласнасці.— 2007.— № 2.— С. 49—50.
6. Устройство для формирования влагалища: пат. 2694 на полез. модель Республики Беларусь, А 61В 17/42 / С. М. Кадырко, С. Л. Воскресенский, Я. Я. Кошельков // Афіцыйны бюл. / Нац. центр інтэлектуал. уласнасці.— 2006.— № 2.— С. 145.
7. Karim R. B. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reproductive Biol.— 1995.— Vol. 58, № 1.— P. 19—27.
8. Kirschner M., Wagner G. // Zentralbl Gynakol.— 1930.— Bd. 54.— S. 2690—2696.

Поступила 19.05.11.

SEXUAL PATHWAYS MICROBIAL SPECTRUM AND MICROORGANISMS SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS UNDER VAGINA APLASIA BEFORE AND AFTER COLPOPOIESIS

S. L. Voskresensky, Ya. Ya. Koshelkov, S. M. Kadyrko, A. A. Slavinskaya

Objective. To determine the sexual pathways microbial spectrum under the woman's vagina aplasia before and after colpoptosis applying a free flap of skin, to find out those microorganisms sensitivity to antibiotics.
Materials and methods. The microbial insemination spectrum of the mucous membrane of the vagina entrance and the microorganisms detected sensitivity to antibiotics before and after colpoptosis applying a free flap of skin were studied in 21 patients having been born lacking vagina.

Results. It was determined that *Escherichia coli* ($43 \pm 4.2\%$), *Staphylococci* spp., *Streptococci* spp. and *Protei* were isolated most often. Imipenem, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, ofloxacin, rifampicin were determined to be the most active against the microflora inseminating the sexual pathways of women with vagina aplasia.

Conclusion. The aspect of the systemic antibiotics administration expediency in case of colpoptosis applying a free flap of skin remains open requiring extra studies. The surgical wound sterility is provided mostly by a local treatment of the flap of skin transplanted with antiseptic solutions.

Key words: colpoptosis, microflora, sensitivity to antibiotics.

Адрес для корреспонденции:

Воскресенский Сергей Львович.
Белорусская медицинская академия последипломного образования.
220115, г. Минск, Староборисовский тракт, 16;
сл. тел. (8-017) 263-41-32.

**ОКАЗАНИЕ
ИНЖИНИРИНГОВЫХ
УСЛУГ «ПОД КЛЮЧ»**



ДиАрКласс

**ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ УТИЛИЗАЦИИ
МЕДИЦИНСКИХ ОТХОДОВ И ДЛЯ
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД
МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

- ПОСТАВКА ИЛИ СОПРОВОЖДЕНИЕ ПОСТАВКИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ
- РАЗРАБОТКА ПРОЕКТНО-СМЕТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ, АВТОРСКИЙ НАДЗОР
- ПРОВЕДЕНИЕ ШЕФ-МОНТАЖА, МОНТАЖА И ПУСКОНАЛАДОЧНЫХ РАБОТ
- ПОЛУЧЕНИЕ ЗАКЛЮЧЕНИЙ СООТВЕТСТВУЮЩИХ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ЭКСПЕРТИЗ
- ГАРАНТИЙНЫЙ И ПОСЛЕГАРАНТИЙНЫЙ СЕРВИС

ЗАО «ДиАрКласс»

220035, г. Минск, ул. Тимирязева, д. 9, корп. Литер Ж 8/н
6 этаж, комн. 601, тел./факс: (017) 200-04-32, 200-03-52
e-mail: diarklass@diarklass.by, www.diarklass.by



В. С. УЛАЩИК

КЛАССИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В МЕДИЦИНЕ

Институт физиологии НАН Беларуси

Научное исследование само по себе — не наука, это все еще искусство или мастерство.

*У. Джордж,
лауреат Нобелевской премии (1934)*

Под научным исследованием, являющимся формой существования и развития науки, обычно понимают разработку какого-либо нового вопроса, проведенную по всем правилам доказательств. В СЭС дается такое определение: «Научное исследование — процесс выработки новых знаний, один из видов познавательной деятельности». Следовательно, всякое научное исследование характеризуют два основных признака: во-первых, новизна исследуемого вопроса и получаемых в результате исследования выводов или, по крайней мере, выявление новых данных о ранее изученном вопросе, которые дают основание на иную, чем прежде, его трактовку; во-вторых, доказательность самих выводов и выдвигаемых исследователем положений. Если отсутствует один из названных признаков, то выполненную разработку вопроса нельзя квалифицировать как научное исследование [2]. Кроме того, научное исследование характеризуют объективность, воспроизводимость и точность. Научное исследование, выполненное в области медицины, хоть и обладает рядом специфических особенностей, о которых будет сказано дальше, должно в целом удовлетворять этим же требованиям.

Цель научного исследования — всестороннее, достоверное изучение объекта, процесса или явления, их структуры, связей и отношений на основе разработанных в науке принципов и методов познания, а также получение и внедрение в практику полезных для человека результатов [3]. В медицине она состоит в том, чтобы дать научно обоснованный ответ на тот или иной вопрос теории медицины, который до этого не был известен, или решить конкретную задачу, позволяющую совершенствовать практику здравоохранения, способы профилактики, лечения и реабилитации.

Научное исследование обычно состоит из двух взаимосвязанных частей. Первая — собственно процесс исследования разрабатываемой проблемы (вопроса), который имеет своей целью всестороннее ее (его) изучение. Вторую часть исследования составляет изложение, то есть литературное оформление результатов научного поиска. Эта часть непосредственно вытекает из процесса исследования и завершает его. Для того чтобы результаты исследования были убедительны, а положения, выдвигаемые исследователем, доказаны, необходимо их надлежащим образом литературно оформить, связать единой общей мыслью, системой доказательств. Следовательно, непосредственное исследование органически связано с изложением его результатов и составляет единое целое. Это две стороны одного творческого процесса.

Классификация научных исследований

Научные исследования имеют разные классификационные признаки [2, 3, 10].

По источнику финансирования различают бюджетные, договорные и нефинансируемые исследования. Первые финансируются из средств республиканского бюджета (или бюджета союзного государства), договорные — организациями-заказчиками по договорам, нефинансируемые — могут выполняться по личной инициативе ученого или по индивидуальному плану преподавателя. Особо финансируются исследования по международным исследовательским грантам, которым будет посвящена отдельная статья.

По целевому назначению принято выделять фундаментальные, прикладные и поисковые научные исследования.

Фундаментальное научное исследование — это экспериментальная или теоретическая деятельность, направленная на открытие и изучение новых явлений и законов природы, на создание новых принципов исследования, получение новых знаний об основных закономерностях строения, функционирования и развития человека. Целью фундаментальных исследований является расширение научного знания общества, установление того, что может быть использовано в практической деятельности человека [3].

Фундаментальные исследования ведутся на границе известного и неизвестного, обладают наибольшей степенью неопределенности, никогда, по существу, не бывают предсказуемыми. Поэтому нередко ставится вопрос о целесообразности проведения фундаментальных исследований. Чаще всего они противопоставляются прикладным исследованиям, имеющим, как правило, непосредственное практическое применение. И тем не менее без фундаментальных знаний, например о бактериях, не было бы вакцин, сывороток и антибиотиков. А без наблюдений за наследуемостью окраски цветков гороха вряд ли развилась бы современная генетика, достижения которой в настоящее время широко применяются в медицине. Фундаментальные исследования по наночастицам служат основой для обоснования и развития наномедицины.

Чем исследование понятнее и практичнее, тем оно ближе к уже известным фактам и обыденности. Следовательно, как ни парадоксально, знания о самых отвлеченных и непрacticalных явлениях в конечном счете часто оказываются самыми перспективными для получения принципиально новых, фундаментальных данных и ведут к разработкам новых направлений в науке. Фундаментальные исследования, как правило, становятся полезными (необходимыми) и остаются таковыми на более длительное время, чем прикладные исследования. Исследование является фундаментальным именно потому, что все другие виды исследований вытекают из него, для них оно является фундаментом.

Как справедливо отмечает К. П. Иванов, фундаментальные научные исследования важны для повышения научной компетентности ученых, а также для борьбы с лженаукой [5]. Борьба с лженаукой — это не только наступление на ложные теории, это защита фундаментальной науки и ученых, работающих в этой области, от воинствующего невежества, тормозящего развитие науки и ее эффективное практическое приложение. Это касается прежде всего биологии и медицины, которые «поражаются» лженаукой наиболее часто и наиболее тяжело [5].

Понимая важность фундаментальных исследований, многие крупные фирмы за рубежом значительную часть своей прибыли используют на их финансирование. Промышленные компании развешивают лаборатории фундаментальных исследований, ибо считают, что:

1) без фундаментальных исследований и опытных исследователей трудно выдержать конкурентную борьбу;

2) без фундаментальных исследований и компетентных ученых трудно разрабатывать новую продукцию, рассчитанную на сбыт на новых рынках;

3) только возможность проведения широких и глубоких фундаментальных исследований и академическая свобода выбора темы позволяют промышленным компаниям привлекать крупных ученых, которые могут решать трудные задачи и получать ценные консультации от других ученых и научных обществ;

4) если компания не проводит собственных фундаментальных исследований, она практически не способна воспользоваться научными открытиями, сделанными в научных учреждениях и других компаниях.

Известно, что объем затрат на фундаментальные исследования составляет 10—15% от всех затрат на науку. Однако стоимость в данном случае не пропорциональна значению этих исследований. Ошибки на ранних этапах фундаментальных исследований и неверные выводы влекут за собой впоследствии бесполезные траты на прикладные исследования или разработки. В то же время удачная идея может в перспективе дать огромный экономический эффект.

Как считает академик П. Л. Капица, успех фундаментальных научных исследований определяют три основных условия: 1) правильный выбор темы; 2) правильный подбор кадров; 3) достаточное материальное обеспечение [6]. Эти условия необходимы не только для фундаментальных, но и для других видов научных исследований, поэтому будут обсуждены в дальнейшем.

Авторы известного доклада «Политика США в области науки» к условиям, обеспечивающим успех в организации фундаментальных исследований, относят следующие: 1) бесперебойное финансирование научного проекта в течение ряда лет до получения реальных результатов; 2) наличие долгосрочной программы исследований; 3) высококвалифицированное руководство.

Конечно, каждое научное учреждение, опираясь на правила и традиции, приобретенные современной наукой в процессе своего развития, вырабатывает и некоторые свои элементы стратегии научных исследований. Их прежде всего и должны усвоить молодые ученые. Это, вне сомнения, поможет ускорить развитие научных исследований и повысить их результативность.

Прикладное научное исследование направлено преимущественно на применение новых знаний для достижения практических целей и решения конкретных задач.

Целью прикладных исследований является выявление конкретных свойств изучаемого объекта или закономерностей воздействия на него различных факторов, или применение новых методов для его изучения. В медицине прикладные научные исследования в основном направлены на создание новых методов диагностики, лекарственных средств и изделий медицинской техники, методов лечения и реабилитации, а также на расширение круга применимости уже известных методов или средств.

Прикладные исследования, в свою очередь, подразделяются на поисковые, научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы. *Поисковые исследования* направлены на установление факторов, влияющих на объект, отыскание путей создания новых технологий на основе способов, предложенных и полученных в результате фундаментальных исследований. *Научно-исследовательские работы* — создание новых технологий, опытных образцов и приборов. При *опытно-конструкторских работах* подбираются конструктивные характеристики, определяющие логическую основу конструкции (прибор, тест-система и др.).

В результате фундаментальных и прикладных исследований формируется новая научная и научно-техническая информация. Целенаправленный процесс преобразования та-

кой информации в форму, пригодную для освоения в промышленности (коммерциализация) или других отраслях народного хозяйства, обычно называют *разработкой*.

При интерпретации результатов прикладных исследований необходимо учитывать ряд характеристик или критериев оценки применяемых тестов. Они вычисляются путем сравнения с «золотым стандартом» и используются для оценки достоверности тестов. «Золотой стандарт» в медицине — референтный или эталонный метод, заслуживающий доверия показатель истины, то есть строгие, общепринятые критерии диагноза. Сравнение результатов используемого теста с «золотым стандартом» называется оценкой достоверности теста. Ориентировочно достоверность теста может быть проверена путем сопоставления получаемых данных с референтными величинами лабораторных и клинических показателей. Эталонные значения нормы лабораторных тестов для населения Республики Беларусь даны в справочном пособии, изданном под редакцией автора [16].

Основными характеристиками тестов, используемых в прикладных исследованиях, являются: чувствительность (sensitivity), специфичность (specificity), прогностическая ценность положительного результата теста (positive predictive value), прогностическая ценность отрицательного результата теста (negative predictive value), индекс точности (accuracy) и др. [3].

Известны попытки сформулировать конкретные отличия между фундаментальной и прикладной наукой. Приведем хотя бы некоторые из них. В трудах Института научной информации по общественным наукам АН СССР читаем: «Фундаментальные исследования имеют целью расширение и углубление научных знаний. Задача прикладных исследований заключается в выявлении новых возможностей в практической реализации научных достижений» [11]. Определение из книги под редакцией В. А. Трапезникова является более пространственным: «Фундаментальные исследования направлены на изучение и открытие законов и закономерностей, объективно отражающих мир. Они проводятся с целью расширить научное знание. Они включают анализ свойств, строения, внутренних и внешних взаимосвязей объекта изучения. Результатами их являются открытие законов, закономерностей развития природы и общества, а также различные теории и гипотезы. Прикладные исследования направлены на определение возможного применения результатов фундаментальных исследований. Они включают процесс рассмотрения имеющихся знаний и их расширение для решения конкретных задач для удовлетворения потребностей общества» [15].

Своеобразную характеристику фундаментальной и прикладной науке дает академик П. Л. Капица: «Между прикладной и чистой наукой имеется только одно различие: в прикладной науке научные проблемы идут из жизни, в то время как чистые науки сами ведут к прикладным результатам, потому что никакое научное знание не может остаться непримененным к жизни» [6].

Приведя эти формулировки, необходимо отметить, что наряду с чисто фундаментальными и прикладными исследованиями существуют, в том числе и в медицине, переходные и смешанные варианты рассматриваемых категорий.

Классификация научных биомедицинских исследований может проводиться и по иным принципам (цель исследования, временные параметры, тип организации исследования и др.).

Особенности научных исследований в медицине

Научные исследования в любой области науки имеют свои особенности, которые обуславливаются прежде всего объектом его познания. Поскольку объектом медицины является жизнедеятельность человека и людских коллективов в норме и при патологии, то особенности научных исследований,

предпринимаемых в данной области, заключаются в многогранности и большом разнообразии исследуемых проблем, в невозможности в ряде случаев осуществлять непосредственное и прямое изучение предмета исследования, а также в необходимости ограничения проведения экспериментальных исследований непосредственно на людях [2].

Многогранность и большое разнообразие проблем, которые составляют конкретный предмет исследований ученых-медиков, обусловлены прежде всего тем, что жизнедеятельность и здоровье людей зависят не только от закономерностей биологического порядка, но и от воздействия социальных условий жизни. При этом социальные факторы могут воздействовать на организм человека как непосредственно, так и опосредованно через натуральные факторы внешней среды (недоедание, холод, профессиональные вредности и др.). Независимо от того, какие факторы действуют на человека, всякое внешнее воздействие проявляется через внутренние биологические закономерности. Следовательно, в научных исследованиях, предпринимаемых в области медицины, наряду с глубоким анализом и раскрытием биологических закономерностей следует вскрывать также влияние на жизнедеятельность человека, состояние и уровень здоровья, особенности течения заболевания социальных факторов (социальный строй общества, условия труда, государственная политика в области здравоохранения, состояние экономики, науки и культуры и т. д.). Учитывать указанные факторы социального порядка необходимо при научных исследованиях, проводимых в любой области медицины, но наиболее важны они для таких наук, как гигиена, общественное здоровье и здравоохранение, эпидемиология, медицина труда, социология медицины и др. В связи со сложностью и многоплановостью медицины научные исследования в этой области часто приходится проводить на стыке с другими областями естественных и общественных наук, например, физики, химии, биологии, истории и др.

Вторая особенность научных исследований в медицине состоит в том, что весьма часто исследователь не в состоянии получить непосредственную информацию об интересующем его объекте или процессе. Это прежде всего относится к молекулярным явлениям, а также к внутренним органам живого человеческого организма, трудно доступным для непосредственного их обзора и осмотра. Правда, при современном уровне развития науки и техники возможности такого обследования значительно расширились и продолжают расширяться. Сегодня исследователь может прибегнуть к рентгеновским и оптическим методам обследования, сонографии, томографии, ангиографии, изотопному исследованию с последующим сканированием органов, к различным видам эндоскопии и другим методам, позволяющим получать информацию о состоянии и патологических изменениях внутренних органов в гораздо большем объеме, чем это было возможно прежде. Но даже получаемая с помощью современных методов и технических средств информация не всегда является исчерпывающей и дает лишь частичное вероятностное представление об интересующем органе или изучаемом процессе. Не следует также забывать, что многие инструментальные методы сами по себе не безразличны для обследуемого объекта, поскольку их применение связано с определенными, иногда довольно сильными, тягостными и даже болезненными ощущениями либо с неблагоприятным влиянием на организм. В этой связи уместно привести слова одного из выдающихся клиницистов академика И. А. Кассирского (1898—1971): «Никогда инструментальное исследование не должно быть горше (опаснее) болезни..., то есть если болезнь не опасна и ее последствия ничем серьезным не угрожают больному, лучше не производить опасного инструментального исследования» [8].

Поэтому в исследованиях медицинского характера весьма широко используют методы, которые позволяют оценивать состояние изучаемого объекта на основании косвенных

и ретроспективных данных. Например, применяя различные методы функциональной диагностики, скажем, электрокардиографию или электроэнцефалографию, в особенности с нагрузочными тестами, можно получить хотя и косвенным путем, но тем не менее достаточно отчетливое представление о состоянии, функциях, а в ряде случаев и о патологических изменениях различных органов и систем человеческого организма. Для диагностики различных заболеваний и оценки эффективности их лечения широко применяют клиничко-лабораторные исследования крови, мочи, желудочного сока, слюны, спинномозговой жидкости и других биологических продуктов, отражающих жизнедеятельность организма. Ретроспективная оценка происходящих в организме изменений и патологических процессов может быть проведена посредством прижизненных (биопсия) или посмертных (секция трупа) патологоанатомических, гистологических и иных исследований.

Научному становлению медицины во многом способствовало использование экспериментального метода. В настоящее время эксперимент часто и широко применяется в самых различных областях теоретической и практической медицины. Сбылись пророческие слова одного из основоположников экспериментальной патологии К. Бернара (1813—1878), утверждавшего: «Врач будущего есть врач-экспериментатор... Экспериментирование приводит нас к самой причине болезни, объясняет механизмы ее и научает рационально на нее воздействовать».

Отдавая должное экспериментам, предпринимаемым в медицине для познания закономерностей функционирования живых систем в норме и при патологии, следует отметить, что они имеют ряд существенных отличий от экспериментальных исследований, проводимых в области точных наук. Это зависит, прежде всего, от чрезвычайной сложности и многообразия явлений жизни. Поэтому если результат эксперимента, проведенного в определенных условиях в сфере таких точных наук, как физика или химия, относительно постоянен, то результат медико-биологического экспериментального исследования определяется многими привходящими факторами. Среди последних можно назвать исходное функциональное состояние организма, влияние на его жизнедеятельность не только условий внешней среды, но и многочисленных эндогенных факторов и др. Для получения достоверных искусственно воспроизводимых экспериментальным путем данных (явлений) биологического или медицинского порядка необходимо строгое соблюдение правил проведения такого эксперимента и обязательный их статистический анализ, о которых речь будет идти в последующих материалах рубрики. Вот как эту специфическую особенность эксперимента, проводимого в биологии и медицине, в свое время прокомментировал выдающийся патофизиолог А. Д. Сперанский: «Переходя к биологии, мы почти теряем право что-либо предвидеть, так как здесь повторяются лишь основные моменты явлений. Среди них всегда оказываются многочисленные надстройки, из которых каждая есть результат особо сложного процесса. Отсюда различие между фактами биологии и фактами точных наук. Степень достоверности фактов биологии часто определяется лишь статистикой их воспроизведения» [14].

Особенность и трудность экспериментального изучения явлений медицинского (биологического) характера состоит еще и в том, что в процессе эксперимента обычно можно досконально оценить не все стороны жизнедеятельности целостного организма. А следовательно, общую оценку изучаемых экспериментальным путем явлений такого рода возможно сделать только путем накопления большого количества фактов, их сопоставления и статистической обработки. Это, вне сомнения, повышает роль логического мышления в процессе анализа и обобщения данных медико-биологического эксперимента, прежде всего осмысления полученных данных, их сопоставления с ранее имевшимися фактами и концепциями.

Есть еще одна особенность исследований в медицине, которая относится к экспериментам медицинского характера. Как известно, очень многие интересующие исследователя данные, относящиеся к жизнедеятельности здорового или патологически измененного организма, нельзя получить путем постановки эксперимента непосредственно на людях, так как сам по себе эксперимент может оказаться небезопасным для их здоровья. Поскольку медицина, являясь одной из наиболее гуманных наук, призвана охранять и укреплять здоровье людей, облегчать страдания больных и бороться за их выздоровление, то экспериментирование на людях, особенно на больных, недопустимо, если может повлечь за собой хоть какой-либо ущерб их здоровью. Такие эксперименты не только недопустимы, но и уголовно наказуемы. Основные принципы проведения медико-биологических исследований с участием людей изложены в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (см. приложение).

Из-за ограничения исследований на людях подавляющее большинство медико-биологических экспериментов, прежде всего острых, проводится на животных. Однако эксперименты на животных, находящихся в искусственно созданных исследователем условиях, не могут иметь самодовлеющего (абсолютного) значения, так как его результаты нельзя безоговорочно переносить на человека. Эксперимент на животных нужно рассматривать лишь как модель жизнедеятельности организма человека и ее изменений, вызванных влиянием тех или иных экзогенных и эндогенных факторов. Совершенно очевидно, что достоверность и доказательность такого эксперимента будут зависеть прежде всего от выбранного объекта моделирования и от искусства и методической подготовленности самого экспериментатора. Только при учете этих обстоятельств можно рассчитывать на создание экспериментальной модели, в максимальной степени приближающейся к реальным условиям нормальной или патологически измененной жизнедеятельности человека. В «Школе молодого ученого» еще предстоит разговор об эксперименте и экспериментаторе, в контексте данной статьи лишь сделаем ссылки на источники, с которыми полезно познакомиться начинающим исследователям [1, 7, 12, 13, 17].

Основанием для возможной замены исследований на человеке экспериментальной моделью животного является момент объективной общности, присущей всем организмам как живым системам. Такая общность, однако, не исключает и присущих им объективных различий, поэтому практика в конечном счете является единственным критерием истинности и показателем степени достоверности в медицине. Разумеется, специфические особенности модельного эксперимента потребуют внести уточнения и коррективы при корреляции как условий экспериментов, так и данных, полученных в результате экспериментальных исследований, с тем, что представляют собой изучаемые исследователем реальные явления и процессы, свойственные человеческому организму или жизнедеятельности людей [2]. Проблема переноса экспериментальных данных на человека сложна, многогранна, не поддается однозначному толкованию и по сей день остается предметом активных исследований и дискуссий. Сориентироваться в ней могут помочь изданные монографии отечественных и зарубежных авторов, а также многочисленные публикации в периодических изданиях [4, 8, 17].

В особо важных случаях результаты экспериментов на животных могут быть уточнены и скорректированы путем постановки дополнительных исследований на добровольцах. Но предпринимать эти эксперименты допустимо лишь после того, когда в неоднократных экспериментах на животных установлены не только условия безопасного проведения исследований на испытуемых добровольцах, но и определены надежные способы преодоления возможного неблагоприятного влияния эксперимента на организм человека.

В заключение следует подчеркнуть, что изложенным не исчерпываются материалы затронутой в настоящей статье тематики. К ней мы намерены возвращаться и в последующих статьях, так как между различными темами, которые будут рассматриваться в «Школе молодого ученого», имеется теснейшая связь. Подготовленная статья не столько призвана исчерпывающе осветить проблему, сколько привлечь молодых исследователей к ней и последующим публикациям.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований* / Под ред. Н. В. Лазарева.— Л., 1954.
2. *Георгиевский А. С. Методология и методика научно-исследовательской работы в медицине.*— Л., 1981.
3. *Грачев С. В., Городнова Е. А., Олферьев А. М. Научные исследования в биомедицине.*— М., 2005.
4. *Даренская Н. Г., Ушаков И. Б., Иванов И. В. и др. От эксперимента на животных — к человеку: поиски и решения.*— Воронеж, 2010.
5. *Иванов К. П. О фундаментальных и прикладных исследованиях в биологических науках.*— Л., 1986.
6. *Капица П. Л. Эксперимент, теория, практика.*— М., 1977.
7. *Каркищенко Н. Н. Основы биомоделирования.*— М., 2004.
8. *Кассирский И. А. О врачевании.*— М., 1970.
9. *Красовский Г. Н., Рахманян Ю. А., Егорова Н. А. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека.*— М., 2009.
10. *Медицинская диссертация: Руководство* / Под ред. И. Н. Денисова.— М., 2009.
11. *Методология оценки и выбора проектов исследований и разработок. Научно-аналитический обзор* // Институт научной информации по общественным наукам.— М., 1981.
12. *Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л., Багаев В. А. Экспериментальная хирургия лабораторных животных.*— СПб., 2007.
13. *Саркисов Д. С., Ремезов П. И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте.*— М., 1960.
14. *Сперанский А. Д. Избранные труды.*— М., 1955.
15. *Управление НИОКР: исследования, разработки, внедрение* / Под ред. В. А. Трапезникова.— М., 1978.
16. *Физиологические значения лабораторных тестов у населения Республики Беларусь* / Под ред. В. С. Улащика.— Минск, 2010.
17. *Heavner J. E. Methods of Animal Experimentation.*— London, 1986.

Поступила 05.08.11.

Адрес для корреспонденции:

Улащик Владимир Сергеевич.
Институт физиологии НАН Беларуси.
220072, г. Минск, ул. Академическая, 28; сл. тел. (8-017) 332-16-00.

Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации для врачей по проведению биомедицинских исследований на людях (принята 18-й Всемирной медицинской ассамблеей, Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г., последний пересмотр — октябрь 1996 г., 48-я Всемирная медицинская ассамблея, ЮАР)

I. Основные принципы

1. В основе медико-биологических исследований с участием людей должны быть достоверные экспериментально-лабораторные данные, они должны соответствовать общепринятым научным принципам и быть тщательно обоснованы на современном научном уровне.

2. Общая схема и план проведения каждого этапа исследования должны быть четко описаны в протоколе, который представляется на рассмотрение и утверждение специальной комиссии. Члены комиссии должны быть независимы от лиц, проводящих исследование и спонсора исследования. Состав комиссии формируется в соответствии с законодательством страны, в которой проводится исследование.

3. Исследования с участием людей должны выполняться квалифицированным персоналом под наблюдением опытного врача. Во всех случаях ответственность за пациента несет врач, но не сам пациент, несмотря на данное им информированное согласие.

4. Исследование может быть проведено лишь в тех случаях, когда важность поставленных в нем задач сопоставима с риском исследования.

5. Всякий раз перед проведением экспериментальной части исследования следует взвесить ожидаемые пользу и риск для испытуемого. Интересы пациента всегда превыше интересов науки и общества.

6. Всегда следует соблюдать право пациента на полноценность и частную жизнь. Следует использовать все меры предосторожности для устранения влияния исследования на личные качества, физическое и психическое здоровье испытуемого.

7. Врач соглашается на проведение исследования лишь тогда, когда может оценить ожидаемый риск. В тех случаях, когда риск исследования превышает ожидаемую от него пользу, врач обязан прекратить исследование.

8. При публикации результатов исследования врач обязан быть честным. Результаты исследований, проведенных не в соответствии с принципами настоящей Декларации, не должны публиковаться.

9. Каждый участник исследования должен быть заранее информирован о его целях, задачах, методах, ожидаемом риске и пользе, а также о неудобствах, которое это исследование может причинить. Исследователь должен получить от испытуемого добровольно подписанное информированное согласие на участие. Каждый участник должен знать, что его участие в исследовании добровольное и что он (она) могут в любое время его прекратить.

10. При получении информированного согласия на участие в исследовании врач должен быть предельно корректным, чтобы избежать принуждения, особенно если предполагаемый участник зависим от него. В подобных случаях выходом может стать получение информированного согласия другим врачом, не участвующим в проведении исследования и никак не связанным ни с исследователем, ни с испытуемым.

11. При официально установленной недееспособности, а также при несовершеннолетии предполагаемого участника, согласие на участие может быть получено его официальным представителем в соответствии с местным законодательством. В случаях, когда получение информированного согласия от испытуемого невозможно (например, у физически или умственно неполноценных лиц), согласие на их участие могут давать близкие родственники, при соблюдении тех же условий. В случае обязательного получения информированного согласия от несовершеннолетнего (несовершеннолетней) необходимо дополнительное согласие его (ее) официального представителя.

12. Протокол исследования всегда должен содержать разъяснение этических вопросов участия в нем в соответствии с принципами настоящей Декларации.

II. Клинические медицинские исследования (исследования, связанные с оказанием медицинской помощи)

1. В процессе лечения врач должен быть свободен в выборе методов диагностики и лечения, если, по его мнению, это приведет к спасению жизни, укреплению здоровья или облегчению страданий больного.

2. Врач должен сравнить потенциальные пользу, риск и неудобства нового метода с таковыми у лучших из известных и применяющихся.

3. В любом клиническом исследовании, независимо от наличия контрольной группы, больному должны проводиться максимально информативные исследования, он должен получать максимально эффективное лечение.

4. Отказ больного от участия в исследовании не должен ухудшать отношения к нему врача.

5. Если врач считает, что в заблаговременном получении информированного согласия больного нет необходимости, он должен письменно обосновать свое мнение в протоколе и заблаговременно представить его на рассмотрение независимой комиссии в соответствии с требованиями, изложенными в п. 1—2 (см. выше).

6. Врач может сочетать медицинское исследование с медицинской практикой лишь в тех случаях, когда это находится в интересах его больных.

III. Неклинические медико-биологические исследования (исследования, не связанные с оказанием медицинской помощи)

1. Проводя чисто научные (не практические) исследования на людях, врач несет ответственность за их жизнь и здоровье.

2. В неклинических медико-биологических исследованиях должны участвовать здоровые добровольцы или лица, чьи заболевания несут незначительные для исследования.

3. Исследователь и его сотрудники обязаны прекратить исследование, если его продолжение чревато опасностью для участников.

4. В любом медико-биологическом исследовании жизнь и здоровье испытуемых всегда превыше интересов науки и общества.



С. П. ЛЕЩУК, М. П. ПОТАПНЕВ, С. А. ЛЯХ,
Л. Г. ЛАГОДИЧ

АНАЛИЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ КРОВИ В ОРГАНИЗАЦИЯХ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РНПЦ гематологии и трансфузиологии
Минздрава Республики Беларусь

Цель исследования. Доказать зависимость гемотрансфузионной терапии в организациях здравоохранения стационарного типа от уровня оказания медицинской помощи, обосновать дифференцированные нормативы обеспечения компонентами крови.

Материал и методы. Проведен анализ гемотрансфузионной терапии по материалам 49 клинических протоколов лечения, статистической отчетности 15 организаций здравоохранения различного профиля первичной и специализированной медицинской помощи, включая высокотехнологическую медицинскую помощь. Организации здравоохранения были распределены по группам в зависимости от уровня потребления гемокомпонентов в Республике Беларусь.

Результаты. Чаще всего клиническими протоколами лечения предусмотрено применение трансфузий эритроцитарной массы и свежезамороженной плазмы, что соответствует общепринятым нормам. Показано, что трансфузионная активность в расположенных в Минске республиканских научно-практических центрах Министерства здравоохранения (РНПЦ), оказывающих высокотехнологическую медицинскую помощь, в 2,5 раза выше, чем в областных клинических больницах, и в 3,5 раза выше, чем в центральных районных больницах.

Заключение. Выявлено существенное превышение установленного нормативами потребления компонентов крови организациями здравоохранения Минска, где сосредоточены РНПЦ.

Ключевые слова: организации здравоохранения, уровень оказания медицинской помощи, трансфузионная активность, высокотехнологическая медицинская помощь.

Рациональное использование гемопродуктов в учреждениях здравоохранения является основной задачей деятельности организаций переливания крови Республики Беларусь на современном этапе [1—3].

Формирование за последние годы двухуровневой системы оказания врачебной медицинской помощи (первичной и специализированной, включая высокотехнологическую) в Беларуси привело к тому, что на уровне центральной районной или межрайонной, областной больницы, специализированного центра потребности в обеспечении гемотрансфузионными средами одной профильной койки (хирургической, терапевтической и др.) стали значительно отличаться от установленных, усредненных государственных нормативов [14].

В последнее время произошли значительные изменения и во врачебной тактике ведения больных с тяжелой патологией: внедрение трансплантации ор-

ганов и тканей, интенсивных протоколов лечения ожогов, травм, сердечно-сосудистой патологии, онкологических заболеваний [4—6]. Повысился оборот койки и интенсивность лечения. Часто при многократных трансфузиях пациентам в соответствии с существующими протоколами лечения возникает потребность в использовании компонентов крови, подвергнутых дополнительной обработке (отмывание от плазмы, лейкофилтрация, облучение и т. д.), что повышает их стоимость и требует дополнительного учета при формировании нормативов трансфузиологического обеспечения [2, 7, 8].

В течение 2009—2010 гг. были выполнены исследования по оценке объемов гемотрансфузионного обеспечения организаций здравоохранения республики на основе анализа утвержденных Министерством здравоохранения клинических протоколов лечения; статистической отчетности из организаций здравоохранения (ОЗ) стационарного типа, оказывающих первичную (центральные районные больницы — ЦРБ), специализированную (областные клинические больницы — ОКБ) и высокотехнологическую медицинскую помощь (РНПЦ); объемов реализации компонентов крови.

Материал и методы

Для оценки трансфузиологического обеспечения ОЗ Беларуси использовано несколько подходов.

Во-первых, проанализированы утвержденные Министерством здравоохранения Республики Беларусь клинические протоколы лечения основных заболеваний человека (49 протоколов).

Во-вторых, оценивалось фактическое потребление компонентов крови на основе изучения статистической отчетности ОЗ за 2008 г. (15 стационаров были классифицированы по группам в зависимости от уровня оказания медицинской помощи: ЦРБ—ОКБ—РНПЦ).

В-третьих, проведен сравнительный анализ суммированных показателей нормативного и реального потребления компонентов крови ОЗ Минска и регионов республики (данные за 2009 г.).

Трансфузионная активность (ТА) организаций здравоохранения стационарного типа рассчитывалась по формуле:

$$ТА = \frac{N1 \times 100}{N},$$

где N — число выбывших пациентов; N1 — число пациентов, получивших гемотрансфузии, из числа выбывших.

Для статистической обработки результатов исследования использовали программу STATISTICA 6.0. Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку применяли непараметрический метод Манна—Уитни; для сравнения множественных групп — Краскела—Уоллиса; для выявления корреляционной зависимости — корреляцию Спирмена. Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проанализированы 49 клинических протоколов лечения больных, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь в 2003—2009 гг., включающих 2135 нозологических форм: 249 (12%) — хирургический профиль и 1886 (88%) — терапевтический. Указания на применение гемотрансфузионной терапии найдены в 179 случаях лечения пациентов различных нозологических форм (52, или 20,8%, — хирургический профиль и 127, или 6,7%, — терапевтический (табл. 1).

Чаще всего клиническими протоколами лечения больных предусмотрено применение трансфузий эритроцитной массы (ЭМ) (46% — в хирургии, 55% — в терапии) и свежезамороженной плазмы (СЗП) (73,1% — в хирургии, 85% — в терапии), что соответствует общепринятым нормам [7, 9, 15]. Частота использования концентрата тромбоцитов (КТ) значительно реже (17,3% — в хирургии, 30,7% — в терапии). Сочетанный характер гемотрансфузионной терапии (ЭМ+СЗП) отмечался в 34 (65,4%) случаях хирургических протоколов и 22 (17,3%) случаях терапевтических протоколов, что соответствует международной практике [6, 9, 10]. Таким образом, на основании изучения клинических протоколов лечения больных определено, что в хирургии чаще предусмотрено применение сочетанной гемокомпонентной терапии, чем в терапии, что обусловлено тяжестью состояния

хирургических пациентов и сопровождающимися кровотечениями различного генеза [11—13].

На втором этапе исследования был проведен анализ фактического потребления компонентов крови ОЗ.

В ходе исследования была обработана статистическая отчетность за 2008 г. из 15 стационаров республики с различным уровнем оказания медицинской помощи. В 1-ю группу вошли стационарные ОЗ, оказывающие высокотехнологичную медицинскую помощь, во 2-ю — ОЗ, оказывающие специализированную, в 3-ю — первичную медицинскую помощь (табл. 2).

Из представленных данных следует, что средняя ТА по РНПЦ составила 22,0% [8,5—52,0], по ОКБ — 8,9% [6,1—13,8], по ЦРБ — 6,3% [3,2—11,6]. Были выявлены статистически достоверные различия между показателями 1-й и 2-й ($P=0,06$) и 1-й и 3-й групп ($P=0,05$). Следовательно, ТА в специализированных ОЗ, оказывающих высокотехнологичную медицинскую помощь, в 2,5 раза выше, чем в ОКБ, и в 3,5 раза выше, чем в ЦРБ.

Одновременно было обращено внимание на значительный объем выполнения высокотехнологичных операций (ВТО) в РНПЦ (варьирует от 6,8% в РНПЦ онкологии и медицинской радиологии до 80,1% в РНПЦ «Кардиология») по сравнению с долей операций, выполненных в ОЗ, оказывающих специализированную медицинскую помощь (от 1,6% в Гомельск-

Таблица 1

Частота указаний на использование гемотрансфузионных сред в клинических протоколах лечения

Компонент крови	По хирургическим протоколам	По терапевтическим протоколам
Эритроцитная масса	24/52	70/127
Свежезамороженная плазма	38/52	108/127
Концентрат тромбоцитов	9/52	39/127
Сочетанная гемокомпонентная терапия	34/52	22/127

Таблица 2

Характеристика организаций здравоохранения стационарного типа

Организация здравоохранения	Количество пролеченных пациентов	Количество пациентов, получавших гемотрансфузии	Количество проведенных хирургических операций		Трансфузионная активность, %
			всего	из них ВТО абс., (%)	
1-я группа:					
РНПЦ «Кардиология»	4353	883	2581	2090 (80,1)	20,3
РНПЦ травматологии и ортопедии	7481	1455	4780	793 (16,6)	19,4
РНПЦ онкологии и медицинской радиологии	21 215	1810	9766	797 (8,2)	8,5
РНПЦ «Мать и Дитя»	7491	741	2508	641 (25,5)	9,9
РНПЦ детской онкологии и гематологии	4807	2498	997	68 (6,8)	52,0
2-я группа:					
Гродненская ОКБ	31 416	2198	16 624	329 (2)	7,0
Брестская ОКБ	29 023	1767	14 256	372 (2,6)	6,1
Гомельская ОКБ	25 186	1793	17 376	286 (1,6)	7,1
Могилевская ОКБ	28 817	3014	13 317	694 (5,2)	10,5
Минская ОКБ	26 234	3634	12 918	1714 (13,3)	13,8
3-я группа:					
Березовская ЦРБ	9761	336	2026	0	3,4
Молодеченская ЦРБ	16 326	1636	9463	0	10,0
Борисовская ЦРБ	17 342	2015	5001	0	11,6
Слуцкая ЦРБ	15 413	492	6169	0	3,2
Глубокская ЦРБ	5666	179	635	20 (3,1%)	3,2

кой ОКБ до 13,3% в Минской ОКБ). За исключением Глубокской ЦРБ (3,1%) на уровне оказания первичной медицинской помощи в 2008 г. ВТО не выполняли. Несмотря на увеличение в 2009—2010 гг. количества выполняемых ВТО в областных (кардиохирургия, травматология) и центральных районных больницах (эндопротезирование суставов), основной объем ВТО сохраняется в специализированных организациях здравоохранения, расположенных в Минске.

Было проанализировано распределение пациентов с гемотрансфузиями в выборке в целом в ОЗ стационарного типа и по отделениям. Анализ потребления компонентов крови показал следующие результаты.

Среднее количество пациентов, получавших гемотрансфузии в ОЗ стационарного типа, составило 1630 [179—3634] человек, стандартное отклонение — 988,8. В 40% случаев насчитывалось от 1561 до 2252 больных, в 40% случаев — от 179 до 1561, в 20% случаев — от 2252 до 3634 человек. В РНПЦ среднее количество пациентов, получавших гемотрансфузии в хирургических отделениях (ХО) с операционными блоками, составляло 665 [271—1358] человек, в отделениях анестезиологии и реаниматологии (ОАР) — 475 [251—677], в терапевтических отделениях (ТО) — 163 [126—201] человека. В ОКБ среднее количество больных, получавших гемотрансфузии в ХО, составляло 752 [541—1022] человека, в ОАР — 959 [407—2271], в ТО — 659 [37 — 1960]. В ЦРБ среднее количество пациентов с гемотрансфузиями в ХО (операционных) составляло 604 [61—1540] человека, в ОАР — 216 [65—310] и 112 [53—165] — в ТО. Объемы потребления компонентов крови на областном уровне оказания медицинской помощи зависят, прежде всего от наличия в стационаре гематологических коек. Таким образом, основное количество пациентов с гемотрансфузиями в РНПЦ сосредоточены в хирургических отделениях с операционными блоками, в ОКБ — в отделениях анестезиологии и реаниматологии, в ЦРБ — в хирургических отделениях.

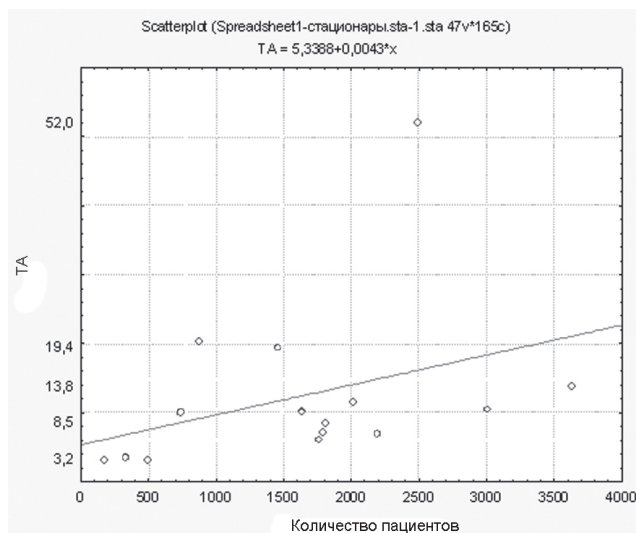


Рис. 1. Зависимость между количеством пациентов, получавших гемотрансфузии, и ТА в организациях ОЗ стационарного типа (корреляция Спирмена)

Также была исследована зависимость между количеством пациентов, получавших гемотрансфузии, и ТА во всех ОЗ стационарного типа, включенных в исследование (рис. 1). Выявлена умеренная, прямая, статистически достоверная корреляционная зависимость ($r=+0,353$, $P=0,044$), что свидетельствует о наличии прямой связи между количеством пациентов, получавших гемотрансфузии, и ТА стационара.

Оценена возможная связь между объемом потребления компонентов крови с числом выполняемых операций. Среднее количество оперативных вмешательств в ОЗ стационарного типа разных уровней оказания медицинской помощи ($n=15$) составило 7894 [635—17 376] операции: в 53% случаев их число варьировало от 635 до 7331, в 20% — от 14 028 до 17 376 операций в год. По РНПЦ среднее количество оперативных вмешательств на учреждение за 2008 г. составило 4126 [997—9766], по ОКБ — 14 898 [12 918—17 376], по ЦРБ — 4659 [635—9463] операций. При сравнении показателей хирургической активности в трех группах ОЗ стационарного типа получено статистически достоверное различие ($P=0,013$). Таким образом, в областных организациях здравоохранения, оказывающих специализированную медицинскую помощь (учитывая большой коечный фонд и многопрофильность учреждения), число операций в 3,6 раза больше, чем в РНПЦ, расположенных в Минске, и в 3,2 раза больше, чем в ЦРБ.

На фоне различий в объемах оперативных вмешательств в ОЗ стационарного типа были также выявлены различия в количестве ВТО (рис. 2).

Среднее количество выполняемых ВТО в год в 1-й группе составило 937 [68—2090] операций на учреждение, во 2-й — 766 [286—1714], в том числе за счет Минской ОКБ, в 3-й — 4 [0—20] ($P=0,03$). Также установлено статистически достоверное различие между показателями 1-й и 3-й ($P=0,007$) и 2-й и 3-й групп ($P=0,009$). То есть существует прямая связь между уровнем оказания медицинской помощи в ОЗ стационарного типа и объемом ВТО.

На третьем этапе исследования сравнивали нормированное и реальное потребление компонентов крови ОЗ по регионам.

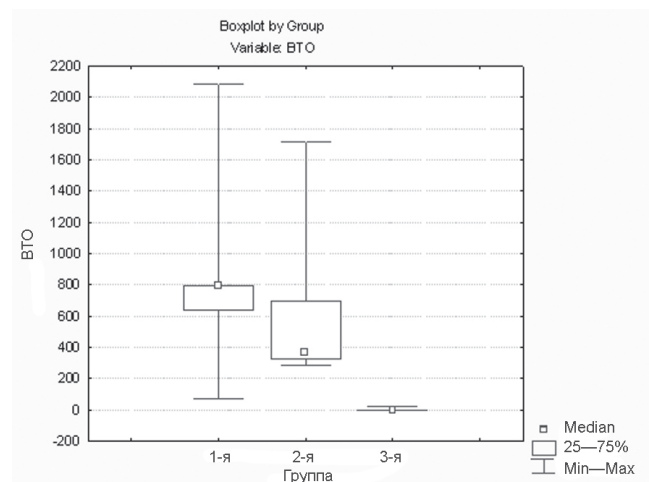


Рис. 2. Количество ВТО

Стандарты трансфузиологического обеспечения населения страны были рассчитаны на основании Постановления Совета Министров Республики Беларусь № 1637 от 25 ноября 2002 г. «Об утверждении нормативов обязательного обеспечения потребностей системы государственного здравоохранения донорской кровью, ее компонентами и препаратами из донорской крови, в том числе с учетом необходимости создания резервов на случай чрезвычайной ситуации».

При анализе обеспечения продуктами крови ОЗ республики за 2009 г. использовали данные потребления компонентов крови ОЗ стационарного типа.

Всего для переливания было использовано 45 197,9 л ЭМ (с учетом остатков 2008 г. и вычетом переходящих остатков на 2010 г.), что составило 106% от расчетной потребности в данном компоненте крови (рис. 3). В процентном отношении реальное потребление ЭМ больницами к нормативному выражается следующим образом: Минск — 188,3%; Брестская обл. — 93,9%; Витебская обл. — 124,0%; Гомельская обл. — 78,0%; Гродненская обл. — 92,6%; Минская обл. — 93,1%; Могилевская обл. — 60,3%. В целом по областям республики без учета Минска — 89,9%.

В ОЗ республики для переливания выдано 48 743,4 л СЗП, что составило 72,3% от расчетной потребности (рис. 4). В процентном отношении потребление СЗП в больцах ОЗ выражается следующим образом: Минск — 130,5%; Брестская обл. — 56,0%; Витебская обл. — 54,7%; Гомельская обл. — 45,6%; Гродненская обл. — 56,5%; Минская обл. — 88,3%; Могилевская обл. — 61,8%.

Всего по республике в 2009 г. в ОЗ выдано 65 537 доз КТ, что составило 218,8% от расчетной потребности (рис. 5). Отношение реального потребления КТ к нормированному в ОЗ стационарного типа выражается следующим образом: Минск — 451,4%; Брестская обл. — 100,4%; Витебская обл. — 97,3%; Гомельская обл. — 206,6%; Гродненская обл. — 76,4%; Минская обл. — 126,8%; Могилевская обл. — 145,5%.

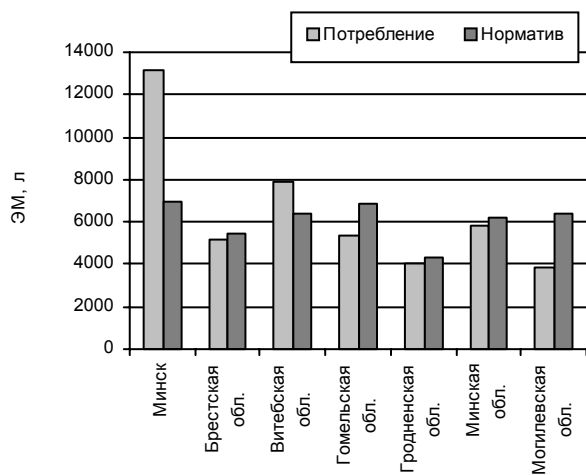


Рис. 3. Сравнительная характеристика объемов потребленной и предусмотренной нормативами ЭМ

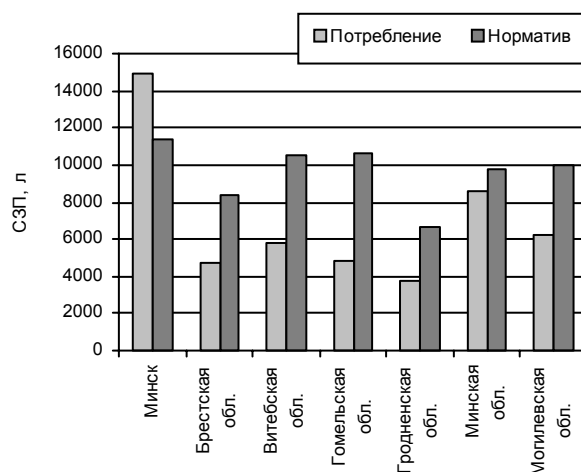


Рис. 4. Сравнительная характеристика объемов потребленной и предусмотренной нормативами СЗП

Как видно, наибольшее потребление продуктов крови отмечается в Минске, предусмотренные нормативы использования ЭМ превышены в 1,9 раза, СЗП — в 1,4 раза, КТ — в 4,5 раза. Это связано с тем, что в Минске сконцентрированы ОЗ стационарного типа, оказывающие населению высокоспециализированную медицинскую помощь, в том числе ВТО.

Выводы

1. В отличие от терапевтических протоколов лечения пациентов хирургические чаще предусматривают применение сочетанной гемокомпонентной терапии.
2. Трансфузионная активность в специализированных организациях здравоохранения Минска, оказывающих высокотехнологичную медицинскую помощь, в 2,5 раза выше, чем в областных клинических больницах (специализированная медицинская помощь), и в 3,5 раза выше, чем в центральных районных больницах (первичная медицинская помощь).
3. Существует прямая связь между уровнем оказания медицинской помощи и объемом высокотех-

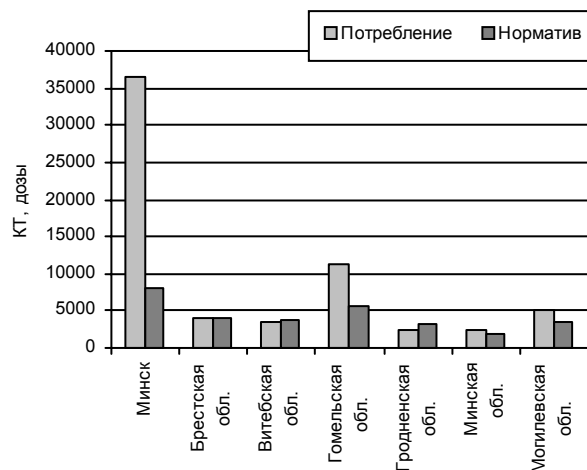


Рис. 5. Сравнительная характеристика объемов потребленного и предусмотренного нормативами КТ

нологических операций, выполняемых в организациях здравоохранения стационарного типа.

4. Сравнение нормированного и реального потребления компонентов крови организациями здравоохранения Республики Беларусь выявило существенное превышение последнего в Минске, где сосредоточены республиканские научно-практические центры Министерства здравоохранения: в 1,9 раза по эритроцитной массе, в 1,4 раза по свежезамороженной плазме, в 4,5 раза по концентрату тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Потопнев М. П., Никанчик Т. А. // Мед. новости.— 2008.— № 9.— С. 47—49.
2. Жибурт Е. Б. Бенчмаркинг заготовки и переливания крови.— М., 2009.
3. Румянцев А. Г., Аграненко В. А. Клиническая трансфузиология: показания, методы проведения, эффективность, осложнения.— М., 1997.
4. Жибурт Е. Б. Трансфузиология.— СПб., 2002.
5. Селиванов Е. А., Дуткевич И. Г. // Трансфузиология.— 2008.— Т. 9, № 2.— С. 4—25.
6. Шевченко Ю. Л. Руководство по общей и клинической трансфузиологии.— СПб., 2003.
7. Guide to the Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components: Recommendation No. R (95) 15.— France, 2009.
8. Modanlou K. A., Oliver D. A., Grossman B. J. // Transfusion.— 2009.— Vol. 49, № 12.— P. 2645—2651.
9. Headdl M. Nancy, Eyles J., Webert K., et al. // Transfusion.— 2008.— Vol. 48.— P. 2585—2595.
10. Damiani G., Pinnarelli L., Somella L., et al. // Transfusion.— 2010.— Vol. 50, № 1.— P. 139—144.
11. Joseph B. G., Hendry C., Walsh T. S. // Transfusion.— 2009.— Vol. 49, № 10.— P. 2060—2069.
12. Erickson M. L., Champion M. H., Klein R., et al. // Transfusion.— 2008.— Vol. 48, № 10.— P. 2252—2263.
13. Monsaiegon-Lion M. V., Cherif K., Judet T., Fletcher D. // Br. J. Anaesth.— 2007.— Vol. 99, № 6.— P. 794—800.

14. Потопнев М. П. // Новости хирургии.— 2009.— Т. 17, № 3.— С. 195—201.

15. Borgman M. A., Spinella P. C., Holcomb J. B., et al. // Vox Sanguinis.— 2011.— Vol. 101, № 1.— P. 44—54.

Поступила 17.08.11.

ANALYSIS TO USING BLOOD COMPONENTS AT PUBLIC HEALTH ORGANIZATIONS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

S. P. Leshchuk, M. P. Potapnev, S. A. Lyakh, L. G. Lagodich

Objective. To confirm the hemotransfusion therapy dependence on the level of rendering medical aid in public health organization, to substantiate the differentiated norms for supplying blood components.

Materials and methods. The hemotransfusion therapy was analyzed by materials presented in 49 clinical protocols of treatment, by the statistical data of 15 public health organizations of various profiles both for rendering primary medical care and specialized ones including medical aid based on high technologies. The public health organizations were selected according to the groups considering the level of applying blood components in the Republic of Belarus.

Results. Clinical protocols stipulated the erythrocyte mass and fresh-frozen plasma application most frequently agreeing with the generally adopted norms. It was shown that the transfusions frequency was 2.5 times higher in Republican Scientific and Practical Centers (RSPCs) rendering medical aid based on high technologies subordinate to the Ministry of Public Health situated in the City of Minsk as compared with regional clinical hospitals and 3.5 times higher than in central district hospitals.

Conclusion. The public health organizations of the City of Minsk where the RSPCs are situated exceed the norms adopted for the blood components application significantly.

Key words: public health organizations, level of rendering medical aid, transfusion activity, medical assistance based on high technologies.

Адрес для корреспонденции:

Лещук Сергей Петрович.

Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии.

220053, г. Минск, Долгиновский тракт, 160; сл. тел. (8-017) 289-86-56.

Н. Н. ПИЩИК, И. А. КОСЕНКО, О. П. МАТЫЛЕВИЧ,
И. С. ПРУДЫВУС

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В БЕЛАРУСИ

РНПЦ онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова

В различных регионах Беларуси выживаемость больных раком шейки матки после хирургического и комбинированного методов лечения практически не отличается, а разница результатов лучевого и химиолучевого методов отражает неадекватность их проведения в различных онкодиспансерах. Эти данные могут стать основанием для применения адекватной контактной лучевой терапии в диспансерах, пересмотра противопоказаний к проведению специальной лучевой терапии по радикальной программе, а также для модернизации радиотерапевтического оборудования и повышения уровня подготовки кадров.

Ключевые слова: рак шейки матки, методы лечения, выживаемость.

Рак шейки матки (РШМ) занимает одно из ведущих мест в структуре заболеваемости женского населения злокачественными опухолями гениталий. В последние два десятилетия наблюдается увеличение заболеваемости раком данной локализации, отмечается «омоложение» болезни и рост ее злокачественности [1, 2]. В этой связи особое значение приобретает проблема оценки качества оказания медицинской помощи больным РШМ с учетом эффективности лечения в различных регионах Беларуси для разработки новых методик лечения и моделей диспансерного наблюдения, а также усовершенствования организации ранней диагностики данного заболевания [2—4].

Главным критерием эффективности оказания помощи онкологическим больным являются показатели общей наблюдаемой выживаемости (ОНВ). Последняя является более емким понятием, поскольку

отражает факт смерти больной не только от рака, но и от других болезней, течение которых может ухудшаться из-за основного заболевания [5—7]. Расчет этих показателей в Беларуси не осуществляется; они используются при анализе результатов лечения в отдельных группах больных для разработки и оценки эффективности новых методик лечения [2, 8].

Анализ результатов научных исследований белорусских авторов показал, что в последние 20 лет 5-летняя выживаемость больных РШМ I стадии при комбинированном методе лечения варьировала от 95 до 96,8%, II стадии — от 73,1 до 82,0%, III стадии — от 48,0 до 71,2%; ОНВ при консервативной терапии (сочетанная лучевая или химиолучевая) составила 92—100%, 61—83,5%, 40,5—58,5% соответственно [1—3, 9—15]. Однако эти исследования проводили только на базе РНПЦ ОМР им. Н. Н. Александрова и Гомельского онкодиспансера, поэтому они не могут отражать качество оказания медицинской помощи в целом по стране.

Цель исследования — оценить эффективность основных методов лечения больных РШМ в Беларуси с 1991 по 2005 г. на основе данных Белорусского канцер-регистра (БКР).

Материал и методы

Проанализировали данные БКР о впервые выявленных случаях эпителиального РШМ с 1991 по 2005 г. (10 110 человек). Изучили 5-, 10-летнюю ОНВ и медиану выживаемости пациенток в зависимости от методики специальной терапии при различных клинических стадиях (FIGO) болезни. Срок диагностирования опухоли ограничили 2005 г. для возможности определения фактической продолжительности жизни больных, наблюдаемых 5 и более лет.

Общая характеристика пациенток представлена в табл. 1.

Показано, что РШМ наиболее часто возникал у женщин в возрасте от 35 до 74 лет (II период зрелости и пожилые люди), 64% из них имели I—II стадию болезни и в большинстве случаев опухоль была представлена плоскоклеточным раком.

Таблица 1

Общая характеристика больных

Признак	Количество наблюдений	
	абс.	(%)
Возраст*	I период зрелости	1118 (11,1)
	II период зрелости	4591 (45,4)
	Пожилые люди	3577 (35,4)
	Старые люди	824 (8,2)
Распространенность опухолевого процесса	I стадия	3158 (31,2)
	II стадия	3788 (37,5)
	III стадия	2586 (25,6)
	IV стадия	578 (5,7)
Гистологическая структура	Плоскоклеточный рак	9066 (89,7)
	Аденогенный рак	955 (9,5)
	Недифференцированный рак	89 (0,9)

*Классификация по возрасту [17, 19].

С учетом наиболее часто встречающихся методик в рамках хирургического, лучевого и химиотерапевтического методов лечения выделили следующие: сочетанную лучевую и химиолучевую терапию (СЛТ), дистанционную лучевую терапию (ДЛТ), гистерэктомии 3-го типа с дополнительным химио- и/или лучевым воздействием (ГЭЗ+), гистерэктомии 2-го типа с дополнительным химио- и/или лучевым воздействием (ГЭЗ+), гистерэктомии 2-го типа (ГЭ2), органосохраняющие операции (ОСО), контактную лучевую терапию (КЛТ), гистерэктомии 3-го типа (ГЭ3).

Статистический анализ данных проводили с использованием программы R-system V. 2.8.0 (лицензия GPL). Для выполнения различных статистических тестов, моделирования, отображения полученной информации применяли дополнительные модули.

Результаты и обсуждение

Известно, что результаты радикального оперативного вмешательства и СЛТ у больных РШМ I—II стадии одинаковы в случае адекватного дооперационного стадирования [18, 19]. Однако названные методы используются, как правило, у больных разных групп [20—24].

Хирургический и комбинированные методы рекомендуют больным РШМ IB1, иногда IIA стадий, а также при большем распространении опухолевого процесса в случае противопоказаний к СЛТ. Последняя может применяться на всех стадиях, но традиционно является стандартом лечения РШМ IIB—III стадий [21].

Кроме этого в БКР отсутствует разделение данных в пределах одной стадии процесса на А и В, что не позволяет судить о сравнительной эффективности различных методик лечения в однородных группах больных, но есть возможность изучить применимость и результативность каждой из них в отдельности.

В 1991—2005 гг. наиболее применимой была СЛТ (38,9%). ДЛТ в качестве самостоятельного способа лечения получали 17,6% больных. Частота хирургического пособия отмечена в 7,8% наблюдений, комбинированного лечения (хирургический и лучевой компоненты) — в 21,3%. Местные методы лечения (ОСО и КЛТ) применяли редко — 1,4% и 1,3% соответственно. Оценка эффективности лечения больных РШМ с учетом степени распространения опухолевого процесса представлена на рис. 1.

Из данных рис. 1 следует, что 5-летняя ОНВ у больных РШМ I стадии составила 0,866 (95% ДИ [0,853—0,879]), II — 0,548 (95% ДИ [0,531—0,566]), III — 0,252 (95% ДИ [0,235—0,271]), IV стадии — 0,050 (95% ДИ [0,034—0,074]) ($P < 0,0001$). Аналогичные соотношения сохранились и при 10-летнем сроке наблюдения, когда ОНВ составляла 0,791 (95% ДИ [0,772—0,810]), 0,452 (95% ДИ [0,433—0,472]), 0,193 (95% ДИ [0,176—0,211]), 0,013 (95% ДИ [0,004—0,0416]) соответственно ($P < 0,0001$). Медиана выживаемости больных РШМ I стадии не была достигнута, а у больных II—IV стадии составила соответственно 87 (95% ДИ [76—96]), 18 (95% ДИ [17—19]), 4 (95% ДИ [4—5]) мес ($P < 0,0001$).

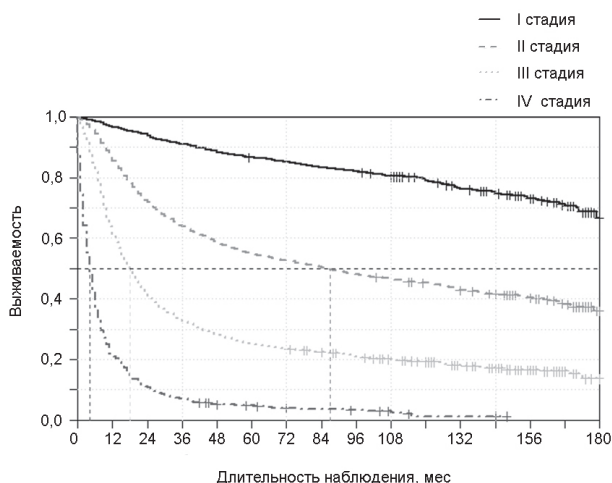


Рис. 1. ОНВ больных РШМ в зависимости от распространенности опухолевого процесса

При анализе эффективности основных методик лечения больных РШМ I стадии была выявлена высокая выживаемость при применении хирургического или комбинированного методов, когда 5-летняя ОНВ варьировала от 0,892 до 0,969 (табл. 2).

В случае выполнения органосохраняющих операций этот показатель равен 0,964 (95% ДИ [0,929—1,000]). 5-летняя ОНВ при СЛТ составила 0,830 (95% ДИ [0,798—0,863]). Значительно ниже были результаты лечения при ДЛТ, обусловившей значение данного показателя 0,662 (95% ДИ [0,597—0,735]). Последний был незначительно ниже при отсутствии специального лечения — 0,604 (95% ДИ [0,537—0,679]), что свидетельствует о неадекватности использования ДЛТ в качестве единственного метода лечения у данной категории больных, поскольку подведение канцерцидных доз невозможно из-за опасности лучевых осложнений. При изучении эффективности основных методов лечения больных РШМ II стадии была установлена высокая эффективность лечения, как и при I стадии заболевания, хирургического и комбинированного методов (5-летняя ОНВ составила 0,648—0,809) (см. табл. 2). Высоким оказался названный показатель и при КЛТ — 0,647 (95% ДИ [0,499—0,839]), что можно объяснить тем, что данный метод показан в случае невозможности осуществить ДЛТ при местном распространении рака и отсутствии регионарных метастазов. 5-летняя ОНВ после СЛТ составила 0,572 (95% ДИ [0,550—0,596]),

после ДЛТ в самостоятельном варианте — 0,422 (95% ДИ [0,381—0,467]). Без проведения специального лечения продолжительность жизни 5 и более лет отмечена у 0,245-й (95% ДИ [0,201—0,299]) части пациенток.

При РШМ III стадии наиболее высокие результаты оказались при комбинированном методе сочетания ГЭЗ+, когда показатель 5-летней ОНВ составил 0,567 (95% ДИ [0,764—0,856]), 10-летней — 0,433 (95% ДИ [0,719—0,828]), медиана выживаемости — 93 мес (см. табл. 2). Несколько ниже была эффективность комбинации ГЭ2 с лучевым или химиолучевым воздействием: 5-летняя ОНВ составила 0,415 (95% ДИ [0,312—0,550]), 10-летняя — 0,308 (95% ДИ [0,212—0,446]), медиана выживаемости — 43 (95% ДИ [28—95]) мес ($P < 0,0001$). Высокая эффективность комбинированных методик у больных РШМ II стадии обусловлена тем, что они применялись преимущественно у пациенток с небольшим размером первичной опухоли в рамках T1-2a.

При проведении СЛТ у больных РШМ III стадии 5-летняя ОНВ составила 0,292 (95% ДИ [0,266—0,321]), 10-летняя — 0,223 [95% ДИ (0,198—0,253)], медиана жизни — 23 мес (95% ДИ [21—26]) ($P < 0,0001$).

Самые худшие показатели 5- и 10-летней ОНВ и медианы жизни при проведении специального лечения оказались у пациенток, которым была проведена ДЛТ: 0,174 (95% ДИ [0,1483—0,203]), 0,136 (95% ДИ [0,1120—0,165]), 13 мес (95% ДИ [12—15]) соответственно ($P < 0,0001$). При отсутствии лечения показатель 5-летней выживаемости был ниже и составил 0,102 (95% ДИ [0,072—0,144]), 10-летней — 0,066 (95% ДИ [0,0408—0,107]), медиана жизни оказалась равной 6 мес (95% ДИ [5—7]) ($P < 0,0001$). Показатели эффективности лечения больных РШМ IV стадии представлены на рис. 2.

В первые годы наблюдения наибольшая ОНВ отмечена при применении комбинированного (ГЭЗ+ и ГЭ2+) и сочетанного лучевого методов. Однолетняя и двухлетняя выживаемость при радикальном и нерадикальном объеме хирургического компонента комбинированного лечения существенно не отличалась и составила 0,643 (95% ДИ [0,435—0,950]), 0,392 (95% ДИ [0,195—0,789]) и 0,678 (95% ДИ [0,516—0,889]), 0,381 (95% ДИ [0,229—0,635]) соответственно. Это обстоятельство вызывает сомнение в целесообразности расширенного объема операции при большой степени распростране-

Таблица 2

ОНВ у больных РШМ I—III стадии

Метод лечения	5-летняя выживаемость			10-летняя выживаемость			Медиана выживаемости, мес		
	I стадия	II стадия	III стадия	I стадия	II стадия	III стадия	I стадия	II стадия	III стадия
ГЭ2	0,961	0,686	0,400	0,936	0,637	0,400	—	—	11
ГЭ2+	0,892	0,648	0,415	0,798	0,561	0,308	—	154	43
ГЭ3	0,969	0,667	0,500	0,969	0,667	0,500	—	—	13
ГЭЗ+	0,926	0,809	0,567	0,877	0,772	0,433	—	—	93
КЛТ	0,839	0,647	0,217	0,798	0,509	0,163	172	155	17
СЛТ	0,830	0,572	0,292	0,696	0,471	0,223	—	96	23
ДЛТ	0,662	0,422	0,174	0,550	0,314	0,136	179	40	13
Без лечения	0,604	0,245	0,102	0,547	0,178	0,066	136	14	6

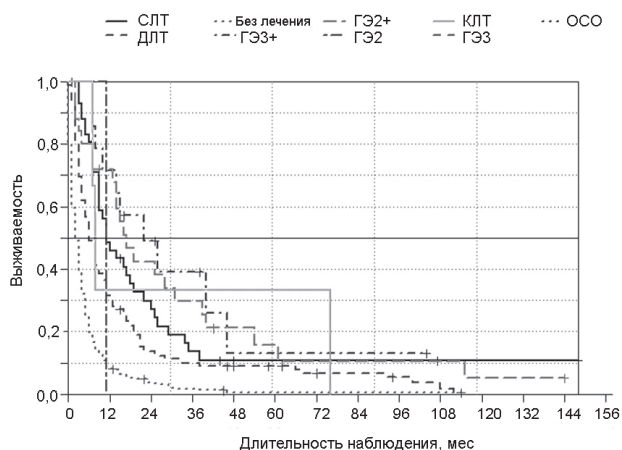


Рис. 2. Эффективность разных методик лечения больных РШМ IV стадии

ния опухолевого процесса. С другой стороны, возможно, следует обсуждать техническую сторону ее выполнения и, в первую очередь, в плане радикализма удаления опухолевых лимфоузлов и инфильтратов. После 5 лет наблюдения живыми оказалась 0,13-я часть женщин, которых лечили комбинированным методом, 0,11-я — сочетанным лучевым; без лечения шанс остаться в живых был очень низким — 0,02.

Медиана выживаемости больных РШМ IV стадии была невысокой и составила 17—22 мес при комбинированном лечении, 11 мес — при сочетанном лучевом и химиолучевом; при отсутствии специальной терапии этот показатель равен 2 мес ($P < 0,0001$).

Полученные данные сопоставили с результатами отдельных научных исследований, проведенных в Беларуси в 1991—2005 гг. Оказалось, что эффективность комбинированного метода лечения по критерию 5-летней ОНВ в целом по стране от последних значимо не отличалась, составив 0,926 (95% ДИ [0,902—0,951]) против 0,950—0,968, 0,809 (95% ДИ [0,764—0,856]) против 0,731—0,820, 0,567 (95% ДИ [0,490—0,656]) против 0,405—0,534 при РШМ I, II, III стадиях соответственно [1, 10—12, 22]. В то же время данный показатель при сочетанной лучевой или химиолучевой терапии имел значительные различия: 0,830 (95% ДИ [0,798—0,863]) против 0,945—0,975, 0,572 (95% ДИ [0,550—0,596]) против 0,610—0,995, 0,292 (95% ДИ [0,266—0,321]) против 0,339—0,687 при РШМ I, II, III стадиях соответственно ($P < 0,0001$) [13—15, 24].

Выводы

1. Применение комбинированного метода лечения у больных раком шейки матки I стадии обеспечило 5-летнюю общую наблюдаемую выживаемость — 0,970 [0,950—0,968], II стадии — 0,810 [0,731—0,820], III стадии — 0,570 [0,405—0,534].

2. Эффективность сочетанной лучевой терапии по критерию 5-летней общей наблюдаемой выживаемости при раке шейки матки I стадии составила 0,830 [0,945—0,975], II стадии — 0,572 [0,610—0,995], III стадии — 0,292 [0,339—0,687].

3. Сопоставимость результатов комбинированной терапии рака шейки матки с данными научных исследований, проведенных в Беларуси, свидетельствует об одинаковых подходах к хирургическому лечению в разных онкологических диспансерах.

4. Существенные различия общей наблюдаемой выживаемости при раке шейки матки после сочетанной лучевой и химиолучевой терапии в целом по стране и по результатам научных работ отражают неадекватность реализации названных методик лечения в ряде специализированных учреждений в силу использования разного радиотерапевтического оборудования и уровня подготовки кадров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляковский В. Н. // *Здравоохранение*.— 2004.— № 6.— С. 40—41.
2. Косенко И. А. *Рак шейки матки с неблагоприятным прогнозом*.— Гомель, 2007.
3. Косенко И. А. *Оптимизация лучевого и комплексного лечения больных раком шейки матки с неблагоприятным прогнозом: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук*.— Минск, 2000.
4. Косников А. Г. *Клинико-морфологическая оценка факторов риска и прогноза у больных раком шейки матки I—III стадии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук*.— СПб., 1998.
5. Мерабишвили В. М., Цветкова Т. Л., Лебедев В. В. и др. // *Вопр. онкологии*.— 2000.— Т. 46, № 2.— С. 149—152.
6. Hakulinen T. A // *World Health Statistics Quarterly*.— 1983.— Vol. 36.— P. 35—46.
7. Capocaccia R., Gatta G., Roazzi P., et al. // *Ann. Oncol.*— 2003.— Vol. 14, № 5.— P. 14—27.
8. Воронцова А. Э. *Оценка эффективности организации онкологической помощи больным раком шейки матки на основе современных информационных технологий: Автореф. дис. ... канд. мед. наук*.— М., 2001.
9. Литвинова Т. М. *Индивидуальное дозиметрическое планирование внутриволостной гамма-терапии больных раком шейки матки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук*.— Л., 1992.
10. Вишневецкая Е. Е. // *Мед. радиология*.— 1980.— № 6.— С. 69—73.
11. Вишневецкая Е. Е. // *Мед. радиология*.— 1981.— № 10.— С. 25—30.
12. Косенко И. А. *Актуальные проблемы онкологии и медицинской радиологии: Сб. науч. трудов*.— Минск, 1985.— С. 116—118.
13. Вишневецкая Е. Е., Косенко И. А. // *Вопр. онкологии*.— 1999.— Т. 45, № 4.— С. 420—423.
14. Косенко И. А. // *Мед. новости*.— 1999.— № 10.— С. 19—23.
15. Вишневецкая Е. Е., Литвинова Т. М., Океанова Н. И., Матылевич О. П. // *Новые технологии в клинической онкологии: Материалы науч.-практ. конф.*— Минск, 1998.— С. 113—115.
16. Шелкович С. Е. *Клиническое течение и лечение аденогенных карцином шейки матки: Автореф. дис. ... канд. мед. наук*.— Минск, 2011.
17. Медков В. М. *Основы демографии: Учеб. пособие для вузов*.— Ростов н/Д., 2003.
18. Саак А. Э., Тагаев А. В. *Демография: Учеб. пособие*.— Таганрог, 2003.
19. Schwarz R. // *Zentralbl. Gynecol.*— 1993.— Bd. 115, № 12.— S. 537—540.
20. Di Saia P. J., Creasman W. T. *Clinical gynecologic oncology // 5th ed.*— St. Louis: Mosby, 1997.— 447 p.
21. Залуцкий И. В. *Алгоритмы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями / Под ред. И. В. Залуцкого, Э. А. Жавриды // Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 80 от 9 февраля 2007 г.*— Минск, 2007.— С. 293—306.
22. Косенко И. А. // *Онкологич. журн.*— 2007.— № 5.— С. 30—37.

23. Sun J. H. // *Zhougua Zhougliu Zazhi*.— 1992.— № 3.— P. 111.
 24. Вишневецкая Е. Е., Косенко И. А. Лучевое лечение больных раком шейки матки III—IV стадии с выраженной интоксикацией и анемией: Тез. докл. III съезда онкологов БССР.— Минск, 1991.— С. 337—338.

Поступила 14.07.11.

EFFICIENCY OF MAJOR METHODS OF MANAGING PATIENTS WITH CERVICAL CARCINOMA IN BELARUS

N. N. Pishchik, I. A. Kosenko, O. P. Matylevich, I. S. Prudyvus

Survival of patients with cervical carcinoma after surgical and combined treatment in various regions practically do not differ and the difference

between the outcomes of the beam- and chemobeam-therapy reflect their performance inadequacy in various oncologic dispensaries. Those data can serve the grounding for applying an adequate contact beam-therapy in dispensaries, for reviewing contraindications to the special beam-therapy according to the radical program as well as for upgrading the radiation therapeutic devices and the staff training level.

Key words: cervical carcinoma, therapeutic methods, survival.

Адрес для корреспонденции:

Пищик Николай Николаевич.

Республиканский научно-практический центр онкологии

и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова.

223040, Минская обл., Минский р-н, п. Лесной;

сл. тел. (8-017) 287-95-05.

О. А. КРУГЛИК

**ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ
РЕСТАВРАЦИИ ЗУБОВ
С ПОВЫШЕННЫМ СТИРАНИЕМ
ПРИ ПОМОЩИ ФОТООТВЕРЖДАЕМОГО
КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА**

Белорусский государственный медицинский университет

Цель. Оценить эффективность реставрации зубов с повышенным стиранием с помощью фотоотверждаемых композиционных материалов в отдаленные сроки.

Материал и методы. Реставрацию зубов с повышенным стиранием выполняли после минимального препарирования, используя технику тотального протравливания фотоотверждаемым композиционным материалом. Оценку выполненных реставраций проводили с помощью критериев USPHS: 36 реставраций фронтальных зубов — в течение 3 лет, 32 премоляров и 19 моляров — в течение года. Полученные данные обрабатывали методами описательной и непараметрической статистики.

Результаты. В результате оценки 36 реставраций фронтальных зубов через 3 года после их выполнения 91,7±4,6% случаев признаны клинически приемлемыми по критерию «анатомическая форма» при стирании коронки на 1/3 длины зуба. Эффективность реставрации жевательных зубов была статистически значимо ниже эффективности реставрации фронтальных зубов.

Заключение. Реставрация зубов с повышенным стиранием более эффективна во фронтальной, чем в жевательной группе зубов.

Ключевые слова: повышенное стирание зубов, патологическая стираемость, реставрация.

Восстановление формы зубов с использованием композиционных материалов — сравнительно новый метод лечения повышенного стирания зубов (патологической стираемости), основными преимуществами которого являются минимальное препарирование твердых тканей зубов и отсутствие необходимости их предварительного эндодонтического лечения [1—5]. Повышенное стирание зубов — термин, принятый в МКБ-10, применяется для описания данного заболевания независимо от особенностей локализации (неб-

ная поверхность или режущий край) и глубины поражения. Для детального описания клинической картины заболевания в настоящее время широко используется классификация патологической стираемости зубов, предложенная М. Г. Бушаном в 1979 г., согласно которой выделены формы и степени тяжести этого заболевания (фрагмент классификации):

- по глубине поражения:

I степень — до 1/3 длины коронки зуба;

II степень — от 1/3 до 2/3 длины коронки зуба;

III степень — от 2/3 длины коронки зуба до десны;

- по плоскости поражения:

горизонтальная;

вертикальная;

смешанная.

Горизонтальная форма патологической стираемости характеризуется убылью твердых тканей на режущих краях и жевательных поверхностях зубов, вертикальная — на вестибулярных и оральных поверхностях, смешанная — фасетками, переходящими с режущей на вестибулярную или оральную поверхность. В литературе описаны клинические случаи восстановления формы стертых зубов при помощи фотоотверждаемого композиционного материала [1, 4].

В результате систематического наблюдения К. W. Hemmings и соавт. установили, что эффективность реставрации эрозий небных поверхностей фронтальных зубов с помощью фотоотверждаемого композита через 2,5 года составляет 89,5% [6]. А. А. Пономарев показал, что эффективность лечения патологической стираемости через 2,5 года составила 94,4%, через 5 лет — 84,4% [7]. R. J. Smales и соавт. установили, что через 10 лет на зубах с повышенным стиранием сохранились 62,0% прямых (выполненных в полости рта) и 74,5% непрямых реставраций (выполненных с участием зуботехнической лаборатории), статистически значимых различий в эффективности лечения этими методами не обнаружено [8]. D. Bartlett и соавт. выявили, что эффективность реставрации жевательных зубов (в результате стирания и эрозии) составила 50% через 3 года наблюдения [5].

Большинство зарубежных исследований включали оценку эффективности реставрации дефектов окклюзионных поверхностей, образовавшихся в результате воздействия кислот.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности использования фотоотверждаемых композиционных материалов при реставрации зубов с повышенным стиранием в отдаленные сроки.

Материал и методы

Проведено обследование и терапевтическое лечение повышенного стирания зубов у 34 пациентов: 16 мужчин и 18 женщин. В среднем одному пациенту было проведено 6 [4; 9] реставраций. Характеристика патологической стираемости зубов, которым проводилось терапевтическое лечение, отражена в таблице.

Значительные различия в количестве оцененных реставраций в ближайшие и отдаленные сроки обусловлены продолжительным набором пациентов в группу наблюдения. Так, в 2007—2008 учебных годах было набрано 10 пациентов, в 2008—2009 гг. — 17, 2009—2010 гг. — 7 пациентов.

Максимальное количество реставраций было выполнено при I степени патологической стираемости (стирание до 1/3 длины коронки зуба), смешанной и горизонтальной формах, на зубах фронтальной группы. II степень патологической стираемости у пациентов группы наблюдения диагностировали в 2,7—4,8 раза реже, чем I степень.

Выбор способа создания пространства для реставрации зависел от клинической картины заболевания.

Реставрация после сошлифовывания краев дефектов или фасеток стирания по всей плоскости без предварительного перемещения зубов или изменения межальвеолярной высоты была выполнена у 7 пациентов.

При наличии зубоальвеолярного удлинения пространство для реставрации создавали следующим образом :

1) использовали назубные каппы из пластмассы (изготовленные стоматологом-ортопедом) или фотоотверждаемый композиционный материал (изготовленный стоматологом-терапевтом) для вертикального перемещения зубов (14 пациентов). Срок устранения зубоальвеолярного удлинения составил 2—5 мес, после чего проводили реставрацию формы зубов фотоотверждаемым композиционным материалом;

2) увеличивали межальвеолярную высоту:

а) при наличии частичной вторичной адентии у пациента стоматолог-ортопед проводил увеличение

и фиксацию межальвеолярной высоты (10 пациентов). После изготовления съемных или несъемных ортопедических конструкций выполняли реставрацию зубов с повышенным стиранием;

б) при необходимости реставрации большого числа зубов с повышенным стиранием изготавливали назубные каппы для увеличения межальвеолярной высоты (2 пациента). После адаптации пациентов к каппам проводили их замену на реставрации из фотоотверждаемого композиционного материала.

У одного пациента сначала было устранено зубоальвеолярное удлинение, затем изготовлены назубные каппы для увеличения межальвеолярного расстояния.

Препарирование зубов перед выполнением реставраций было минимальным. Сглаживали острые края эмали по периферии дефекта, выполняли финишное шлифование эмали, удаляли поверхностный слой обнаженного дентина. На вестибулярной поверхности фронтальных зубов формировали скос шириной 2—3 мм. По эстетическим показаниям выполняли скос шириной 4 мм либо сошлифовывание эмали как под виниры. При повышенном стирании зубов в горизонтальной плоскости (патологическая стираемость, горизонтальная форма по М. Г. Бушану) на оральной поверхности фронтальных зубов формировали скос в виде желобка.

Реставрацию зубов с повышенным стиранием выполняли с использованием техники тотального протравливания из фотоотверждаемого микрогибридного композиционного материала. Толщину планируемой реставрации ограничивали с помощью шаблонов круглой формы заданного размера, изготовленных из композиционного материала и отвержденных вне полости рта. После закрепления шаблонов форму стертых зубов восстанавливали композитом.

По завершении реставрации проводили финишную обработку с учетом окклюзионных соотношений в центральной, боковых и передней окклюзиях.

Качество реставрации оценивали с использованием критериев USPHS. Наиболее значимым при проведении данного исследования был критерий «анатомическая форма».

Оценку качества выполненной реставрации проводили 1 раз в 6 мес. Клинически приемлемыми считали реставрации, имеющие оценки Alfa (A) или Bravo (B).

При описании результатов лечения использовали относительную величину P (%), рассчитывали ошибку репрезентативности $\pm m$ (SE).

Локализация и степень тяжести патологической стираемости зубов по М. Г. Бушану

Срок наблюдения	Количество реставраций	Фронтальные зубы						Жевательные зубы (горизонтальная форма)			
		смешанная форма		горизонтальная форма		вертикальная форма		премоляры		моляры	
		I степень	II степень	I степень	II степень	I степень	II степень	I степень	II степень	I степень	II степень
1 год	259	57	21	102	21	2	0	32	3	19	2
2 года	182	50	21	63	19	—	—	15	3	9	2
3 года	56	24	11	14	4	—	—	2	0	1	0

Различие частоты клинически приемлемых исходов в сравниваемых группах оценивали с помощью методов непараметрической статистики: таблиц сопряженности и теста χ^2 с поправкой Йейтса, точного двустороннего критерия Фишера. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Реставрация фронтальных зубов. Через 1 год после выполнения 201 реставрации баллы «А» и «В» получили 200 (99,5±0,5% случаев), балл «С» — 1 реставрация. Дефекты в виде нарушения анатомической формы в пределах композиционного материала без обнажения дентина (балл «В») устранили после повторной финишной обработки. Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций в зависимости от формы заболевания (смешанная или горизонтальная) не выявлено (точный критерий Фишера $P=1,0$ при I степени тяжести). Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций при горизонтальной форме в зависимости от степени тяжести (I или II) также не выявлено ($P=1,0$).

В результате оценки 150 реставраций через 2 года наблюдения баллы «А» и «В» получила 141 реставрация (94,0±1,9% случаев), балл «С» — 9 (рис. 1); 2 не были оценены по причине замещения их коронками к моменту проведения планового осмотра. В 1 случае произошел откол части зуба вместе с частью реставрации. Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций в зависимости от формы заболевания (смешанная или горизонтальная) не установлено ($P=0,6$ при I степени тяжести, $P=0,5$ при II степени тяжести); в зависимости от степени тяжести (I или II) они также не выявлены ($P=1,0$ при горизонтальной форме заболевания, $P=1,0$ — при смешанной).

Через 3 года из 51 реставрации баллы «А» и «В» получили 45 (88,2±4,5% случаев), балл «С» — 6 реставраций (рис. 2); 2 не были оценены по причине замещения их коронками к моменту проведения планового осмотра. Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций в зависимости от формы (смешанная или горизонтальная) не установлено ($P=1,0$ при I степени тяжести, $P=0,5$ при

II степени тяжести); в зависимости от степени тяжести (I или II) они также не выявлены ($P=1,0$ при горизонтальной форме, $P=0,3$ — при смешанной). При I степени тяжести клинически приемлемые реставрации были выявлены в 91,7±4,6% случаев, при II степени тяжести — в 80,0±10,3%.

Результаты реставрации фронтальных зубов, полученные за 3 года, соответствуют результатам зарубежных исследователей [6].

При оценке влияния срока наблюдения на долю клинически приемлемых реставраций по критерию «анатомическая форма» в группе, включавшей 51 реставрацию (срок наблюдения 3 года), статистически значимых различий не установлено ни через год, ни через 2 года ($P=1,0$ и $P=1,0$ соответственно). Через 3 года клинического наблюдения без учета степени тяжести (I или II) выявлены значимые различия ($P=0,03$). При учете степени тяжести статистически значимых различий доли приемлемых реставраций не установлено как при I, так и при II степени тяжести ($P=0,2$ и $P=0,2$ соответственно). Между сроками наблюдения 1 и 2 года, 2 и 3 года значимых различий не установлено ($P=1,0$ и $P=0,1$ соответственно).

При оценке влияния срока наблюдения на частоту баллов «В» по критерию «краевое прилегание» в группе, включавшей 51 реставрацию (срок наблюдения 3 года), статистически значимых различий не установлены ни через год, ни через 2 года после выполнения реставрации ($P=0,06$ и $P=0,06$ соответственно). Через 3 года клинического наблюдения выявлены статистически значимые различия ($P=0,002$). Между сроками наблюдения 1 и 2 года, 2 и 3 года значимых различий не установлено ($\chi^2=1,98$, $P=0,2$ и $\chi^2=0,01$, $P=0,9$ соответственно).

По критерию «краевое окрашивание» 2 реставрации получили балл «В», — дефект был устранен после повторной финишной обработки. Одну реставрацию оценили баллом «С» — краевое окрашивание не было устранено после повторной финишной обработки.

По критерию «дискомфорт/чувствительность» одна реставрация оценена баллом «В». Чувствительность была устранена нанесением фторсодержащего лака.

Эффективность лечения повышенного стирания зубов в вертикальной плоскости (вертикальная форма патологической стираемости) не оценивали, поскольку были выполнены только 2 реставрации.

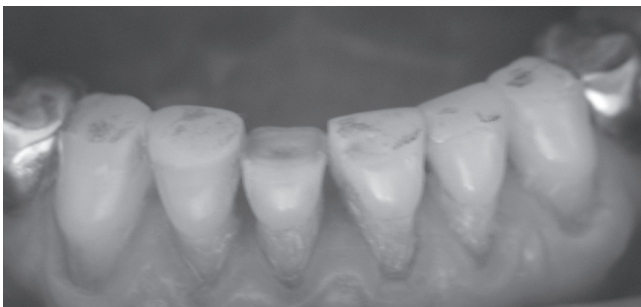


Рис. 1. Пациент Н., 51 год. Реставрации зубов 33, 32, 31, 41, 42, 43, проведенные по поводу патологической стираемости, горизонтальная форма, I, II степени тяжести по М. Г. Бушану, через 2 года после выполнения. Реставрация зуба 41 утеряна



Рис. 2. Пациентка Ф., 59 лет. Реставрации зубов 11, 21, проведенные по поводу патологической стираемости, смешанная форма, I степень тяжести по М. Г. Бушану, через 3 года после выполнения

Реставрация жевательных зубов. Через 1 год после выполнения реставрации 35 премоляров баллы «А» и «В» получили 30 (85,7±5,9% случаев), «С» — 5 реставраций.

Через 2 года из 18 реставраций премоляров баллы «А» и «В» получили 13 (72,2±10,6% случаев), «С» — 5 реставраций.

Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций премоляров при I степени тяжести патологической стираемости к концу 1-го и 2-го года не установлено (точный критерий Фишера $P=0,1$ и $P=0,1$ соответственно). Между сроками наблюдения 1 и 2 года статистически значимых различий не выявлено ($P=0,7$).

Реставрированы с восстановлением бугров и краевого гребня 17 премоляров, с восстановлением бугров — 13. Частота клинически приемлемых исходов через год составила 64,7±11,6% и 84,6±10,0% случаев соответственно, статистически значимых различий не установлено ($P=0,4$).

Через 1 год после выполнения реставрации 21 моляра баллы «А» и «В» получили 20 (95,2±4,7% случаев), балл «С» — 1 реставрация.

Через 2 года из 11 реставраций моляров баллы «А» и «В» получили 10 (91,0±8,6% случаев), «С» — 1 реставрация.

Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций моляров при I степени тяжести патологической стираемости к концу 1-го и 2-го года не установлено ($P=1,0$ и $P=1,0$ соответственно). Между сроками наблюдения 1 и 2 года статистически значимых различий не выявлено ($P=1,0$).

Статистически значимых различий доли клинически приемлемых реставраций в зависимости от групповой принадлежности зубов (премоляры и моляры) в сроки наблюдения 1 и 2 года не установлено ($P=0,6$ и $P=0,6$ при I степени тяжести; $P=1,0$ и $P=1,0$ при II степени тяжести соответственно).

При сравнении доли клинически приемлемых реставраций фронтальных зубов и премоляров (I степень тяжести патологической стираемости) выявлены статистически значимые различия к концу 1-го года ($P=0,003$) и 2-го года ($\chi^2=5,81$, $P=0,02$) отношение шансов — 4,7.

При сравнении доли клинически приемлемых реставраций фронтальных зубов и моляров (I степень тяжести) статистически значимые различия не установлены ни к концу 1-го, ни к концу 2-го года (точный критерий Фишера $P=0,2$ и $P=0,5$ соответственно).

Следует отметить, что для формирования достоверных выводов необходимо большее число наблюдений в группе жевательных зубов.

За время наблюдения ни одному из реставрированных зубов не было проведено эндодонтическое

лечение, признаков травматической перегрузки периодонта не выявлено.

Выводы

1. Эффективность реставрации фронтальных зубов с повышенным стиранием (горизонтальная и смешанная формы, I степень тяжести патологической стираемости) при помощи фотоотверждаемых композиционных материалов к концу 3-го года составила 91,7±4,6% клинически приемлемых случаев.

2. Доля клинически приемлемых реставраций фронтальных зубов статистически значимо больше доли клинически приемлемых реставраций жевательных зубов как к концу 1-го, так и 2-го года клинического наблюдения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макеева И. М., Сидорова О. И., Халидова З. М. // *Стоматология для всех*.— 2004.— № 1.— С. 4—6.
2. Радлинский С. // *Дент. Арт.*— 2007.— № 3.— С. 38—48.
3. Ройтерс Ю., Олдам Н. // *Дент. Арт.*— 2007.— № 2.— С. 58—66.
4. Луцкая И. К., Новак Н. В. // *Институт стоматологии*.— 2008.— № 3.— С. 48—51.
5. Bartlett D., Sundaram G. // *Int. J. Prosthodont.*— 2006.— Vol. 19, № 6.— P. 613—617.
6. Hemmings K. W., Darbar U. R., Vauhan S. // *J. Prosthet. Dent.*— 2000.— Vol. 83, № 3.— P. 287—293.
7. Пономарев А. А. *Характеристика стираемости зубов и особенности их реставрации у взрослого человека: Автореф. ... дис. канд. мед. наук.*— СПб., 2006.
8. Smales R. J., Berekally T. L. // *Eur. J. Prosthodont. Restor. Dent.*— 2007.— Vol. 15, № 1.— P. 2—6.

Поступила 16.08.11.

REMOTE OUTCOMES OF HYPER-ERASING TEETH RESTORATION BY PHOTOCURABLE COMPOSITE MATERIALS

O. A. Kruglik

Objective. To assess the efficiency of hyper-erasing teeth restoration by photocurable composite materials in the near and remote terms.

Materials and methods. The hyper-erasing teeth restoration was carried out after minimal preparing using the technique of the photocurable composite material treatment. The restoration quality was assessed according the USPHS criteria: 36 restorations of the anterior teeth were assessed within three years, 32 premolars and 19 molars restorations were assessed within one year. The data obtained were processed applying descriptive and non-parametric statistical methods.

Results. Basing on the results of 36 restorations of the anterior teeth in three years 91.7±6.6% of cases were considered clinically acceptable according the criterion «anatomic form» when the crown brygmus was 1/3 of the tooth length. The masticatory teeth restoration was considered statistically less efficient as compared with the incisive teeth restoration.

Conclusion. The hyper-erasing teeth restoration is more efficient in the anterior group of teeth than in the masticatory teeth group.

Key words: hyper-erasing teeth, pathological erosion, restoration.

Адрес для корреспонденции:

Круглик Ольга Александровна.

Белорусский государственный медицинский университет. 220004, г. Минск, ул. Сухая, 28; сл. тел. (8-017) 200-54-13.



А. П. ЛИПОВКА, Н. И. КУПРЕЙЧИК

ПОРЯДОК ПРЕДОСТАВЛЕНИЯ ГАРАНТИЙ И КОМПЕНСАЦИЙ ЗА РАБОТУ ВО ВРЕДНЫХ И (ИЛИ) ОПАСНЫХ УСЛОВИЯХ ТРУДА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АТТЕСТАЦИИ РАБОЧИХ МЕСТ

Республиканский комитет Белорусского профсоюза работников здравоохранения

В соответствии с п. 2 Положения о порядке проведения аттестации рабочих мест по условиям труда, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 253 от 22.02.2008 г. (далее — Положение), комплексная оценка условий труда на конкретном рабочем месте нацелена на разработку и реализацию плана мероприятий по их улучшению.

Согласно гл. 16 Инструкции по оценке условий труда при аттестации рабочих мест по условиям труда и предоставлению компенсаций по ее результатам (в дальнейшем — Инструкция), утвержденной постановлением Министерства труда и социальной защиты Республики Беларусь № 35 от 22.02.2008 г., по результатам аттестации за работу с вредными и (или) опасными условиями труда предоставляются следующие виды компенсации:

- пенсия по возрасту;
- дополнительный отпуск;
- сокращенная продолжительность рабочего времени;
- оплата труда в повышенном размере путем установления доплат.

Дополнительный отпуск за работу с вредными и (или) опасными условиями труда. Порядок и условия предоставления дополнительных отпусков определены постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 73 от 19.01.2008 г. «О дополнительных отпусках за работу с вредными и (или) опасными условиями труда и особый характер работы».

Согласно законодательству засчитываются дни, когда человек был занят на работах с вредными и (или) опасными условиями труда полный рабочий день. В соответствии с п. 12 Инструкции полный рабочий день — выполнение работ с вредными и (или) опасными (особыми) условиями труда работниками в соответствии с их тарифно-квалификационными (квалификационными) характеристиками, приведенными в ЕТКС и ЕКСД, не менее 80% от продолжительности ежедневной смены, установленной законодательством (включается подготовительно-заключительное, оперативное (основное и вспомогательное) время и время обслуживания рабочего места в пределах установленных нормативов, а также регламентированные перерывы). Учет отработанного с вредными и (или) опасными условиями труда времени ведется нанимателем в соответствии с ч. 3 ст. 133 Трудового кодекса (ТК) Республики Беларусь.

Дополнительный отпуск за работу с вредными и (или) опасными условиями труда предоставляется за полный рабочий

год (12 полных календарных месяцев с учетом продолжительности трудового отпуска, на который работник имеет право). То есть включается фактически отработанное время в условиях, подтвержденных результатами аттестации, и период нахождения в трудовом отпуске. Указанные в пп. 1—4 ч. 2 ст. 164 ТК социальный отпуск, период временной нетрудоспособности и др. в рабочий год не входят.

Если работник на дату ухода в отпуск отработал с вредными и (или) опасными условиями труда не полный рабочий год, то дополнительный отпуск предоставляется ему пропорционально отработанному времени (ст. 177 ТК).

Расчет проводится следующим образом:

1) подсчитывается количество дней, в течение которых человек был занят на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, включаемых в рабочий год;

2) полученная сумма делится на среднемесячное число календарных дней за год;

3) остаток, составляющий 15 и более календарных дней, округляется до полного месяца, менее 15 календарных дней — из подсчета исключается.

Доплаты за работу с вредными и (или) опасными условиями труда устанавливаются в зависимости от класса и степени вредности условий труда (3-й и 4-й классы). Размеры доплат (от 0,1% до 0,31% от тарифной ставки 1-го разряда за 1 час работы в условиях труда, соответствующих классу) определены в прил. 8 к Инструкции.

В соответствии с п. 12.4 Положения составляется Перечень рабочих мест по профессиям и должностям, на которых по результатам аттестации подтверждено право на доплаты за работу с вредными и (или) опасными условиями труда, по форме, определенной в прил. 12 к Инструкции.

Перечень, согласованный с профсоюзом, утверждается приказом нанимателя, где также указываются рабочие места, на которых по результатам аттестации не подтверждены (с указанием конкретных причин) условия труда, дающие право на оплату труда в повышенном размере.

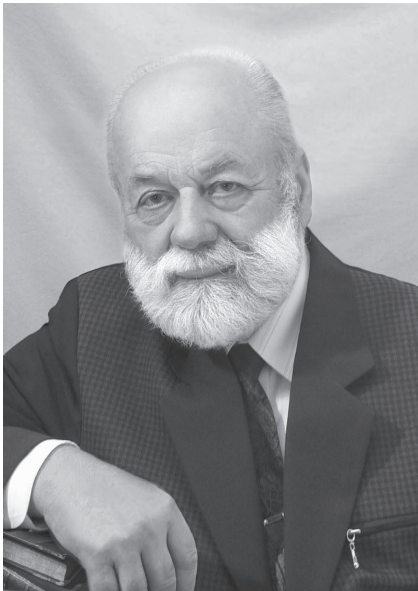
Доплаты за работу с вредными и (или) опасными условиями труда устанавливаются со дня издания приказа нанимателя об утверждении результатов аттестации (размер доплат не может быть ниже минимально гарантированных).

Работникам, которым установлена повышенная оплата труда за работу с вредными и (или) опасными условиями труда (согласно табл. 9 прил. 2 к постановлению Министерства труда Республики Беларусь № 6 от 21.01.2000 г.) в отрасли «Здравоохранение», это — повышение тарифных окладов за работу с особым характером труда, **по результатам аттестации доплата не устанавливается.**

Если по результатам аттестации, проведенной в 2008 г., не подтверждены условия труда (за исключением случаев изменения условий труда в связи с заменой либо модернизацией производственного оборудования, заменой сырья и материалов, изменением технологического процесса и средств коллективной защиты), дававшие ранее право на пенсию по возрасту за работу с особыми условиями труда, доплату за работу с вредными и (или) опасными условиями труда, или произошло уменьшение этих компенсаций, то в соответствии с п. 2 постановления Совета Министров Республики Беларусь № 253 от 22.02.2008 г. «Об аттестации рабочих мест по условиям труда» они предоставляются на прежних условиях до истечения срока действия результатов предыдущей аттестации.



ПАМЯТИ ПЕТРА ИОСИФОВИЧА ЛОБКО



22 августа 2011 года ушел из жизни крупный ученый, блестящий педагог, интеллигентный, высокообразованный, доброжелательный и принципиальный человек, ученый и воспитатель, прошедший большой и интересный жизненный путь, видный анатом нашей страны — лауреат Государственной премии Республики Беларусь, почетный академик Белорусской академии медицинских наук, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной анатомии БГМУ Петр Иосифович Лобко.

Петр Иосифович Лобко родился в д. Кухчицы Клецкого района Минской области.

После окончания в 1951 г. Минского государственного медицинского института он поступил в аспирантуру при кафедре нормальной анатомии этого же института. Через 3 года успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Пути перекрестной чувствительной иннервации надпочечных желез человека». Затем работал над докторской диссертацией «Строение узлов солнечного сплетения и их связей у животных и человека», которую успешно защитил в 1967 г. Работал ассистентом, доцентом, профессором, с 1975 по 1996 г. заведующим кафедрой анатомии МГМИ, затем профессором кафедры нормальной анатомии БГМУ.

П. И. Лобко был высокозурдированным, оригинально мыслящим ученым, с необычайно широким кругом научных ин-

тересов. Он являлся преемником научного направления, созданного профессором С. И. Лебедкиным и академиком Д. М. Голубом. Петр Иосифович продолжил разработку традиционных научных направлений в морфологии: развитие и строение органов и регулирующих систем организма в эмбриогенезе человека и млекопитающих животных. Под его руководством проведен экспериментально-эмбриологический анализ строения периферической части вегетативной нервной системы, эндокринных органов, органов чувств и черепных нервов человека и млекопитающих животных. Исследована физиологическая атрезия органов пищеварительной, дыхательной, мочеполовой систем, определены критические периоды в развитии органов и систем, изучено влияние физических и химических факторов (рентгеновское облучение, пестициды, медикаменты — гуанетидин, циклофосфан) на развивающийся организм, что весьма актуально в современной экологической обстановке. В эксперименте установлены многочисленные аномалии и пороки развития, формирующиеся в эмбриогенезе под влиянием повреждающих факторов. В научных исследованиях П. И. Лобко всегда присутствовали актуальность и прикладной аспект. О его высокой научной активности свидетельствует более 400 опубликованных научных работ, из них 10 монографий. Некоторые из них: «Чревное сплетение и чувствительная иннервация внутренних органов» (1976), «Центральные и периферические источники иннервации надпочечных желез» (в соавторстве, 1976), «Физиологическая атрезия» (в соавторстве, 1983) — пользуются большой популярностью среди морфологов и в настоящее время. Кроме того, под редакцией П. И. Лобко издано около 14 монотематических сборников научных работ. Он принимал активное участие в различного рода научных мероприятиях. Так, с 1955 по 2011 г. им сделано более 100 докладов на научных форумах в Беларуси, в республиках Советского Союза и СНГ.

П. И. Лобко свободно владел английским, испанским, польским языками, что дало возможность активно участвовать в педагогической и научной деятельности на международном уровне. В 1967—1968 гг. он работал профессором-консультантом по анатомии в Гаванском университете, где руководил научной работой 8 аспирантов, подготовил 4 профессоров

(преподавателей) по анатомии. Учитывая большой вклад в развитие морфологической науки, Министерство здравоохранения Кубы повторно пригласило профессора Петра Иосифовича для подготовки научных и педагогических кадров (1988—1989 гг.). На кафедре анатомии медицинского института в г. Сантьяго де Куба руководил работой 4 кандидатских диссертаций. Профессор П. И. Лобко создал школу морфологов в этой стране, его ученики успешно работают в Гаване, Камагуэе и Сантьяго де Куба, возглавляют медицинские университеты, кафедры анатомии. Кроме того, воспитанники Петра Иосифовича работают во Вьетнаме, Никарагуа, Чехии.

П. И. Лобко активно участвовал в международных конференциях, симпозиумах (более 20) за рубежом (Швейцария, ГДР, ФРГ, Бельгия, Венгрия, Болгария, Чехословакия, Испания, Мексика, Индия). Научные достижения Петра Иосифовича известны во многих зарубежных странах. Доказательством этого является успешно проведенный IX Всесоюзный съезд анатомов, гистологов, эмбриологов, который состоялся в 1981 г. в Минске. На съезде иностранные ученые по достоинству оценили вклад анатомов Беларуси в морфологическую науку, в чем немалая заслуга профессора П. И. Лобко.

Петр Иосифович был мудрым, принципиальным руководителем, опытным воспитателем и педагогом, прекрасным человеком. Много сил и энергии отдано им созданию сплоченного творческого коллектива. Особое внимание в своей деятельности П. И. Лобко уделял подготовке научно-педагогических кадров. Под его руководством подготовлено и защищено 10 докторских и 40 кандидатских диссертаций. Им подготовлены кадры не только для Беларуси, но и для стран ближнего и дальнего зарубежья. Многие его ученики являются профессорами и доцентами кафедры или занимают руководящие посты в БГМУ, а также других вузах Республики Беларусь, России, Молдовы.

Профессор П. И. Лобко был талантливым педагогом. Его лекции отличались глубоким содержанием, современными научными данными, практической направленностью, увлекательной формой изложения и доступностью восприятия. Они всегда вызывали живой интерес не только у студентов, но и у аспирантов, преподавателей кафедры. Большое внимание Петр Иосифович уделял организации и со-

вершенствованию учебного процесса. Под его руководством разработаны программы по анатомии, изданы учебно-методические материалы, учебные пособия для студентов.

Много внимания Петр Иосифович уделял развитию анатомического музея и пополнению эмбриологической коллекции кафедры, при его активном участии значительно пополнился раздел музея по экспериментальной эмбриологии. Будучи заведующим кафедрой он заботился об улучшении условий учебы студентов и работы сотрудников.

П. И. Лобко постоянно вел активную общественную работу по популяризации научных морфологических исследований и развитию анатомической науки. С 1981 г. он являлся членом Президиума Всесоюзного научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов, с 1992 г. — членом Координационного Совета Международной ассоциации морфологов СНГ.

Более 10 лет профессор П. И. Лобко работал в составе проблемной комиссии «Функциональная анатомия» при Минздраве СССР. Долгие годы он был членом Центральной учебно-методической комиссии по анатомии при главном управлении учебных заведений Минздрава СССР. На протяжении нескольких лет работал в составе комиссии по разработке русского варианта международной анатомической номенклатуры.

Более 15 лет профессор П. И. Лобко возглавлял Правление белорусского республиканского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов. Под руководством и при его активном участии в Беларуси проведено 14 научных форумов: IX Всесоюзный съезд АГЭ, на котором участвовало более 30 иностранных ученых-морфологов из многих стран (Швейцарии, ГДР, ФРГ, Бельгии, Венгрии, Болгарии, Чехословакии, Испании, Мексики, Индии, Монголии, Польши, Кубы, США), I и II съезды и I Конгресс анатомов, гистологов и эмбриологов Беларуси, пленумы

научного общества АГЭ, конференции и симпозиумы.

На протяжении многих лет Петр Иосифович возглавлял Совет по защите докторских и кандидатских диссертаций по морфологическим дисциплинам при БГМУ, более 30 лет был членом редколлегии журнала «Здравоохранение Беларуси», более 20 лет — членом редколлегии журнала «Морфология» («Архив АГЭ»), членом редакционного Совета журналов «Морфология», «Клінічна анатомія та оперативна хірургія», «Морфологические ведомости», около 10 лет был членом Ученого медицинского совета при Минздраве БССР.

За вклад в развитие морфологической науки и подготовку научно-педагогических кадров Петр Иосифович был избран почетным доктором Гродненского госмедуниверситета, почетным членом Белорусского, Кубинского, Северо-Кавказского и Украинского научных обществ АГЭ, членом Российского научного общества нейроморфологов им. Б. И. Лаврентьева. В 1993 г. профессор П. И. Лобко был избран академиком Международной академии интегративной антропологии, в 1996 г. — действительным членом Белорусской академии экологической антропологии, в 1997 г. — членом-корреспондентом Белорусской академии медицинских наук, а в 2007 г. — почетным академиком Белорусской академии медицинских наук.

Заслуги П. И. Лобко в подготовке медицинских и научно-педагогических кадров, его научные достижения получили высокую оценку Правительства СССР, БССР и Республики Беларусь.

Петр Иосифович награжден орденом Дружбы народов (1986), Почетной Грамотой Президиума Верховного Совета БССР (1979), медалями «Ветеран труда» (1987), «За доблестный труд. В ознаменование 100-летия со дня рождения В. И. Ленина» (1970), знаками «Отличнику здравоохранения» (1978), «За отличные успехи в работе» (1978), знаком Н. И. Пирогова «За

заслуги в гуманной деятельности союза обществ Красного Креста и Красного Полумесяца СССР» (1982). В 1981 г. П. И. Лобко за большие успехи в научной и педагогической деятельности и активную общественную работу занесен в книгу Трудовой славы Московского района г. Минска. Он отмечен более чем 35 Почетными грамотами, грамотами и дипломами различных министерств и ведомств. За активное участие в организации и проведении IX Всесоюзного съезда АГЭ с международным участием в 1981 г. награжден Почетной грамотой ВНО АГЭ.

В 1994 г. Указом Президиума Верховного Совета Республики Беларусь Петру Иосифовичу за вклад в развитие медицинской науки присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки Республики Беларусь», в этом же году Постановлением Президиума Верховного Совета и Кабинета Министров Республики Беларусь ему присуждена Государственная премия Республики Беларусь в области науки и техники за учебное пособие для студентов медицинских вузов «Вегетативная нервная система. Атлас» (в соавторстве).

Плодотворная научная и педагогическая деятельность, организаторские способности, гуманное отношение к людям, высокая эрудиция и культура снискали заслуженный авторитет и уважение коллег, искреннюю благодарность многочисленных учеников.

Имя Петра Иосифовича Лобко, видного ученого-морфолога, широко известного у нас в стране и за рубежом, педагога, воспитавшего тысячи врачей, душевного человека, навсегда сохранится в памяти его многочисленных учеников и последователей.

Коллектив кафедры нормальной анатомии Белорусского государственного медицинского университета, Правление Белорусского научного общества морфологов, редакция журнала «Здравоохранение».



ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫЕ ИНФЕКЦИИ

«Не принять меры сегодня — нечем будет лечить завтра» — под таким названием по инициативе ВОЗ в 2011 г. прошел Всемирный день здоровья, посвященный проблеме мультирезистентности микроорганизмов. Вопросы развития антибиотикорезистентности и распространения внутрибольничных инфекций стали темой очередного заседания круглого стола. В этот раз в редакции журнала «Здравоохранение» собрались более 20 ведущих специалистов в этой области во главе с профессорами И. А. Карповым и Л. П. Титовым.

Л. П. Титов, *заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор:*

— Идея взять под контроль и предупредить распространение устойчивых к противомикробным препаратам форм микроорганизмов была выдвинута в виде стратегии ВОЗ в 2001 г., но особое звучание она приобрела, когда проблема приняла планетарные масштабы. Сегодня специалисты бьют тревогу: в стационарах применяются малоэффективные антибактериальные средства, на фармацевтический рынок поступают модификации антибиотиков, к которым микробы быстро вырабатывают резистентность, а темпы создания принципиально новых противомикробных средств заметно снизились.

Кроме того, появляются новые варианты микроорганизмов, устойчивых к противомикробным препаратам, которые несут в себе генетические детерминанты резистентности. С ростом популяции человека увеличивается и объем потребляемых антибактериальных средств (ежегодно во всем мире на их закупку в системе здравоохранения и сельского хозяйства уходит порядка 50 млрд долларов): доминируют цефалоспорины (27%), макролиды (20%), хинолоны (18%), пенициллины (17%). В Беларуси наиболее часто применяют пенициллины, цефалоспорины, макролиды и аминогликозиды... Согласно данным, полученным в Национальном центре по мониторингу резистентности микроорганизмов (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии), в лечебно-профилактических учреждениях республики отмечается высокий уровень резистентности госпитальных штаммов стафилококка, кишечной и синегнойной палочек, клебсиелл, энтеробактера, рост устойчивости гонококков и менингококков. Все это указывает на реальное существование в стране данной проблемы, которой в Беларуси начали заниматься профессор А. П. Красильников и доцент Л. С. Змушко.

И. А. Карпов, *заведующий кафедрой инфекционных болезней БГМУ, профессор:*

— Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам формируется в стационарах, по большей части в хирургических отделениях и реанимации.

В распоряжении врачей широкий спектр средств, им по силам справиться даже с мультирезистентным стафилококком (линезолид, гликопептиды), сложнее дело обстоит с грамотрицательной флорой. Одним из эффективных препаратов наряду с карбапенемами является цефоперазон/сульбактам, особенно актуальный при инфекции, вызванной *Acinetobacter baumannii*.

Когда мы говорим «сепсис», то часто подразумеваем внутрибольничные инфекции (ВБИ), а это — комплексный вопрос, требующий совместного решения. На практике заведующий тем же хирургическим отделением отвечает не только за организацию работы врачей и всего медицинского персонала, оперативную деятельность хирургов, процесс выхаживания пациентов, но и за поддержание правильного эпидемиологического режима. Правильно ли это? Может, ему стоит оказать квалифицированную помощь?

Нужно отметить, что сегодня представительный круглый стол. Хочется услышать мнения профессионалов по совершенствованию процесса обучения студентов в медицинских вузах, будущих врачей, построения работы в целом. Какие антибактериальные препараты используют в стационарах? Есть ли местные средства, позволяющие осуществить деколонизацию микробов у медицинских работников? Насколько обосновано и будет ли востребовано проведение мониторинга резистентности микроорганизмов? Какие изменения следует внести в протоколы лечения, чтобы повысить эффективность терапии? Надеюсь, что сегодняшний разговор будет продуктивным и полезным как практикующим врачам, ученым, так и организаторам здравоохранения.

М. И. Римжа, *профессор:*

— Действительно, ВОЗ громко заговорил об этой проблеме в 2001 г., а Беларусь заявила еще в 1973 г., когда вопрос о внутрибольничной инфекции подняли А. И. Кондрусев, О. С. Мишарев, Н. И. Вольвачев, Н. И. Доста. Первая публикация, касающаяся вопросов резистентности микроорганизмов, появилась в журнале «Здравоохранение Белоруссии» в 1976 г. Позже была создана республиканская проблемная комиссия и про-



Г. А. Скороход, И. А. Карпов, М. И. Римжа, И. И. Пикиреня

грамма, в рамках которой разработали обстоятельную нормативную базу, добились того, что в штат стационара был введен клинический эпидемиолог (правда, так и не решили вопрос с госпитальным клиническим фармакологом, хотя он просто необходим в каждом крупном стационаре). Определение резистентности микроорганизмов, корректировка объемов закупок препаратов, в том числе антибиотиков, антисептиков, дезинфектантов, учитывая чувствительность госпитальных штаммов, — эти вопросы должны быть в компетенции специалистов. Только в таком случае терапия будет рациональной и эффективной.

И. И. Пикирня, главный хирург Министерства здравоохранения Республики Беларусь, кандидат медицинских наук:

— На мой взгляд, в первую очередь нужно определить, что мы вкладываем в понятие «внутрибольничные инфекции» и совершенствовать систему отчетов. Согласно официальной статистике в прошлом году в республике зарегистрировано 29 случаев (чуть больше числа участников сегодняшнего круглого стола!), в Англии, к примеру, ВБИ стали причиной смерти 5 тыс. человек.

Если у нас констатируют ВБИ, то автоматически подразумевают, что врач не выполнил санитарные нормы и правила. Следует ряд санкций, в том числе правовых. Но нельзя забывать, что инфицирование не всегда развивается по вине медицинского работника, а может возникнуть и при соблюдении санитарных норм(!), когда, скажем, в отделение реанимации поступают уже иммунокомпрометированные пациенты.

Сегодня просто необходима подготовка междисциплинарного документа, который позволит прийти к единому пониманию вопроса (уже есть положительные примеры: так, несколько лет группа специалистов Министерства здравоохранения работала над созданием клинического протокола лечения и профилактики тромбозов). Не лишним будет создание национального руководства по антибиотикотерапии, данные которого ежегодно бы обновлялись.

И. А. Карпов:

— Встает вопрос о внутрибольничной гигиене: кто расскажет хирургу, как, чем и сколько раз мыть руки перед операцией, кто обучит медицинский персонал брать материал на бактериологическое исследование? Это же целая наука.

Л. П. Титов:

— На Западе в каждой клинике функционирует бактериологическая лаборатория, клинический бактериолог работает в тесном контакте с врачами-клиницистами, в зависимости от специализации определяет, какой материал нужно забирать, какие методы анализа применять, а по результатам исследований дает рекомендации, какой антибиотик в каждом случае будет наиболее эффективен. Это звено в наших клиниках пока отсутствует, отличается и практика взаимоотношений между



А. Е. Кулагин, А. Р. Аветисов, И. М. Лаптева

врачом-клиницистом и врачом-бактериологом, учет резистентности микроорганизмов и случаев ВБИ.

А. Р. Аветисов, декан медико-профилактического факультета БГМУ, кандидат медицинских наук:

— Позволю себе такую аллегория: что будет, если сапожник начнет печь пироги, а пекарь — тачать сапоги? Примерно такая ситуация сегодня сложилась в здравоохранении. В 2004 г. руководством было принято решение разделить профилактику и лечебное дело. Только обратного не сделано. За последнюю пятилетку не знаю ни одного случая, когда бы эпидемиолог по распределению попал в клинику. Кто тогда становится клиническим эпидемиологом, остается загадкой. Я уже не говорю о внутрибольничной/госпитальной гигиене, что, как заметил Л. П. Титов, за рубежом — в порядке вещей. Страдает процесс подготовки специалистов, а запрет студентам медико-профилактического факультета работать в лечебно-профилактических учреждениях, выполнять свои обязанности по профилактике в ближайшем будущем «аукнется» большими проблемами.

А. Е. Кулагин, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии БГМУ, кандидат медицинских наук:

— Всем понятно, какая флора будет у пациентов через несколько суток, если на трех тяжелых больных приходится 1 медицинская сестра... В таком случае не поможет ни один мощный антибиотик. Микробный пейзаж в разных отделениях одной и той же клиники меняется в течение года. Причем резистентность выявленных микроорганизмов достигает 100%. Без профессионалов решить вопросы санэпидрежима невозможно. Вот только где эти специалисты? Буду откровенным, за последние 3 года в отделении реанимации не видел ни одного эпидемиолога.

Во 2-й детской клинической больнице Минска есть хорошая баклаборатория, специалисты которой определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам в каждом отделении, после чего представляют обобщенные данные, которые направляются в помощь клиницистам... Только загвоздка в том, что в лаборатории применяют отличный от используемого в отделе-

нии антибиотик. Получается, что препарат должен работать, а у нас на практике — провал.

В. И. Волков, *заведующий отделением анестезиологии и реаниматологии Республиканского центра детской хирургии:*

— Мы уже оценили незаменимую помощь госпитального эпидемиолога в клинике, когда в 2006 г. в штате РЦДХ появился такой специалист. Мы знаем спектр микроорганизмов и их чувствительность к антибиотикам. Учитывая, что в центр госпитализируют детей со всей республики, по характеру микрофлоры пациента, поступившего в реанимационное отделение, можем сказать, из какого региона и какого отделения его доставили.

Зачастую наблюдаем, что антимикробные препараты, широко применяемые долгое время, теряют эффективность, а «забытые» в силу разных причин — через несколько месяцев снова начинают «работать». Госпитальный эпидемиолог может подсказать, какой антибиотик предпочтительнее в конкретной ситуации. Он же поможет повысить эффективность лечения. Поясню: мы отметили, что контаминация пациентов, подключенных к аппарату ИВЛ, происходит посредством катетеров для санации. Если менять систему (использовать герметичный катетер), то в 2—2,5 раза уменьшается число случаев инфицирования, то же касается и венозных катетеров (в 2,5 раза реже встречается ВБИ).

В заключение хочу предложить активизировать сотрудничество с патологоанатомической службой, которая сегодня держится несколько обособленно. Если обеспечить их микробиологическим материалом, они помогут разобраться, где мы допускаем ошибки. Клиницисту трудно идентифицировать, с чем он имеет дело (инфицирование, контаминация или болезнь), поскольку маркеры воспаления недостаточно специфичны. В таком случае важно выработать критерии, которые помогут в работе.

И. М. Лаптева, *руководитель отдела РНПЦ фтизиатрии и пульмонологии, кандидат медицинских наук:*

— Похожая ситуация складывается и во фтизиатрии. При подозрении на пневмонию антибиотикотерапию необходимо проводить незамедлительно, а поскольку нет возможности оперативно диагностировать этиологически значимый респираторный патоген, врач идет эмпирическим путем.

Без решения стратегической задачи невозможно приступить к тактическим шагам. До тех пор пока будем замалчивать случаи ВБИ (можно только предположить, какова реальная ситуация, когда количество заболевших в стране, территориально не превышающей площадь Беларуси, исчисляется тысячами), огромные средства будут уходить на лечение, нельзя сбрасывать со счетов и летальные случаи.

В нашей стране до сих пор не ставят диагноз «нозокомиальная пневмония», за рубежом об этом говорить не запрещено. Там существует руководство и создана группа по инфекционному контролю в стационаре, осу-



М. К. Кевра, В. П. Филонов, А. Л. Мелешко, Л. П. Титов

ществляется текущий и направленный контроль, когда в короткие сроки разрабатывают мероприятия по подавлению вспышки инфекции. Думаю, такая группа восстановлена и в нашей республике. Необходимость инфекционного мониторинга подтверждает различие спектра микроорганизмов не только по регионам, а даже по отделениям одного и того же стационара.

Н. И. Доста, *доцент кафедры урологии БелМАПО, кандидат медицинских наук:*

— В 1972—1973 гг., когда мы с коллегами занимались проблемой раневой инфекции в урологии, госпитальная инфекция в клинике составляла 38%. Мы стояли перед выбором, говорить или молчать, ведь информация могла вызвать реакцию, подобную эффекту взорванной бомбы, если учесть, что эта цифра в СССР не превышала 4%, в Европе — 10%. В подобной ситуации и сегодня находятся заведующие отделениями, которые ломают голову над тем, какие 1—2 случая ВБИ включить в статистический отчет. Все собравшиеся за круглым столом понимают: реальных цифр по республике нет. И не будет до тех пор, пока за объективную информацию будут наказывать, в том числе и рублем.

Приведу статистические данные: ежегодно в США насчитывается порядка 7 млн визитов по поводу инфекций мочевых путей, в 2 млн случаев в патологический процесс вовлечены нижние мочевые пути; 15% выписанных лекарств (около 1,5 млрд долларов США) направлены на подавление урологической инфекции. Американские специалисты ищут пути, как сократить финансовые потери, связанные с госпитальной инфекцией, а в Беларуси есть подобные экономические выкладки?

Наработанные в нашей стране более чем за 30 лет инструкции, методические рекомендации и нормативные акты, где подробно расписано, что, в какой последовательности, шаг за шагом, необходимо выполнять, остались невостребованными до настоящего времени. Эту информацию следует систематизировать и довести до врачей, а также принять решение на уровне Министерства здравоохранения республики о включении в штат хотя бы областных больниц должность клинического эпидемиолога.

М. К. Кеэра, профессор, доктор медицинских наук:

— Чтобы бороться с резистентностью возбудителей, нужно двигаться в двух направлениях: профилактика и уменьшение контаминации.

Обозначу основные моменты, на которых хотел бы акцентировать внимание. Первое. Речь о создании новой учебной специальности «клиническая фармакология» зашла в 1976 г. на ученом совете мединститута, решение представили в Министерство здравоохранения. Но с того времени много воды утекло. Получили «добро» только через 30 лет. Сегодня из-за недостатка финансирования клинический фармаколог существует только на бумаге, а в клинике в лучшем случае его обязанности исполняет начмед.

Второе. Лечить должен грамотный врач — это не обсуждается. Какую базовую подготовку по химиотерапии он получает? Сегодня азы клинической фармакологии умещаются в неделю. В этом году на лечебном факультете количество часов еще уменьшится. В Италии, например, средства противомикробной терапии изучают в течение года, а у нас — 1 занятие. Да чего далеко ходить? Возьмем наши реалии: в медучилище клиническую фармакологию изучают 75 ч, в университете на лечебном факультете — 45 ч, выходит, фельдшер знает больше, чем выпускник БГМУ?!

Третье. Нужно менять отношение к проблеме. Инструкции по лечению тяжелых нозологических форм (пневмония, урогенитальная инфекция...) необходимо постоянно обновлять, причем обдуманно, а не переписывать механически старые.

Четвертое. За последние годы не было существенного прорыва в создании принципиально новых противомикробных средств, поскольку производители не заинтересованы в этом: экономически выгоднее разрабатывать средства для похудения, лечения остеопороза, депрессии, нежели антимикробный препарат, к которому вскоре станут резистентными возбудители. Если учесть, что микроорганизмы передают генетическую информацию, выход один: или создавать нечто новое, или модифицировать старое.

Г. А. Скороход, заведующий лабораторией внутрибольничных инфекций БГМУ, кандидат медицинских наук:

— Чтобы решать проблему, необходимо о ней знать. Думаю, в данной ситуации клиницистам следует разработать шкалу риска развития этой патологии, причем указывать объективную информацию. Клинический эпидемиолог будет вести мониторинг антибиотико-резистентности выявленной микрофлоры, определять факторы патогенности в данном учреждении.

В конечном итоге нужно признать, что борьба с микроорганизмами не ограничивается использованием только антибиотиков. В ход идут антисептики, дезинфектанты, зубиотики, бактериофаги, а вот информация об их применении практически отсутствует. У нас нет информации, какие средства зарегистрированы в республике и рекомендованы.

В. А. Горбунов, доцент кафедры микробиологии БГМУ, кандидат медицинских наук:

— Во-первых, чтобы получить реальную картину и адекватную статистику, следует отказаться от понятия ВБИ, которого как огня боятся врачи. Лучше конкретизировать, например, гнойно-септическая инфекция, вызванная тем или иным возбудителем, или указать точное число случаев пневмонии.

Во-вторых, трудно вести мониторинг, когда далеко не в каждой больнице есть своя бактериологическая лаборатория. Сегодня централизованные баклаборатории

оснащены современным оборудованием, но врачу приходится ждать 7—10 дней, пока придут результаты исследования. Будь в клинике лаборатория, лечащий доктор мог бы оперативно получать информацию и совместно с врачом-бактериологом подобрать наиболее эффективный в конкретном случае препарат.

В. П. Филонов, представитель фирмы «БелАсептика», профессор:

— Антибиотики даже не потребуются, а тем более не нужно расширять их спектр, если акцентировать внимание на профилактике. Сегодня в республике хорошо знают о компании «БелАсептика», активно используют дезсредства, делая выбор в пользу отечественных аналогов. За годы работы белорусские препараты (антисептики, дезинфектанты) хорошо зарекомендовали себя не только в нашей стране, но и пользуются огромным спросом в России, Украине, Азербайджане, Африке. Отличает большой ассортимент, качество и доступные цены.

Е. В. Литвинова, начальник отдела биологических испытаний управления инновационного развития РУП «Белмедпрепараты»:

— Предприятие «Белмедпрепараты» — известный производитель лекарственных препаратов, который наряду с другими видами продукции уже более полувека выпускает средства антимикробной терапии. С выпуска первых 300 флаконов пенициллина в 1947 г. по сути началось промышленное производство данной группы лекарств в бывшем СССР. Предприятие и по сей день придерживается приоритетных направлений (производство антибиотиков — в их числе). Наша главная задача — обеспечить население современными, эффективными и доступными по цене лекарственными средствами. Сегодня РУП «Белмедпрепараты» осваивает производство и выводит на фармацевтический рынок республики и соседних государств аналоги современных брендов, так называемые препараты-дженерики.

Традиционно на предприятии уделяется особое внимание обеспечению качества производимой продукции, получению объективных доказательств ее эффективности и безопасности. В частности, все препараты-дженерики, осваиваемые предприятием, в обязательном порядке проходят сравнительные медико-биологические испытания. На одном из этапов специалисты микробиологической лаборатории РНПЦ эпидемиологии и микробиологии оценивают спектр и антибактериальную активность воспроизведенных препаратов в сравнении с оригинальными лекарственными средствами (только после подтверждения полного совпадения с оригиналом выпущенный препарат получает путевку в жизнь). Причем для испытаний используются не только тестовые штаммы микроорганизмов, но и клинические изоляты, выделенные в стационарах нашей страны.

А. Е. Кулагин:

— Нам, если разобраться, нет разницы, какой производитель, важно, чтобы лекарства были эффективными. Хорошо зарекомендовали себя оригинальные препараты, вспомнить хотя бы линезолид во время эпидемии ОРВИ.

В. З. Русович, координатор проектов ВОЗ по туберкулезу Странового бюро ВОЗ в Беларуси:

— Представляю программу борьбы с туберкулезом, поэтому акцентирую внимание на информации, касающейся этой инфекции.

В России и Беларуси среди вновь выявленных случаев туберкулеза в каждом пятом наблюдается множественная лекарственная резистентность, что предполагает курс лечения не менее 2 лет, и еще не менее 6 мес — в закрытом отделении в стационаре. Распространение лекарственно устойчивого туберкулеза часто происходит за счет внутрибольничного суперинфицирования устойчивыми штаммами при отсутствии надлежащих мер инфекционного контроля при длительной госпитализации. Ситуацию можно изменить с помощью внедрения недавно одобренных ВОЗ современных методов диагностики туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, которые позволяют своевременно разделить потоки пациентов в зависимости от резистентности и сократить время пребывания больных в одной палате с пациентами с множественной лекарственной резистентностью с 2,5 мес до 1 сут.

Что касается антибактериальной резистентности в целом, существует ряд рекомендованных ВОЗ мероприятий, способствующих уменьшению лекарственной устойчивости. Прежде всего, это создание республиканской координационной рабочей группы по выработке национальной политики для предотвращения нарастания антибактериальной резистентности и мониторинг ситуации за счет налаженного учета и эпидемиологического надзора за распространением устойчивых форм микроорганизмов.

Второе — рациональное применение антибиотиков. В отличие от зарубежья в нашей стране антимикробные препараты легкодоступны в аптечной сети, хотя формально их должны выдавать только по рецепту. Негативно сказывается и перегруженность амбулаторно-поликлинического звена: врачу легче назначить антибиотик, нежели объяснить ограничения действия препарата (это намного ускоряет консультацию, что особенно актуально при дефиците времени, отведенного на прием пациентов).

Третье — стандарты. Просто необходимы методические рекомендации, поясняющие, в какой ситуации назначать антибиотик (с указанием вида препарата, дозировки, длительности применения), также нужно ясно, четко указать, когда следует отказаться от применения антимикробных препаратов.

Л. П. Тутов:

— Проблема, поднятая сегодня на заседании круглого стола, очень важная. Не всегда клиницисты, эпидемиологи и ученые акцентируют внимание на этих вопросах. Министерству здравоохранения по силам изменить ситуацию к лучшему на основе собственного и международного опыта.

Критический момент — связь врача с бактериологической лабораторией. Оснащенная лаборатория — это большое преимущество, в настоящее время в используе-

мых автоматических анализаторах накапливается огромная база данных. На практике же получается, что лечащий врач отделения не держит связь с лабораторией: результаты исследований приходят поздно, эмпирическая антибиотикотерапия назначается без учета резистентности микрофлоры, выделяемой от больных в данном отделении, а то и вовсе не анализируются в стационарах.

Есть идея собирать в РНПЦ данные с баканализаторов всей республики, анализировать их, размещать на официальном сайте учреждения, периодически рассылать по электронной почте во все клиники. Это позволит лечащим врачам отделений быть в курсе, какие изменения в составе и свойствах микроорганизмов происходят в разрезе региона, страны, каков уровень резистентности клинически значимых микроорганизмов к применяемым антибиотикам и дезинфектантам.

Необходимо изменить отношение врачей и организаторов здравоохранения к проблеме: адекватная (не для наказания) регистрация случаев ВБИ позволит знать реальную ситуацию, поскольку изменяется спектр микробов, их свойства, растет резистентность, к тому же меняется и состояние здоровья человека.

В крупных клиниках необходимо создать или возобновить работу врачебных групп контроля за инфекцией. Важнейшим условием усиления борьбы с нозокомиальными инфекциями является повышение уровня знаний медицинского персонала в этой области и надлежащее выполнение противоэпидемических мероприятий. Следует постоянно держать на контроле вопросы стерилизации, дезинфекции, обеззараживания объектов внешней среды. Рациональная антибиотикотерапия требует от врачей разных специальностей более профессионального и ответственного подхода при выборе и назначении антибактериальных препаратов. Стремиться шире использовать компьютерную технику и компьютерные программы для учета результатов мониторинга резистентности микроорганизмов на уровне ЛПУ, для своевременной подготовки формуляров эмпирической антибиотикотерапии, содержащих характерный спектр бактерий, выделяемых от пациентов в конкретном отделении (ЛПУ), и данные об их антибиотикорезистентности. Это должно стать рутинной практикой каждого врача, должно быть воспринято и поддержано медицинской общественностью. Соответственно внедрение данного подхода, без которого немислима работа врача в клиниках западных стран, позволит достаточно повысить эффективность эмпирической терапии, снизить уровень антибиотикорезистентности микроорганизмов, соответственно и частоту случаев ВБИ, повысит экономическую эффективность лечебного процесса.

Подготовила Т. Ясевич

© «Здравоохранение», 2011

Свидетельство о государственной регистрации № 562 от 20.07.2009 г.

Подписные индексы:

для организаций — 749122,

для индивидуальных подписчиков — 74912

Дизайн обложки: Сергей Саркисов

Компьютерная верстка: Наталья Гелжец

Подписано в печать с оригинал-макета 27.09.2011.

Формат 60x84 1/8. Офсетная печать.

Физ. печ. л. 10,0+1,0 печ. л. вкл. Усл. печ. л. 9,3.

Уч.-изд. л. 14,8. Тираж 2286 экз. Зак. 2650

Адрес редакции: 220007, Минск, Фабрициуса, 28

Телефоны: 226-21-66, 226-21-48

E-mail: zdrav@tut.by

zdravmag@mailgov.by

Республиканское унитарное предприятие

"Издательство «Белорусский Дом печати»

ЛП №02330/0494179 от 03.04.2009.

Пр. Независимости, 79, 220013, Минск.

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