



НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ ЖУРНАЛ

ИЗДАЕТСЯ С СЕНТЯБРЯ 1924 г.

ОРГАН МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

№10/2014

Журнал награжден  
Почетной Грамотой  
Верховного  
Совета БССР (1974 г.)



Победитель VIII  
Национального  
конкурса  
«Золотая Литера»  
в номинации  
«Лучшее  
специализированное,  
отраслевое издание»  
(2012 г.)



ГЕДЕОН РИХТЕР ОАО

**Главный редактор**

Ю. К. АБАЕВ

**Зам. гл. редактора**

В. С. УЛАЩИК

**Отв. секретарь**

Л. А. ФЕДОТОВА



Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь  
для опубликования результатов диссертационных исследований  
по медицинским и биологическим наукам

Журнал включен в систему Российского научного цитирования

**Редакционная коллегия:**

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)  
МАНАК 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.

**Редакционный совет:**

ВАСИЛЬКОВ Н. А.  
ГАЕВСКИЙ И. В.  
ГОДОВАЛЬНИКОВ Г. В.  
ДЕЙКАЛО В. П.  
ДЕМИДЧИК Ю. Е.  
ДЕРКАЧ Ю. Н.  
КРАПИВИНА С. В.  
КРАСНЫЙ С. А.  
ЛОСИЦКИЙ И. Г.  
ЛЫЗИКОВ А. Н.

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

**Дорогие коллеги!**

Вся история человеческого общества (на Земле проживало около 80—100 млрд человек) — это летопись опустошительных инфекций. Достижения в борьбе с инфекционными болезнями в XX столетии увеличили продолжительность жизни человека почти на четверть века, однако и сейчас инфекции несут серьезную угрозу человечеству, являясь второй ведущей причиной смертности и первой причиной преждевременной смертности в мире. Существуют эпидемиологические, экономические, социальные критерии оценки ущерба от инфекционных болезней. Однако урон гораздо значительнее, если иметь в виду, как много великих людей вырвано из жизни эпидемиями, как много замыслов известных ученых, писателей, художников, музыкантов остались нереализованными (Тициан, Б. Спиноза, В. А. Моцарт, Ф. Шиллер, А. А. Иванов, Ф. Шопен, Т. Гексли, Ф. Кафка, П. И. Чайковский, И. П. Павлов, А. П. Чехов, Г. Риккетс и многие другие).

Научно обоснованный подход в борьбе с массовыми инфекционными болезнями продемонстрировал высокую эффективность уже в первые десятилетия прошлого столетия. Достигнутые к 70–80 гг. XX века успехи — ликвидация натуральной оспы, эрадикация полиомиелита — создали представление о близкой победе и возможности полного избавления человечества от инфекционных болезней. Однако вскоре наступило отрезвление. Новые угрозы мира микробов демонстрируют совершенствование конкурентных отношений, ускорение темпов эволюции микроорганизмов, появление новых возбудителей (вирусы гепатита С, D, E, F, G, ВИЧ, SARS, лихорадка Ласса, Марбург, Эбола и др.), рост числа вспышек инфекций, передаваемых с водой, продуктами питания, лекарственными препаратами, инструментарием. Расширилось представление об этиологии соматической патологии человека, в структуре причин которой доля микробных факторов оценивается в 15–35%. Выдвинута теория о том, что нанобактерии лежат в основе механизма старения организма.

Популяция человека на протяжении многих тысячелетий эволюционировала и регулировалась естественными механизмами, основными из которых были инфекции. В настоящее время быстрыми темпами происходит миграция людей, урбанизация и рост плотности населения, что существенно облегчает передачу инфекционных агентов. Глобальные климатические изменения уже сейчас вносят коррективы в спектр и темпы возникновения инфекций. Ухудшение экологической обстановки и психоэмоциональные нагрузки привели к значительному росту частоты иммунодефицитов. Существенно возросла роль условно-патогенных микроорганизмов, увеличилась частота оппортунистических инфекций (герпетическая, цитомегаловирусная, токсоплазмоз, микоплазмоз, криптококкоз, криптоспоририоз и др.). Все чаще регистрируются необычные комбинации известных инфекций, растет доля полиэтиологичных инфекций в структуре гнойно-септических заболеваний.

Сегодня как никогда актуальны слова лауреата Нобелевской премии Ш. Николя (1886—1936): «В будущем народятся новые заразные болезни, медленно исчезнут некоторые старые, а те, что останутся, не будут иметь в точности те формы, под которыми мы их знаем теперь». Данные тенденции выдвигают на первый план проблему инфекционной патологии в новых геополитических, экономических и демографических условиях.

Эпидемиологическое благополучие в Беларуси, является результатом эффективной деятельности медиков практического здравоохранения и научных работников. Однако не следует забывать — инфекции не знают границ и представляют собой постоянную угрозу. Статьи данного номера журнала подготовлены сотрудниками РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, старейшего научного учреждения Беларуси, которому исполнилось 90 лет. Надеемся, данные публикации расширят ваши представления об инфекционной патологии и окажут помощь в практической работе.

Сердечно поздравляем коллектив РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, имеющий славные традиции и большие научные заслуги, с юбилеем. Желаем неиссякаемой творческой энергии и дальнейших успехов.

С уважением

Ю. К. Абаев

**Проблемы эпидемиологии,  
микробиологии и инфекционных болезней**

Титов Л. П., Горбунов В. А. Республиканскому научно-практическому центру эпидемиологии и микробиологии — 90 лет (1924—2014) .....	4
Амвросьева Т. В., Дедюля К. Л., Поклонская Н. В., Богуш З. Ф. Полиомавирусная инфекция человека: значение в патологии и генодиагностика .....	9
Антоневич Н. Г., Гончаров А. Е., Чекан В. Л. Иммуносупрессивные свойства культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия человека .....	14
Дракина С. А., Корбут Л. В., Анисько Л. А., Верещако Н. С., Семижон П. А., Счеслёнок Е. П., Соловей Н. В., Князева О. Р., Щерба В. В., Красько А. Г., Карпов И. А. Выявление гранулоцитарного анаплазмоза человека у пациентов с клещевыми инфекциями .....	20
Ерёмин В. Ф., Гасич Е. Л., Сосинович С. В., Домнич М. В., Кучеров И. И., Шишкин Е. А., Суетнов О. Н., Карпов И. А. Мутации резистентности вируса ВИЧ у пациентов с ВИЧ/СПИДом, находящихся на ВААРТ и не получавших АРП .....	24
Счеслёнок Е. П., Семижон П. А., Школина Т. В., Фомина Е. Г., Дубков Н. А., Владыко А. С. Получение и характеристика рекомбинантного полипептида нуклеокапсидного белка вируса Марбург .....	31
Сивец Н. В., Грибкова Н. В., Шмелева Н. П. Эпидемиологические аспекты бокавирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь (2010—2014) .....	36
Янович О. О., Титов Л. П., Щерба В. В. Полиморфизм генов цитокинов альфа-ФНО, ИЛ-1РА и ИНФ-гамма у пациентов с инфекционным мононуклеозом .....	40
Глинская И. Н., Самойлович Е. О., Дашкевич А. М., Ермолович М. А., Семейко Г. В., Свирчевская Е. Ю., Светогор Т. Н., Станкевич Н. А., Шиманович В. П., Жукова Н. П., Кондрескул И. В. Распространение завозного вируса кори в Минске .....	44
Гудков В. Г., Федорова И. В., Чистенко Г. Н., Фисенко Е. Г., Глинская И. Н., Левшина Н. Н., Плотникова К. Ю., Зуева В. Л., Наройчик Л. К., Пашкович В. В., Виринская А. С. Характеристика эпидемического процесса вирусного гепатита А .....	49
Рубаник Л. В., Асташонко А. Н., Жавнерко Г. К., Поleshchuk Н. Н. Индикация <i>Chlamydia trachomatis</i> с помощью иммуномагнитных флуоресцентных наночастиц при персистентной форме инфекции .....	54
Гасич Е. Л., Ерёмин В. Ф., Сосинович С. В., Домнич М. В., Черновецкий М. А., Лукьяненко И. Г., Гущина Л. М., Романова О. Н. Генетическое разнообразие вируса гепатита С у детей со злокачественными новообразованиями .....	59
Бореко Е. И., Павлова Н. И., Савинова О. В. Сравнительная противовирусная активность нативных тритерпеноидов .....	65
Шмелева Н. П., Сивец Н. В., Грибкова Н. В., Лапо Т. П., Чешенко Е. В., Аношко О. Н. Этиологический спектр возбудителей ОРВИ у детей Беларуси в 2010—2014 гг. ....	69
<b>Записки опытного клинициста</b>	
Кондурцев В. А. Искусство клинического обхода: распространенные недочеты в ведении больных и медицинской документации .....	72
<b>Медицина Беларуси в лицах</b>	
Улащик В. С. Даниил Александрович Марков (1895—1976) .....	78

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

Titov L. P., Gorbunov V. A. Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology is 90 (1924—2014)	
Amvrosiyeva T. V., Dedyulya K. L., Poklonskaya N. V., Bogush Z. F. Human polyomavirus infection: significance in pathology and gene diagnostics	
Antonovich N. H., Hancharou A. Y., Chekan V. L. Immunosuppressive properties of human olfactory epithelium-derived ectomesenchymal stem cells in culture	
Drakina S. A., Korbut L. V., Anisko L. A., Vereshchako N. S., Semizhon P. A., Scheslenok E. P., Solovey N. V., Knyazeva O. R., Shcherba V. V., Krasko A. G., Karpov I. A. Human granulocytic anaplasmosis diagnosis in patients exposed to mite infection	
Eremin V. F., Gasich E. L., Sosinovich S. V., Domnich M. V., Kucherov I. I., Shishkin E. A., Suetnov O. N., Karpov I. A. HIV resistance mutations identified in HIV/AIDS patients on HAART and in persons not receiving ART	
Scheslenok E. P., Semizhon P. A., Shkolina T. V., Fomina E. G., Dubkov N. A., Vladkyo A. S. Production and characterization of recombinant polypeptide of nucleocapsid protein of Marburg virus	
Sivets N. V., Gribkova N. V., Shmeleva N. P. Epidemiological aspects of bocavirus infection in Belarus hospitalized children (2010—2014)	
Yanovich O. O., Titov L. P., Shcherba V. V. Polymorphism of TNF-alpha, IL-1RA, and INF-gamma cytokine genes in patients with infectious mononucleosis	
Glinskaya I. N., Samoilovich E. O., Dashkevich A. M., Yermolovich M. A., Semeiko G. V., Svirchetskaya E. Yu., Svetogor T. N., Stankevich N. A., Shimanovich V. P., Zhukova N. P., Kondreskul I. V. Distribution of delivered measles virus in Minsk	
Gudkov V. G., Fedorova I. V., Tchistenko G. N., Fisenko E. G., Glinskaya I. N., Levshina N. N., Plotnikova K. Yu., Zueva V. L., Narojchik L. K., Pashkovich V. V., Virinskaya A. S. Description of viral hepatitis A epidemic process	
Rubanik L. V., Astashonok A. N., Zhavnerko G. K., Poleshchuk N. N. <i>Chlamydia trachomatis</i> indication using immunomagnetic fluorescent nanoparticles in case of infection persistent form	
Gasich E. L., Eremin V. F., Sosinovich S. V., Domnich M. V., Chernovetsky M. A., Lukyanenko I. G., Gushchina L. M., Romanova O. N. Genetic diversity of hepatitis C virus circulating in population of children with malignancies	
Boreko E. I., Pavlova N. I., Savinova O. V. Comparative antiviral activity of native triterpenoids	
Shmeleva N. P., Sivets N. V., Gribkova N. V., Lapo T. P., Tcheshenok E. V., Anoshko O. N. Etiological spectrum of Belarus childish AURI causative agents in 2010—2014	
<b>Experienced Clinician's Reminiscences</b>	
Kondurtsev V. A. Art of clinician's rounds: widespread drawbacks of patient management and medical documents keeping	
<b>Belarus Medicine in Portraits</b>	
Ulashchik V. S. Daniil Markov (1895—1976)	



Л. П. ТИТОВ, В. А. ГОРБУНОВ

## РЕСПУБЛИКАНСКОМУ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОМУ ЦЕНТРУ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ — 90 ЛЕТ (1924—2014)

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

*Описана история становления Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь.*

**Ключевые слова:** история становления, научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

Со дня основания РНПЦ эпидемиологии и микробиологии прошло 90 лет. История становления центра отмечена событиями и достижениями, тесно связанными с эпидемической обстановкой в стране и решением актуальных задач, выдвинутых временем и сопряженных с потребностями здравоохранения республики в защите населения от инфекций, прежде всего от их массового распространения.



Профессор Б. Я. Эльберт

вот неполный перечень инфекций, которые требовали принятия неотложных мер ввиду их эпидемического распространения. Для борьбы с ними с 1924 г. по 1950-е годы XX века созданы первые в республике вакцины: брюшнотифозная, дизентерийная, вакцина против туберкулеза — БЦЖ. Одновременно налажено производство лечебных иммунобиологических препаратов: противокоревая сыворотка, дизентерийный бактериофаг, дифтерийный и столбнячный анатоксины. Профессор Б. Я. Эльберт основал производство антирабической вакцины, которой были полностью обеспечены все прививочные пункты республики. Сухая

антирабическая вакцина, производившаяся в Беларуси, была одной из лучших в Советском Союзе.

В послевоенные годы заново создана научная, экспериментальная, производственная база для изучения возбудителей инфекционных заболеваний, разработки средств диагностики и профилактики инфекций. В этот период руководителями института были профессор С. М. Фрид, Д. П. Беляцкий, доцент И. С. Рубинштейн.

С 1951 г. по 1986 г. институт возглавлял академик В. И. Вотяков. Им были основаны и получили развитие новые, актуальные для медицинской науки направления: химиотерапия вирусных инфекций, особо опасные вирусные инфекции, прионные (медленные) инфекции. С 1975 г. институт являлся главным научным центром всесоюзного значения по этим направлениям. За заслуги в борьбе с инфекционными болезнями и подготовку квалифицированных кадров в сентябре 1974 г. институт удостоен высокой награды — ордена Трудового Красного Знамени.



Академик В. И. Вотяков

В республике были начаты разноплановые исследования по изучению новых для Беларуси инфекций, имеющих тенденции к эпидемическому распространению: гриппа и других респираторных инфекций, ВИЧ-инфекции, геморрагических лихорадок (Ласса, Мачупо, Марбург, Эбола), трансмиссивных спонгиозных энцефалитов, ряда арбовирусных инфекций (клещевой энцефалит, лихорадка Западного Нила), Лайм-боррелиоза и др. Научно обоснованные противоэпидемические мероприятия (совершенствование схем вакцинации, генодиагностика и дифференциация эпидемических штаммов микроорганизмов бактериальной и вирусной природы) способствовали улучшению эпидемической обстановки в стране.

С 1986 г. по 1995 г. деятельностью института руководил директор П. Г. Рытик. В этот период изучались эпидемиология и иммунопатогенез ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов А, В, С, ротавирусной инфекции, проводился поиск антивирусных препаратов. Разработаны методы комплексной лабораторной дифференциальной клинической диагностики и лечения герпетической, хламидийной инфекций. Под руководством П. Г. Рытика проводились исследования по моделированию ВИЧ-инфекции на лабораторных животных.

В 1995 г. директором института назначен профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Л. П. Титов. Деятельность института была реорганизована и направлена на решение актуальных проблем здраво-



Профессор П. Г. Рытик

охранения республики, программно-целевое планирование, развитие инновационных технологий, модернизацию инфраструктуры, лабораторное переоснащение, подготовку специалистов высшей квалификации, налаживание международного научного сотрудничества. Основными направлениями деятельности института были совершенствование национальной системы эпидемиологического надзора за актуальными для страны инфекционными заболеваниями,

решение прикладных вопросов их диагностики, профилактики и лечения; изучение фундаментальных вопросов этиологии, патогенеза и иммуногенеза актуальных инфекционных и иммунных болезней; разработка и внедрение в практику здравоохранения новых технологий в области производства диагностических, профилактических и лечебных препаратов с целью импортозамещения и удовлетворения потребностей в них практических учреждений; совершенствование системы контроля качества противомикробных и иммунобиологических препаратов, дальнейшее развитие системы оказания медицинских услуг населению и учреждениям в области диагностики и лечения инфекционных заболеваний; подготовка научных кадров высшей квалификации и повышение квалификации специалистов практического звена.

С 1996 г. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии является головной организацией-исполнителем ряда ГНТП: «Инфекционные заболевания» (1996—1998 гг., 1999—2000 гг.); «Инфекции и медицинские биотехнологии» (2001—2005 гг.), «Инфекционные заболевания и микробиологические биотехнологии» (2006—2010 гг.). В 2006—2009 гг. в институте создана уникальная материально-техническая база — 2 лабораторных корпуса, один из которых специально спроектирован для обеспечения уровня биобезопасности Р3—Р4. В 2009 г. Приказом Министерства здравоохране-

Член-корреспондент  
НАН Беларуси Л. П. Титов

ния Республики Беларусь № 817 от 24.08.2009 изменено название учреждения на «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

В марте 2010 г. директором РНПЦ эпидемиологии и микробиологии назначен профессор Г. М. Игнатъев. Особое внимание он уделил разработке и внедрению в практику здравоохранения новых технологий в области производства диагностикумов, профилактических и лечебных препаратов; совершенствованию системы контроля качества иммунобиологических препаратов; дальнейшему развитию системы оказания медицинских услуг населению и учреждениям здравоохранения в области диагностики инфекционных заболеваний; развитию и укреплению взаимовыгодного сотрудничества с учеными и научными организациями зарубежья, в первую очередь Российской Федерации.

С декабря 2011 г. РНПЦ эпидемиологии и микробиологии руководит кандидат медицинских наук, доцент В. А. Горбунов. В настоящее время Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь (далее — Центр) является ведущим научно-исследовательским центром страны, где выполняется широкий спектр научно-исследовательских работ фундаментального и прикладного характера в области эпидемиологии, медицинской вирусологии, микробиологии, иммунологии и паразитологии. Специалистами Центра проводятся работы по созданию высокочувствительных и эффективных методов диагностики, лечения и профилактики паразитарных и инфекционных заболеваний; профессиональные консультации по методам исследований и диагностики инфекций, их профилактике; осуществляется разработка и совершенствование системы эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.



Профессор Г. М. Игнатъев



В. А. Горбунов

## 6 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

Центр выполняет 56 научных заданий в рамках 14 программ, а также договорные работы. В рамках выполняющихся научных проектов Центр проводит работу по совершенствованию системы эпиднадзора за актуальными для республики инфекциями. Основными элементами этих исследований являются проведение мониторинга с применением методов молекулярно-биологического анализа, создание на основе современных биотехнологий диагностических, профилактических и лечебных препаратов, широкое внедрение разработок в практику здравоохранения.

**Вакциноуправляемые инфекции.** Центр внес большой вклад в развитие программ эпидемиологического надзора за вакциноуправляемыми инфекциями и совершенствование стратегии иммунопрофилактики. Родоначальницей современной лаборатории вакцинопрофилактики является лаборатория по диагностике полиомиелита, которая была создана в 50-е годы XX столетия. Создателем и руководителем ее на протяжении более 3 десятилетий являлась известный ученый доктор медицинских наук, профессор Э. В. Фельдман.

Уже в начале 60-х годов были разработаны и внедрены в практику здравоохранения страны основные элементы эпидемиологического надзора за полиомиелитом, которые не потеряли актуальность и до настоящего времени. Опыт, накопленный в области вакцинопрофилактики полиомиелита, был в дальнейшем использован в отношении кори.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению закономерностей эпидемического процесса инфекций, управляемых средствами специфической профилактики (полиомиелит, корь, краснуха, эпидемический паротит, дифтерия, столбняк, коклюш и др.), осуществлению молекулярно-эпидемиологического мониторинга циркуляции возбудителей этих инфекций с определением их происхождения (местные или завозные), оценке состояния популяционного иммунитета с целью совершенствования эпидемиологического надзора и внедрения программ надзора за этими инфекциями в работу практического здравоохранения (Е. О. Самойлович, В. Л. Колодкина, М. А. Ермолович, Е. Ю. Свирчевская, Г. В. Семейко, В. П. Шиманович).

На базе лаборатории вакциноуправляемых инфекций организована работа центров, входящих в состав лабораторной сети ВОЗ: национального референс-центра по полиомиелиту (с 1997 г.) и республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (с 2002 г.).

**Грипп.** В силу своей социально-экономической значимости проблема гриппа всегда находилась в зоне интересов Центра. Исследования проводились по следующим основным направлениям, обеспечивающим эпидемиологический надзор: лабораторный контроль циркуляции вирусов гриппа на территории Республики Беларусь (О. Т. Андреева, В. З. Солоухин, Н. В. Грибкова); поиск противогриппозных препаратов (В. И. Вотяков, В. А. Русяев, Е. И. Бореко, Н. В. Грибкова); экология гриппа (В. З. Солоухин, В. И. Вотяков, С. В. Хлюстов); разработка нормативно-правовой документации (Н. В. Грибкова, А. К. Кожемякин). В результате проводимых исследований выделены эпидемические штаммы вирусов гриппа, по-

полнившие коллекцию вирусов, разработан противогриппозный препарат «Дейтифорин», получены аргументы в пользу антропозоонозной гипотезы происхождения гриппа, разработаны и внедрены инструкции по лабораторной диагностике гриппа. Действующая в стране система эпидемиологического надзора за гриппом позволяет выявить на ранних стадиях распространения не только новые штаммы вирусов гриппа, как, например, в пандемию 2009 г., но и отслеживать появление потенциальных пандемических штаммов (A/H5N1, A/H7N9) и других возбудителей тяжелых острых респираторных инфекций (SARS, MERS-CoV). Результаты лабораторного и эпидемиологического мониторинга гриппа в стране регулярно вводятся в Глобальную сеть ВОЗ наблюдения за гриппом.

**ВИЧ-инфекция.** Проблемой ВИЧ-инфекции в Центре занимаются с ноября 1986 г., когда была организована группа, затем первая в Республике Беларусь лаборатория по диагностике ВИЧ (руководители кандидат медицинских наук И. Н. Войнов, доктор медицинских наук Н. Д. Коломиец). В 1989 г. сотрудники института (доктор медицинских наук В. Ф. Ерёмин и др.) впервые в бывшем СССР выделили вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) из лимфоцитов периферической крови пациентки, проживающей в Беларуси.

В настоящее время в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии функционирует лаборатория диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций (руководитель В. Ф. Ерёмин). На базе лаборатории создана «Республиканская референс-лаборатория генодиагностики ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов В и С», которая осуществляет референс-исследования и постоянный молекулярно-генетический мониторинг развития ВИЧ-инфекции на территории Республики Беларусь, расшифровывает вспышечные, умышленные случаи заражения ВИЧ-1, определяет мутации резистентности вируса у пациентов, находящихся на высокоактивной антиретровирусной терапии, осуществляет скрининг новых препаратов, обладающих анти-ВИЧ активностью. В лаборатории проводятся уникальные исследования по молекулярно-эпидемиологическому мониторингу за циркуляцией разных генотипов/подгенотипов вирусов гепатитов В и С. Сотрудниками лаборатории налажены исследования по определению генотипов/подтипов вируса гепатита В, а также мутаций резистентности по участку гена Р и по HBsAg, имеющих критическое значение при проведении терапии и диагностике гепатита В.

В 2011 г. сотрудники лаборатории впервые в мире описали новую уникальную рекомбинантную форму ВИЧ-1. В лаборатории разрабатываются диагностические препараты ПЦР, иммунный блоттинг, контрольные панели сывороток и антигена ВИЧ.

**Природно-очаговые и особо опасные инфекции.** В Центре проводится постоянный контроль актуальных для страны природно-очаговых инфекций — Лайм-боррелиоза, клещевого энцефалита, лихорадки Западного Нила, геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), бешенства и др. В природных очагах проводятся молекулярно-генетические, бактериологические и вирусологические исследова-

ния возбудителей, их типирование и оценка потенциальной эпидемиологической опасности; серологические исследования иммунитета у населения; определяется бактериофорность и вирусофорность переносчиков. В разные годы эти исследования проводились под руководством И. Н. Воинова, В. С. Борткевича, Т. И. Самойловой, Н. П. Мишаевой, А. С. Владыко.

Выявлена циркуляция на территории страны возбудителей отнесительно малоизученных инфекций и случаи заражения ими — гранулоцитарный анаплазмоз человека, риккетсиозы (возбудители пятнистых лихорадок). Сотрудники центра поддерживают постоянную готовность к проведению мероприятий по контролю завоза на территорию страны опасных и особо опасных инфекций. Разработаны современные молекулярно-генетические и серологические тест-системы для комплексной экспресс-диагностики возбудителей лихорадки Ласса, Эбола, Марбург, Денге, ГЛПС и др.; проводятся исследования в области разработки средств профилактики и лечения этих инфекций. Большой вклад в развитие эпидемиологии и диагностики особо опасных инфекций внесли сотрудники Ф. М. Фидаров, Л. М. Рустамова, Е. П. Счеслёнок, Н. М. Трофимов, Л. Е. Сурикова и др.

**Инфекции, передаваемые с водой и пищевыми продуктами.** Одним из актуальных направлений исследований, связанных с изучением роли окружающей среды как фактора передачи ряда социально значимых и массовых вирусных инфекций (прежде всего кишечных), является санитарная вирусология воды и пищевых продуктов. Данное направление возникло на стыке двух научных дисциплин — вирусологии и гигиены в середине 90-х годов прошлого столетия и активно развивается под руководством профессора Т. В. Амвросьевой. Главным итогом этой деятельности явилось создание национальных систем молекулярно-эпидемиологического контроля за актуальными для нашей страны энтеро- и норовирусной инфекциями, которые в настоящее время успешно применяются в отечественных практических лабораториях и позволяют оперативно устанавливать этиологию, пути и факторы передачи возникающей заболеваемости, в том числе групповой и вспышечной.

Наметившаяся с конца прошлого столетия эпидемиологическая ситуация, характеризующаяся активизацией энтеровирусных и других кишечных вирусных инфекций в мире и нашей стране, потребовала оперативной разработки и внедрения в практику современных технологий и средств для улавливания и индикации вирусных агентов в воде и пищевых продуктах. Такие технологии, а затем и соответствующие санитарно-вирусологические изделия начали разрабатываться в 1997 г. За прошедшие почти 2 десятилетия создано несколько линейек санитарно-вирусологических наборов и диагностических тест-систем (более 15), налажен их серийный выпуск, полностью покрывающий запросы практического здравоохранения страны. Большинство из них не имеет зарубежных аналогов и успешно экспортируется. В рамках осуществляемого научно-методического сопровождения эпиднадзора за инфекционной заболеваемостью разработано и внедрено более 20 инструкторных и методических документов, что позво-

ляет решать актуальные проблемы отечественного здравоохранения в области контроля за вирусными инфекциями с природным резервуаром (Т. В. Амвросьева, Н. В. Поклонская, О. Н. Казинец, З. Ф. Богуш, О. В. Дьяконова, К. Л. Дедюля, А. А. Безручко, С. В. Орлова, Л. Н. Барановская, В. М. Курганович, П. И. Гринкевич, А. Н. Хило, Е. П. Кишкурно и др.).

**Научные исследования в области бактериологии и иммунологии.** Впервые в республике осуществлены масштабные исследования по изучению внутрибольничных инфекций (ВБИ): спектра циркулирующих микроорганизмов — возбудителей гнойно-септических, инфекционно-воспалительных и кишечных заболеваний, спектра резистентности микроорганизмов к противомикробным препаратам и антисептикам, генетических механизмов формирования устойчивости, потребления антибактериальных препаратов лечебными учреждениями (Л. П. Титов, В. А. Горбунов, Т. С. Ермакова, В. В. Слипень, Н. В. Лебедева, Е. Ф. Паньшина, Е. И. Гудкова, А. М. Дронина, Е. Г. Блыга, В. В. Слипень, Е. С. Носова, В. В. Маркевич, О. О. Янович, Л. Д. Газиумарова, С. З. Бостанабад, М. Сэтарэ, С. Э. Глазкова, Т. Н. Бакаева, И. А. Гаврилова, Ф. А. Лебедев, В. А. Давыдов). Разработаны и внедрены методы генотипирования геноносителей резистентности. На основе современных иммунологических, молекулярно-биологических, генно-инженерных, клеточных технологий разрабатываются средства диагностики и лечения нового поколения.

Исследования в области иммунологии направлены на изучение иммунного статуса, аллергических и онкозаболеваний, хронических инфекций и кожных заболеваний, а также на разработку методов и средств иммунодиагностики, иммунотерапии и иммунопрофилактики.

На базе лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии (руководитель — А. Е. Гончаров) создан криобанк культур клеток человека и животных, который постоянно пополняется и в настоящее время насчитывает 51 линию клеток. Зарегистрирован информационный ресурс «Белорусская коллекция культур клеток человека и животных».

**Сочетанные бактериально-вирусные инфекции.** В лаборатории сочетанных бактериально-вирусных инфекций (в 1983—2013 гг. руководитель — Н. Н. Полещук, с 2013 г. — Л. В. Рубаник) созданы новые и усовершенствованы существующие методы диагностики и мониторинга широкого круга заболеваний урогенитального тракта, костно-суставной и нервной систем. В этом контексте большое внимание уделено исследованиям с использованием как классических вирусологических и микробиологических, так и высокотехнологичных электронно-микроскопических и нанотехнологических методов по выявлению полиморфных нарушений в субклеточных органеллах при ассоциативных бактериально-вирусных инфекциях (хламидийная, трихомонадная, герпетическая, цитомегаловирусная и др.).

Усовершенствована тактика поэтапного микробиологического обследования и лечения пациентов с суставной патологией (реактивный артрит, ревматоидный артрит и др.), которая позволяет установить

этиологическую причину заболевания и предотвратить инвалидизацию лиц трудоспособного возраста.

В лаборатории разработаны экспериментальные модели прионных инфекций (скрепи, болезнь Крейтцфельдта—Якоба) на культурах нейроглиальных клеток и лабораторных животных. Изучен характер и степень выраженности ультраструктурных нарушений в ЦНС при скрепи и болезни Крейтцфельдта—Якоба на разных стадиях инфекции.

**Инновационная биотехнология, разработка и производство диагностических препаратов новых поколений.** В Центре сложилась и эффективно действует система мероприятий, направленных на внедрение результатов научных исследований и разработок в практическое здравоохранение. Получаемое в результате исследований новое знание фундаментального или прикладного характера является основой для разработки новых высокоэффективных способов контроля, диагностики и лечения инфекционных заболеваний, современных технологий создания диагностических и профилактических иммунобиологических препаратов. В течение последних 15 лет разработаны и внедрены в практику здравоохранения страны более 60 отечественных диагностических препаратов, что позволяет обеспечивать импортозамещение и валютосбережение.

**Внебюджетная деятельность центра, оказание платных медицинских услуг.** С 01.01.2014 в учреждении создан научно-производственный отдел (руководитель — А. С. Виринская), который осуществляет различные виды внебюджетной деятельности: научно-исследовательскую и опытно-конструкторскую работу, инновационное производство изделий медицинского назначения, платные медицинские услуги, экспорт услуг, экспертную деятельность.

В Центре оказываются платные медицинские услуги населению (юридическим и физическим лицам) по лабораторной диагностике вирусных, бактериальных и паразитарных заболеваний, а также проводятся иммунологические исследования.

**Контроль качества иммунобиологических лекарственных средств.** Лаборатория контроля качества иммунобиологических лекарственных средств (ИЛС) создана по инициативе Министерства здравоохранения Республики Беларусь как самостоятельное подразделение в структуре РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в 2010 г. (руководитель — Н. Н. Капитулец).

Целью лаборатории является проведение государственной политики обеспечения качества ИЛС и предотвращение поступления на внутренний рынок страны некачественной лекарственной продукции.

Лаборатория аккредитована в Системе аккредитации Республики Беларусь на соответствие требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025. В настоящее время участвует в программе ВОЗ «Международная аккредитация лабораторий для испытания продукции медицинского назначения и поддержка здравоохранения в Беларуси (BELMED)» (номер CRIS: ENPI/2013/024-679) для осуществления интеграции управления фармацевтическим качеством Республики Беларусь в общеевропейскую систему управления качеством лекарственных средств.

**Подготовка научных кадров.** Одним из приоритетных направлений деятельности Центра является

подготовка научных кадров. Здесь открыта аспирантура по специальностям «Вирусология», «Микробиология», «Инфекционные болезни», «Клиническая иммунология, аллергология», «Эпидемиология».

В Центре подготовлено 11 докторов и 26 кандидатов наук из числа ныне работающих научных сотрудников. При нем функционирует докторский совет по защите диссертаций Д 03.02.01. Защита разрешена по специальностям: 03.02.02 «Вирусология» (медицинские, биологические науки) и 14.02.02 «Эпидемиология» (медицинские науки). Председатель совета — профессор Н. Н. Полещук.

Многие сотрудники за хорошие результаты работы в области профилактики и диагностики инфекционных заболеваний отмечены высокими званиями и наградами. Так, знаком «Отличник здравоохранения Республики Беларусь» награждены 26 сотрудников, Почетными грамотами Министерства здравоохранения Республики Беларусь — 35 сотрудников Центра.

Главная задача учреждения — обеспечить опережающее развитие медицинской эпидемиологии, микробиологии, иммунологии, биотехнологии и реализацию актуальных для инфекционной патологии республики направлений по защите населения с учетом глобальных тенденций в развитии инфекционного процесса на мировом уровне.

Работа Центра направлена на совершенствование национальной системы эпидемиологического надзора, внедрение новых подходов оперативной оценки эпидемиологической ситуации, локальных и глобальных факторов риска, разработку эффективных методов локализации вспышек, сдерживание роста и снижение уровня эпидемической заболеваемости, разработку отечественных диагностических и профилактических препаратов, химиопрепаратов и иммуномодуляторов, коррекцию программ подготовки специалистов. Особую роль в решении этих задач практического здравоохранения должно сыграть внедрение высоких, наукоемких технологий, таких как молекулярная эпидемиология, геномная инженерия, структурная и функциональная геномика и протеомика, рекомбинантные биотехнологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Титов Л. П., Вотяков В. И., Андреева О. Т. // *Инфекция и иммунитет: Материалы респ. науч.-практ. конф., посвящая 75-летию БелНИИЭМ.*— Минск, 1999.— С. 3—32.

2. Титов Л. П., Вотяков В. И., Андреева О. Т. // *Проблемы инфекционной патологии XXI века: Материалы юбилейной конф., посвящая 80-летию НИИЭМ.*— Минск, 2004.— С. 3—38.

Поступила 28.07.14.

## REPUBLICAN SCIENTIFIC AND PRACTICAL CENTER OF EPIDEMIOLOGY AND MICROBIOLOGY IS 90 (1924—2014)

L. P. Titov, V. A. Gorbunov

*The history of the Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Public Health of the Republic of Belarus is described. Key words: history of development, Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology.*

### Адрес для корреспонденции:

Титов Леонид Петрович.  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.  
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 237-69-98.

Т. В. АМВРОСЬЕВА, К. Л. ДЕДЮЛЯ,  
Н. В. ПОКЛОНСКАЯ, З. Ф. БОГУШ

## ПОЛИОМАВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ЧЕЛОВЕКА: ЗНАЧЕНИЕ В ПАТОЛОГИИ И ГЕНОДИАГНОСТИКА

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

Статья посвящена малоизвестной и недостаточно изученной полиомавирусной инфекции (ПВИ) человека. Изложены накопленные мировой наукой данные о ее возбудителях и их роли в формировании соматической патологии. Представлены результаты впервые проведенных в Республике Беларусь пилотных исследований по разработке технологии дифференциальной генодиагностики ПВИ методом ПЦР в режиме реального времени с ее апробацией на клиническом материале реципиентов почки и гемопоэтических стволовых клеток. Получены новые научные знания об этиологической роли полиомавируса JC в развитии геморрагического цистита и нефропатии.

**Ключевые слова:** ПЦР, полиомавирусы, лабораторная диагностика, нефропатия.

Полиомавирусная инфекция (ПВИ) человека относится к малоизвестным и недостаточно изученным вирусным заболеваниям. Ее возбудителями являются полиомавирусы (ПВ), относящиеся к единственному роду *Polyomavirus* семейства *Polyomaviridae*. Геном представлен кольцевой двухцепочечной ДНК длиной около 5000 пар оснований. Относительно небольшие вирионы икосаэдрической формы не покрыты липидной оболочкой и имеют диаметр 40—50 нм. ПВ часто находятся в организме человека в латентном состоянии и не вызывают болезнь, но могут индуцировать опухоли в организмах других видов либо в случае иммунного дефицита хозяина (полиома — способность вызывать множественные опухоли).

В настоящее время имеется достоверная информация о 6 ПВ, поражающих людей. Наиболее изучены 4 из них — вирус ВК, вирус JC (их названия соответствуют инициалам пациентов, у которых они были обнаружены в 1971 г.), вирус KI и вирус WU (их названия являются аббревиатурами научных учреждений, в которых были открыты в 2007 г., — Karolinska Institute и Washington University соответственно) [1, 2]. В 2008 г. описан ПВ клеток Меркеля, вызывающий рак кожи Меркеля, — вирус MC [3], а в августе 2010 г. — ПВ, вызывающий триходисплазию (от англ. *trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*) [4]. В последние годы появилась информация об открытии новых ПВ, к которым относят более 10 возбудителей.

ПВ широко распространены в человеческой популяции, антитела к ним присутствуют более чем у 80% взрослого населения. После первичного полиомавирусного инфицирования у человека развивается пожизненная персистентная инфекция, которая не представляет серьезной угрозы для здорового организма. Однако у пациентов с иммунодефицитом она мо-

жет стать причиной тяжелых, угрожающих жизни заболеваний — геморрагического цистита, нефропатии, а в отдельных случаях — менингитов, менингоэнцефалитов, прогрессивной мультифокальной энцефалопатии и карциномы клеток Меркеля [5, 6]. Вследствие того что тропизм ПВ направлен преимущественно на эпителий мочевыводящих путей, именно патологии мочевыводящей системы являются наиболее частыми клиническими проявлениями ПВИ. К их числу относят асимптоматическую гематурию, геморрагический цистит, уретральный стеноз и интерстициальный нефрит [7—10].

Наиболее изученным в плане вызываемой патологии является вирус ВК. Он широко распространен в человеческой популяции: 90% детей и взрослых ВК-серопозитивны [5]. Первичная инфекция протекает субклинически или сопровождается слабыми респираторными проявлениями [6, 7], после чего вирус распространяется по организму и устанавливается персистентная инфекция, которая сохраняется в организме в течение длительного времени. Основной мишенью персистентной вирусной инфекции ВК являются клетки почек и мочевыводящих путей [6]. Ее реактивация, сопровождающаяся виремией, наблюдается у 5—10% здоровых людей, в том числе у беременных и у 20—60% пациентов с иммунодефицитом [6—10]. Тяжелые патологии, иногда с фатальным исходом, вирусы ВК вызывают у пациентов на фоне лекарственного подавления иммунитета: у реципиентов почек, костного мозга, лиц с онкологическими заболеваниями, пациентов со СПИДом. В данных условиях происходит реактивация вирусной инфекции ВК с вирурией и виремией, которая клинически проявляется в виде геморрагического цистита, а после трансплантации почки — в виде полиомавирус-ассоциированной нефропатии (ПВАН). Иногда встречаются тяжелые неврологические осложнения, заканчивающиеся острым энцефалитом [11—12]. ВК-вирурия регистрируется у 50% реципиентов гемопоэтических стволовых клеток (костного мозга) в течение первых 2 мес после трансплантации [7—12]. ВК-вирусный геморрагический цистит является наиболее частым осложнением в посттрансплантационный период (диагностируется у 10—25% реципиентов) и считается серьезной причиной заболеваемости и смертности этой категории пациентов [7—12].

Другим не менее значимым возбудителем ПВИ у пациентов с иммунодефицитом может быть вирус JC, который также обладает высокой тропностью к клеткам мочевыводящих путей. Однако сведения о его значении в патологии пока весьма ограничены. Вместе с тем достоверно установлена способность этого вирусного патогена избирательно разрушать миелин-продуцирующие глиальные клетки — олигодендроциты. Потеря этих клеток приводит к очаговой и впоследствии — конглоуэнтной демиелинизации ЦНС, называемой мультифокальной лейкоэнцефалопатией, которая является быстро прогрессирующим заболеванием и оказывается фатальной для 90% больных в течение 1 года после появления симптомов [13].

Исходя из вышеизложенного, ПВИ относится к числу весьма социально значимых и серьезных по своим соматическим последствиям заболеваний, жертвами которых являются пациенты, страдающие иммунодефицитом и потому нуждающиеся в особом внимании при обследовании и назначении лечения. В этих условиях особую актуальность приобретает лабораторная диагностика данной инфекции, направленная на оперативное выявление возбудителя и определение индивидуальной количественной оценки вирусной нагрузки с целью выработки адекватных подходов и обоснованной тактики ее этиотропной терапии. К числу специфических средств такой терапии, применяемых в последние годы, относятся цидофовир, видарабин, рибавирин, лефлунамид. Описан также положительный эффект лечения JC-вирусного цистита респеридоном. Некоторые зарубежные специалисты рекомендуют применение антибиотиков из группы фторхинолонов в качестве возможных средств профилактики инфекции [14—20]. Кроме того, одним из известных подходов к снижению полиомавирусной нагрузки у пациентов с ПВИ на фоне иммунодефицита является коррекция иммуносупрессивной терапии (уменьшение доз, изменение спектра применяемых средств и т. д.).

Несмотря на высокую актуальность ПВИ для практической медицины и имеющиеся возможности ее этиотропного лечения и профилактики развития тяжелых клинических форм, научные исследования по данной проблеме в Республике Беларусь до недавних пор не проводились. Какая-либо информация о ее распространенности, клинических проявлениях и циркулирующих возбудителях отсутствовала. Основной причиной этого является несовершенство и отсталость необходимой для лабораторной диагностики ПВИ методической базы, а также доступных диагностических средств. Следует отметить, что в развитых странах лабораторная диагностика ПВИ, золотым стандартом которой является вначале качественная, а затем количественная ПЦР в режиме реального времени, является обязательной при обследовании реципиентов органов и клеток, а также других пациентов из групп риска, получающих иммуносупрессивную терапию: лиц с онкологическими заболеваниями, пациентов с аутоиммунными расстройствами, ВИЧ-инфицированных и др. К сожалению, в настоящее время в связи с чрезвычайно высокой стоимостью импортных тест-систем подобные диагностические тесты остаются малодоступными для широкого использования в Республике Беларусь. В этих условиях особую актуальность для нашей страны приобретают исследования по разработке и адаптации эффективных способов дифференциальной молекулярно-генетической диагностики ПВИ с целью создания соответствующих отечественных диагностических тест-систем.

Настоящая работа посвящена разработке современных технологий молекулярной индикации и дифференциации наиболее распространенных возбудителей ПВИ (вирусов ВК и JC) на основе использова-

ния количественной ПЦР в режиме реального времени, а также их клинической апробации при обследовании реципиентов почки и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК).

### Материал и методы

Исследовали 2 образца крови и 41 образец мочи от 41 пациента с клиническими признаками ПВИ (ВК-вирусассоциированная нефропатия, геморрагический цистит). Клинический материал был получен из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе 9-й городской клинической больницы, отделения пересадки костного мозга 9-й городской клинической больницы, РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии.

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили транспортной средой для проб клинического материала в соотношении 1:1 («Амплисенс», Россия). Образцы цельной крови инкубировали 1 ч при 37°C, затем центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин, после чего отбирали сыворотку.

Для выделения вирусных нуклеиновых кислот из образцов сывороток крови и мочи применяли коммерческие наборы «РИБОпреп» («Амплисенс», Россия).

Детекцию ПВ, вирусов ВК и JC осуществляли с помощью ПЦР в реальном времени. Использовали Taq-полимеразу, 10× реакционный буфер и раствор MgCl<sub>2</sub> («PrimeTech», Беларусь), смесь дезоксинуклеотидов («Fermentas», Литва). Амплификацию проводили с применением разработанных нами (PMVuni+, PMVuni-, PMVp) и взятых из литературных источников (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp) [21] праймеров и зондов, синтезированных фирмой «Sintol» (Россия).

Постановку ПЦР в реальном времени осуществляли на амплификаторах Rotor Gene 3000 и 6000 («Corbett Life Sciences», Австралия) и CFX 96 Real-Time System («Bio-Rad», США).

### Результаты и обсуждение

Для разработки комплекта праймеров, специфичного ко всем представителям рода *Polyomavirus*, провели анализ множественного выравнивания 25 нуклеотидных последовательностей при помощи специального программного обеспечения (MEGA 6). Выбрали наиболее консервативные участки генома ПВ, к которым и был разработан набор родоспецифичных праймеров. Разработанный комплект праймеров и гибридационного зонда (PMVuni+, PMVuni-, PMVp) (табл. 1) использовали далее в качестве универсального для выявления всех ПВ. Для дифференциации наиболее распространенных возбудителей ПВИ разработали другой комплект праймеров и зондов (дифференциальный), который включал универсальные праймеры (PM2+, PM2-) и 2 специфических зонда (BKVp, JCVp), предназначенных для детекции вирусов ВК и JC соответственно [21].

Дальнейшую апробацию разработанных комплектов проводили на 2 выборках проб клинического материала, взятого от пациентов с клиническими признаками ПВИ (ВК-вирусассоциированная нефропатия,

Таблица 1

### Схема универсального комплекта праймеров и зонда, разработанных для генодиагностики ПВИ

Наименование олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность	Ориентация, метка	Регион генома
PMVuni+	TGAAGACAGTGTAGACGGGAAA	Прямой	Большой Т-антиген
PMVuni-	GCAGCAGCAGCCTCAGA	Обратный	--/--
PMVp	CTWGCACCTTTTGGGGACCTAGTTGC	Зонд, FAM	--/--

геморрагический цистит и др.). В 1-ю группу вошли 18 проб (16 образцов мочи и 2 образца крови от 16 пациентов), взятых у лиц с лабораторно подтвержденной вирусной инфекцией ВК (в них ранее была обнаружена ДНК вируса ВК). Вторая группа состояла из 25 образцов клинического материала (25 образцов мочи от 25 пациентов) от лиц с подозрением на ПВИ, но отрицательных на наличие ДНК вируса ВК.

В процессе отработки технологии постановки ПЦР подобрали оптимальный состав реакционной смеси (10× буфер для Таq-полимеразы, содержащий 6 ммоль  $MgCl_2$ , смесь дезоксинуклеотидов 200 мкмоль, 2,5 ед. Таq-полимеразы, по 10 пмоль прямого и обратного праймеров, 5 пмоль гибридационного зонда), а также температурный профиль реакции (45 циклов денатурации при 95°C в течение 15 с, отжиг-элонгация при 55°C в течение 40 с).

Исследование 1-й группы проб при помощи универсального комплекта праймеров и зонда показало наличие генетического материала ПВ во всех образцах клинического материала (табл. 2). Значения порогового цикла ( $C_t$ ) не превышали 35-й цикл.

Исследование тех же проб с использованием дифференциального комплекта праймеров и зондов, помимо 100% идентификации вируса ВК, позволило выявить вирус JC в 3 из 18 исследованных проб (16,7%) (рис. 1).

По результатам исследования 2-й выборки проб клинического материала, отрицательных на наличие ДНК вируса ВК, при использовании комплекта для универсальной генодиагностики ПВИ в 12 (48,0%) образцах мочи детектирована ДНК ПВ (на данном этапе исследований учитывались все образцы со значением  $C_t \leq 40$ , рис. 2).

При этом в 9 (75,0%) из 12 позитивных образцов при типировании вирусов ВК и JC (с помощью дифференциального комплекта праймеров и зондов) была выявлена ДНК вируса JC, а в 3 (25,0%) образцах результаты были отрицательными как в отношении ви-

руса ВК, так и JC, что может указывать на присутствие в исследуемом клиническом материале нуклеиновой кислоты других представителей рода *Polyomavirus* (см. рис. 2, рис. 3).

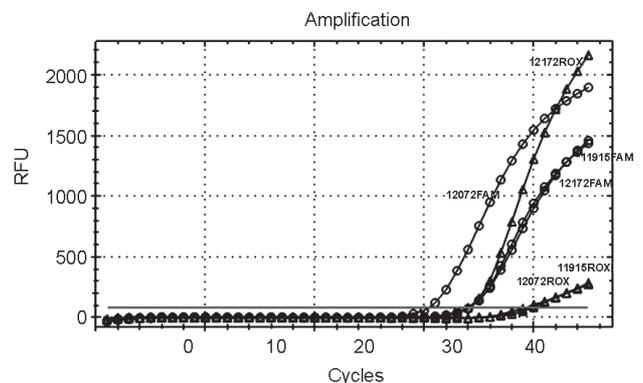


Рис. 1. Результаты исследования проб мочи с помощью ПЦР в реальном времени с использованием дифференциального комплекта праймеров и зондов (для типирования вирусов ВК и JC)

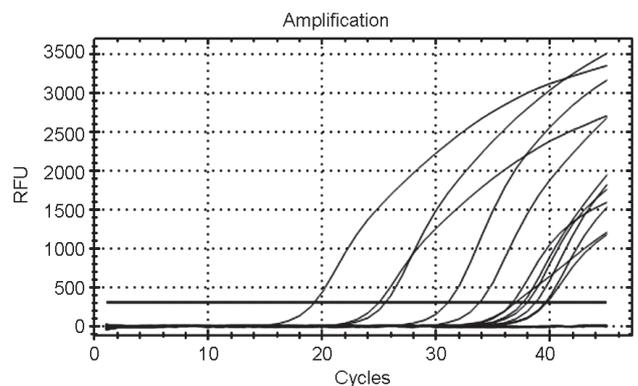


Рис. 2. Результаты исследования отрицательных на вирус ВК проб мочи с использованием универсального комплекта праймеров и зонда

Таблица 2

### Апробация подобранных комплектов праймеров и зондов для диагностики ПВИ и идентификации вирусов ВК и JC в клиническом материале пациентов

Вид клинического материала (по результатам исследования на вирус ВК)	Кол-во образцов	Результаты ПЦР с использованием универсального комплекта праймеров и зонда (PMVuni+, PMVuni-, PMVp)		Результаты ПЦР с использованием дифференциального комплекта праймеров и зондов (PM2+, PM2-, BKVp, JCVp)	
		ДНК ПВ		ДНК вируса ВК	ДНК вируса JC
Вирус ВК «+»	18	18	18	3	
Вирус ВК «-»	25	12	0	9	

## 12 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

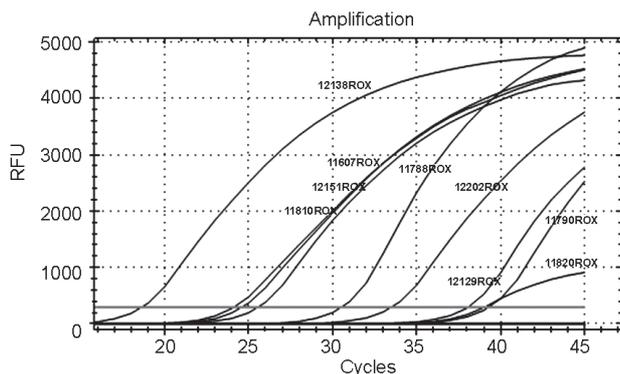


Рис. 3. Результаты дифференциального типирования вирусов ВК и JC в позитивных пробах мочи

В целом при использовании разработанного универсального комплекта праймеров и зонда генетические маркеры ПВИ в клиническом материале 43 пациентов с лабораторно подтвержденной вирусной инфекцией ВК и с подозрением на ПВИ были выявлены в 30 (69,8%) случаях. С помощью комплекта праймеров и зондов для дифференциальной генодиагностики ДНК вируса ВК определялась в 15 (34,9%) пробах, ДНК вируса JC — в 9 (20,9%). В 3 (7,0%) пробах была детектирована ДНК вируса JC+ДНК вируса ВК и в таком же количестве — ДНК других ПВ (рис. 4). Следует отметить, что при ПЦР-диагностике этого же клинического материала только в отношении вируса ВК уровень позитивных проб составлял 41,9%. Таким образом, результативность исследований клинического материала при использовании разработанного универсального комплекта праймеров и зонда увеличилась примерно в 1,7 раза.

На основе полученного опыта ПЦР-диагностики клинического материала пациентов с подозрением на ПВИ с учетом имеющихся литературных данных по этой проблеме разработали алгоритм лабораторной генодиагностики данной инфекции. Он включает 3 этапа, на каждом из которых используется свой

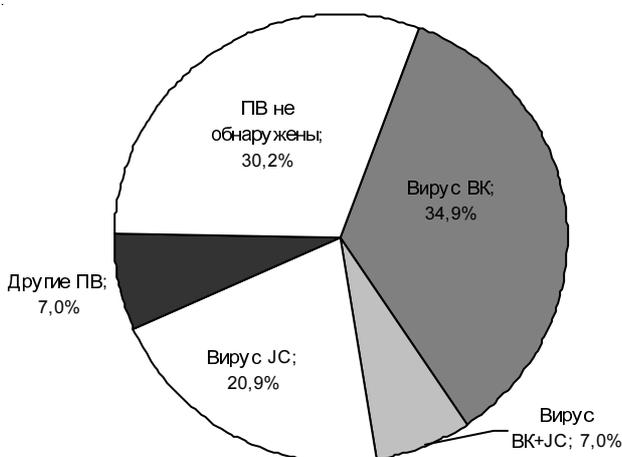


Рис. 4. Результаты детекции ПВ в клиническом материале пациентов с лабораторно подтвержденной ВК-вирусной инфекцией и подозрением на ПВИ

комплекс методов и диагностических маркеров, а также применяются различные подходы к интерпретации полученных результатов (рис. 5). Первый этап генодиагностики ПВИ представляет собой скрининг возбудителей ПВ с частотой 1 раз в полгода. Он осуществляется методом качественной ПЦР, клиническим материалом служит моча. Получение положительного результата при исследовании мочи является основанием для осуществления мониторинга вирусемии ПВ (выявление ПВ в сыворотке крови) с использованием качественной ПЦР. При отсутствии вирусемии продолжается мониторинг ПВ в моче 1 раз в полгода. Установление вирусемии является основанием для исследования сыворотки крови методом количественной ПЦР с целью определения вирусной нагрузки, от показателей которой зависит периодичность дальнейшего мониторинга вирусемии ПВ. Наличие вирусной нагрузки в сыворотке крови более 10 000 копий/мл служит показанием для коррекции иммуносупрессивной терапии и назначения противовирусных средств. При назначении пациенту специфической антивирусной терапии результаты мониторинга вирусной нагрузки используются для оценки ее эффективности.

Уменьшение уровня вирусной нагрузки на 90% и более через 10 нед после начала антивирусной терапии свидетельствует о ее хорошей эффективности. Снижение уровня вирусной нагрузки на 30% и менее, по сравнению с таковой до начала антивирусной терапии, указывает на ее неэффективность и требует изменения схемы применения антивирусных или иммуносупрессивных средств.

Таким образом, представленные в настоящей работе данные являются результатом впервые проведенных в Республике Беларусь пилотных исследований по разработке современных технологий генодиагностики ПВИ — малоизученного, но серьезного по своим клиническим последствиям инфекционного заболевания. Созданные ПЦР-технологии, позволяющие осуществлять дифференциацию ее возбудителей, а также разработанный алгоритм генодиагностических исследований, регламентирующий виды анализируемого клинического материала, порядок и методы анализа с оценкой и интерпретацией полученных данных, имеют исключительно важное значение для клинической медицины. Это касается не только совершенствования и повышения качества и уровня диагностики оппортунистических вирусных инфекций у пациентов с иммунодефицитом, расширением их детектируемого спектра, но и получения реальной возможности оценить эффективность применяемого лечения и повлиять на ход развившегося инфекционного процесса путем своевременной коррекции используемых схем и средств терапии. Полученные в ходе исследований новые научные знания об этиологической роли вируса JC в развитии геморрагического цистита и нефропатии дополняют накопленные мировой наукой данные о вкладе ПВИ в формирование почечной патологии на фоне лекарственной иммуносупрессии.

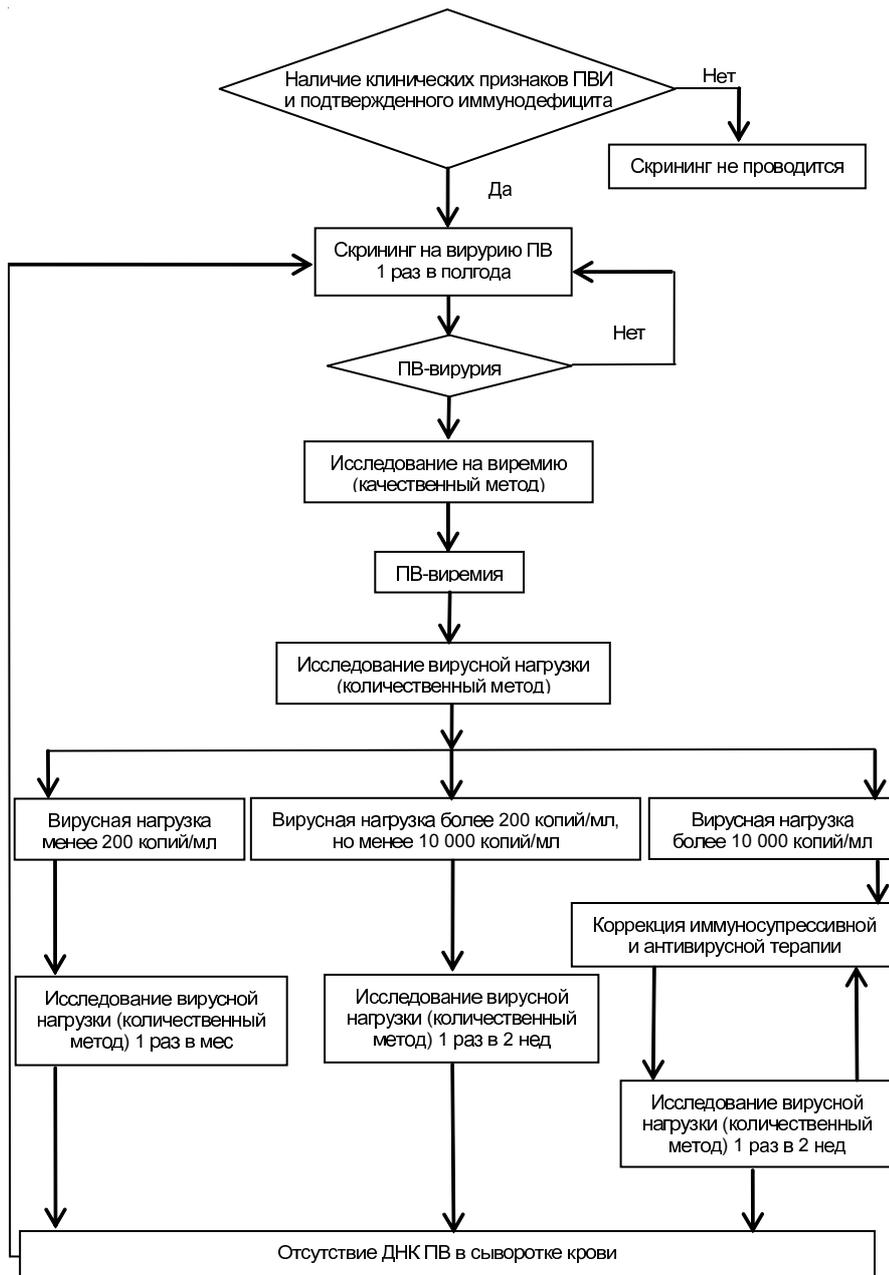


Рис. 5. Алгоритм лабораторной диагностики ПВИ

## ЛИТЕРАТУРА

1. Allander T., Andreasson K., Gupta S., et al. // *J. Virol.*— 2007.— Vol. 81, № 8.— P. 4130—4136.
2. Gaynor A. M., Nissen M. D., Whiley D. M., et al. // *PLoS Pathogens.*— 2007.— Vol. 3, № 5.— P. 64.
3. Feng H., Shuda M., Chang Y., et al. // *Science.*— 2008.— Vol. 319, № 5866.— P. 1096—1100.
4. Van der Meijden E., Janssens R. W. A., Lauber C., et al. // *PLoS Pathogens.*— 2010.— Vol. 6, № 7.— P. e1001024.
5. Knowles W. A., Pipkin P., Andrews N., et al. // *J. Med. Virol.*— 2003.— Vol. 71.— P. 115—123.
6. Hirsch H. H., Steiger J. // *Lancet Infect. Dis.*— 2003.— Vol. 3.— P. 611—623.
7. Replöeg M. D., Storch G. A., Clifford D. B. // *Clin. Infect. Dis.*— 2001.— Vol. 33.— P. 191—202.

8. Bedi A., Miller C. B., Hanson J. L., et al. // *J. Clin. Oncol.*— 1995.— Vol. 13.— P. 1103—1109.

9. Azzi A., Cesaro S., Laszlo D., et al. // *J. Clin. Virol.*— 1999.— Vol. 14.— P. 79—86.

10. Leung A. Y. H., Seun C. K. M., Lie A. K. W., et al. // *Blood.*— 2001.— Vol. 98.— P. 1971—1978.

11. Wong S. Y., Chan K.-H., Cheng V. C. C., et al. // *Clin. Infect. Dis.*— 2007.— Vol. 44.— P. 830—837.

12. Bogdanovic G., Priftakis P., Giraud G., et al. // *J. Clin. Microbiol.*— 2004.— Vol. 42.— P. 5394—5396.

13. Easha S., Manleyb K., Gasparovich M. // *Cell. Mol. Life Sci.*— 2006.— Vol. 63.— P. 865—876.

14. De Clercq E., Holy A. // *Nat. Rev. Drug Discov.*— 2005.— Vol. 4.— P. 928—940.

15. Held T. K., Biel S. S., Nitsche A., et al. // *Bone Marrow Transplant.*— 2000.— Vol. 26.— P. 347—350.

16. Savona M. R., Newton D., Frame D., et al. // *Bone Marrow Transplant.*— 2007.— Vol. 39.— P. 783—787.

17. Williams J. W., Javaid B., Kadambi P. V., et al. // *N. Engl. J. Med.*— 2005.— Vol. 352.— P. 1157—1158.

18. Josephson M. A., Gillen M. A., Javaid B., et al. // *Transplantation.*— 2006.— Vol. 81.— P. 704—710.

19. Ferrazzi E., Peracchi M., Biasolo M. A., et al. // *Biochem. Pharmacol.*— 1988.— Vol. 37.— P. 1885—1886.

20. Portolani M., Pietrosevoli P., Cermelli C., et al. // *Antiviral. Res.*— 1988.— Vol. 9.— P. 205—218.

21. Barcena-Panero A., Echevarria J. E., Romero-Gomez M. P., et al. // *Compar. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*— 2012.— Vol. 3, № 2.— P. 173—179.

Поступила 08.07.14.

#### HUMAN POLYOMAVIRUS INFECTION: SIGNIFICANCE IN PATHOLOGY AND GENE DIAGNOSTICS

T. V. Amvrosiyeva, K. L. Dedyulya, N. V. Poklonskaya, Z. F. Bogush

The publication is dedicated to an unpopular and investigated scarcely human polyomavirus infection (PVI). The scientific data about the infection causing pathogens and their role in the somatic pathology accumulated in the world is presented. The outcomes of the first pilot studies performed in the Republic of Belarus for developing a technology of the PVI differential gene diagnostics using the PCR method in the real time regime and its approbation on the kidney and hemopoietic stem cells recipients' clinical material are described. New scientific data about the polyomavirus JC etiologic role in the hemorrhagic cystitis and nephropathy development has been obtained.

**Key words:** CRP, polyomavirus, laboratory diagnostics, nephropathy.

#### Адрес для корреспонденции:

Амвросьева Тамара Васильевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 265-08-97.

Н. Г. АНТОНЕВИЧ, А. Е. ГОНЧАРОВ, В. Л. ЧЕКАН

## ИММУНОСУПРЕССИВНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭКТОМЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

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

*Целью работы явилась оценка иммуносупрессивных свойств культивируемых эктомезенхимальных стволовых клеток обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека. Получены новые данные о способности ЭМСК ОЭ ингибировать митоген-индуцированную пролиферацию Т-клеток CD4+. Показано, что иммуносупрессивный эффект не связан с наличием растворимых факторов, продуцируемых стволовыми клетками, и для реализации иммуносупрессии требуется непосредственный контакт ЭМСК с лимфоцитами. Установлено, что ЭМСК ОЭ характеризуются высокой экспрессией коингибиторных молекул CD273 и CD274 при отсутствии экспрессии молекул CD80 и CD86, что может являться одной из причин проявления иммуносупрессивного эффекта в отношении Т-клеток. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования ЭМСК ОЭ в клеточной терапии заболеваний, связанных с избыточным иммунным ответом.*

**Ключевые слова:** стволовые клетки, обонятельный эпителий, иммуносупрессия.

В настоящее время активно изучаются перспективы применения стволовых клеток различного происхождения и полученных из них клеток-предшественников при лечении заболеваний человека.

Считается, что применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является перспективным в клеточной терапии ряда инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также в предотвращении отторжения трансплантата. Результаты ряда доклинических и первых стадий клинических испытаний свидетельствуют об умеренной эффективности использования МСК различного происхождения в лечении рассеянного склероза, ревматоидного артрита, сахарного диабета 1-го типа, болезни Крона [1], туберкулеза со множественной и широкой лекарственной устойчивостью [2], HCV-ассоциированного цирроза печени [3] и др. Для применения в практической медицине постоянно проводится поиск новых источников биоматериала для получения МСК, совершенствуются методы их выделения, культивирования, накопления биомассы и контроля качества, интенсивно изучается влияние МСК на иммунную систему.

В настоящее время наиболее изучены иммуномодулирующие свойства МСК костного мозга и жировой ткани. МСК оказывают иммуносупрессивное действие на клетки иммунной системы. Влияние МСК в первую очередь проявляется на различных аспектах функционирования Т-клеточного звена иммунитета. Известно, что МСК ингибируют активацию, антиген-

специфическую пролиферацию, образование цитотоксических Т-лимфоцитов, продукцию ИФН- $\gamma$ , ИЛ-4 и других важнейших цитокинов, оказывают проапоптотическое действие на клетки [4]. Более поздние исследования показали, что МСК проявляют иммуномодулирующую активность не только в отношении Т-клеток, но также подавляют функцию антигенпредставляющих клеток (дендритные клетки, В-клетки, макрофаги) и натуральных киллеров [5].

Имуномодулирующее действие МСК реализуется через продукцию растворимых факторов роста, цитокинов, медиаторов ангиогенеза по принципу паракринного механизма. Так, МСК продуцируют трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), фактор роста гепатоцитов (HGF), простагландин E2 (PGE2), растворимую форму протеина HLA-G5, гемоксигеназу (HO-1), индоламин-2, 3-диоксигеназу (IDO), индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS) и др. [4—6].

Для применения МСК в клеточной терапии аутоиммунных заболеваний и отторжения трансплантата наиболее важной является способность МСК к иммуносупрессии. МСК, выделенные из различных источников (костный мозг, жировая ткань, плацента, периферическая кровь), схожи по своей способности ингибировать иммунный ответ [7].

Одной из доступных популяций тканеспецифичных стволовых клеток являются эктомезенхимальные стволовые клетки обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека [8, 9]. Экспериментальные данные свидетельствуют, что трансплантации ЭМСК ОЭ индуцируют нейрогенез при повреждениях спинного мозга, гиппокампа, слуховых нервов, сетчатки глаза [10—12]. Перспективным направлением использования ЭМСК ОЭ в клеточной терапии может стать лечение дефектов эпителиального покрова верхних дыхательных путей. Полагают, что воздействие на процессы репарации, регенерации и сохранность тканей в очаге повреждения в значительной степени обусловлено выделением трансплантированными клетками нейротрофических факторов [10]. Тем не менее в литературе практически отсутствуют данные о механизмах индукции регенерации, спектре ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса, которые синтезируются ЭМСК ОЭ и формируют благоприятное микроокружение для восстановления целостности тканей в зоне дефекта. Также остается открытым вопрос об иммунореактивности ЭМСК ОЭ и их способности модулировать локальную иммунную реакцию в области введения при трансплантации. Положительные эффекты клеточной терапии с применением ЭМСК ОЭ могут быть опосредованы иммуномодулирующими свойствами, характерными для других типов МСК. Однако способность ЭМСК ОЭ взаимодействовать с клетками иммунной системы и влиять на их функциональную активность изучена недостаточно.

Целью данной работы явилось изучение иммуносупрессивных свойств культивируемых ЭМСК ОЭ по отношению к митоген-индуцированной пролиферации лимфоцитов CD4+.

## Материал и методы

*Источники ткани ОЭ, приготовление культур ЭМСК ОЭ, условия культивирования.* Образцы ткани ОЭ были получены из биопсийного материала слизистой среднего носового хода, направляемого на гистологическое исследование при проведении плановых хирургических вмешательств (БелМАПО, РНПЦ оториноларингологии) у пациентов с невоспалительными заболеваниями носовой полости и околоносовых пазух. Образцы ткани транспортировали и хранили при 4°C не более суток в питательной среде DMEM/F-12 (1:1), содержащей антибиотика: гентамицин (100 мкг/мл) и амфотерицин Б (10 мкг/мл). Первичные культуры и субкультуры ЭМСК ОЭ человека получали по ранее разработанной технологии [9]. Проводили оценку культур клеток ОЭ на соответствие паспортным данным (морфология — фибробластоподобная; жизнеспособность — не менее 95%; фенотип — не менее 90% CD90+, CD105+, нестин+, CD45-, микробиологическая чистота).

*Определение иммунофенотипа клеток методом проточной цитометрии.* Фенотипирование клеток методом проточной цитометрии проводили по стандартной методике с использованием антител к молекулам CD90 (FITC), CD105 (PE), CD45 (PE-Cy7), нестину (FITC), CD40 (PE), CD80 (PE), CD86 (PE), CD273 (PE), CD274 (FITC), HLA-DR (FITC), ИЛ-10 (PE-Cy5). Флюоресценцию регистрировали на проточном цитофлюориметре «FACSCalibur» («BD Biosciences», США). В процессе учета проб выделяли регион ЭМСК ОЭ по параметрам прямого и бокового светорассеяния, в котором регистрировали не менее 10 000 событий. Для анализа данных использовали программное обеспечение Weasel 3.0.2 («WENI», Австралия).

*Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК).* Для выделения мононуклеарных клеток 8—10 мл гепаринизированной венозной крови дважды разводили добавлением стерильного DPBS. В пробирки для градиентного центрифугирования объемом 12 мл вносили стерильный градиент плотности Histopaque-1077 ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>), на который наслаивали разведенную кровь. Центрифугировали пробирки 15 мин при 3000 об./мин. Собирали кольцо мононуклеаров, клетки промывали 2 раза в DPBS и ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 с 10% FBS.

*Окрашивание МПК внутриклеточным флюоресцентным красителем 5(6)-карбоксихлюоресцеин диацетат N-сукцинимидил эфиром (CFSE).* В суспензию МПК (в 1 мл среды RPMI-1640) добавляли CFSE в конечной концентрации 5 мМ. Инкубировали 10 мин в темноте при 37°C. Реакцию окрашивания останавливали добавлением охлажденного до 4°C DPBS, поместив пробирку на лед. Отмывали клетки дважды в холодном DPBS. Ресуспендировали осадок окрашенных МПК в полной ростовой среде RPMI-1640, доводили концентрацию до  $1 \cdot 10^6$  кл/мл.

*Сокультивирование ЭМСК ОЭ и МПК.* При постановке эксперимента в различных комбинациях использовали 4 культуры ЭМСК ОЭ, полученные от разных доноров, которые соответствовали паспортным дан-

ным, и МПК, выделенные из крови 4 доноров. За сутки до начала совместного культивирования культуры ЭМСК ОЭ высевали в 4 мл ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) с 10% FBS (полная ростовая среда) на 6-луночные планшеты в концентрации 20 тыс. кл./см<sup>2</sup>. На следующие сутки после образования монослоя ЭМСК ОЭ с конфлюентностью 70—80% удаляли из лунки 2 мл ростовой среды и вносили туда 2 мл суспензии МПК в полной ростовой среде RPMI-1640, свежеекрасенных CFSE (соотношение ЭМСК и МПК 1:10). В качестве контроля использовали культуры МПК без присутствия ЭМСК: к 2 мл МПК в полной ростовой среде RPMI-1640 добавляли 2 мл полной ростовой среды DMEM/F-12 (1:1). Во все лунки вносили неспецифический поликлональный митоген — фитогемагглютинин (ФГА) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл для индукции пролиферации МПК. Каждый вариант делали дважды. После внесения компонентов инкубировали планшет в течение 3 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажность воздуха).

*Культивирование МПК с кондиционированной культурами ЭМСК ОЭ ростовой средой.* Культуры ЭМСК ОЭ высевали в полной ростовой среде DMEM/F-12 (1:1) на пластиковые флаконы в концентрации 20 тыс. кл./см<sup>2</sup>, на 3-и сутки роста кондиционированную культурами среду использовали для постановки эксперимента. В 6-луночные планшеты в каждую лунку вносили по 2 мл суспензии МПК в полной ростовой среде RPMI-1640, свежеекрасенных CFSE, туда же добавляли по 2 мл кондиционированной стволовыми клетками ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) и ФГА в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. В качестве контроля использовали культуры МПК с добавлением свежей ростовой среды DMEM/F-12 (1:1) вместо кондиционированной. После внесения компонентов инкубировали планшет в течение 3 сут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 95% влажность воздуха).

*Оценка влияния ЭМСК на пролиферацию T-лимфоцитов CD4+.* Оценка индекса пролиферации и числа поделившихся клеток CD4+ оценивали по изменению интенсивности флюоресценции CFSE после окончания культивирования на 3-и сутки. Для анализа данных использовали программное обеспечение «ModFitLT». Гейтирование осуществляли следующим образом: на 2-мерной точечной цитограмме, построенной в координатах CD4 (APC) и 7-AAD, выделяли регион, содержащий жизнеспособные клетки CD4<sup>hi</sup>. Регион проецировали на гистограмму флюоресценции по каналу FL1 (CFSE). Вручную выставляли пик флюоресценции «родительской» популяции, рассчитывали число генераций пролиферирующих клеток и индекс пролиферации при помощи встроенных алгоритмов.

*Методы статистической обработки данных.* Значения показателей представлены в виде медианы и интерквартильного размаха в виде 25-й и 75-й процентилей. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна—Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости P<0,05.

**16 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней**

**Результаты и обсуждение**

При совместном культивировании в течение 3 сут был установлен ингибирующий эффект ЭМСК на ФГА-индуцированную пролиферацию суммарной фракции лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов CD4+.

Так, при морфологической оценке пролиферативного эффекта в контрольных культурах МПК в суспензии были выявлены многочисленные конгломераты клеточных клонов (рис. 1, а). В сокультурах с ЭМСК в суспензии отмечено меньшее количество пролиферирующих лимфоцитов. Большая часть МПК находилась в прикрепленном к ЭМСК состоянии, причем отделялись МПК лишь при интенсивном пипетировании, что свидетельствует о довольно прочном контакте между клетками (рис. 1, б).

При количественной оценке пролиферации методом проточной цитометрии по интенсивности флюо-

ресценции CFSE установлено, что за 3 сут в контрольных культурах МПК отслеживалось до 5—6 делений Т-клеток CD4+ (рис. 2). В сокультурах отмечено снижение пролиферативной активности Т-клеток CD4+. Под влиянием ЭМСК происходит замедление митоген-индуцированного деления клеток. Среднее значение индекса пролиферации (ИП) МПК при сокультивировании составило 1,42 [1,33—1,48] (n=5) и оказалось достоверно ниже (P=0,027) по сравнению с тем же показателем в контрольных культурах МПК — 1,78 [1,62—2,04] (n=4).

Полученные результаты свидетельствуют, что культуры ЭМСК ОЭ человека, как и стволовые клетки мезенхимального происхождения, выделенные из других источников, оказывают ингибирующее действие на стимулированные к пролиферации Т-клетки CD4+.

Для МСК некоторых тканей (костного мозга, жировой ткани) частично установлены механизмы иммуно-

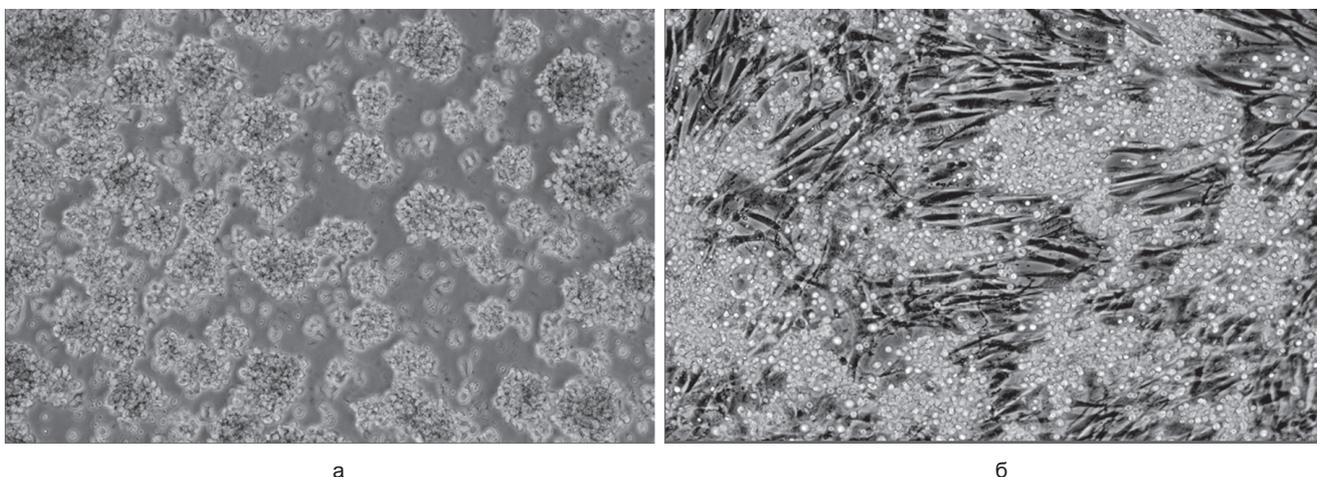


Рис. 1. Морфология пролиферирующих в культуре ФГА-индуцированных МПК, 3-и сутки роста (фазово-контрастная микроскопия): а — контроль, рост МПК без ЭМСК ОЭ — многочисленные конгломераты пролиферирующих клеток; б — рост МПК при контактном сокультивировании с ЭМСК ОЭ — МПК в адгезированном к ЭМСК ОЭ состоянии. Ув. 10

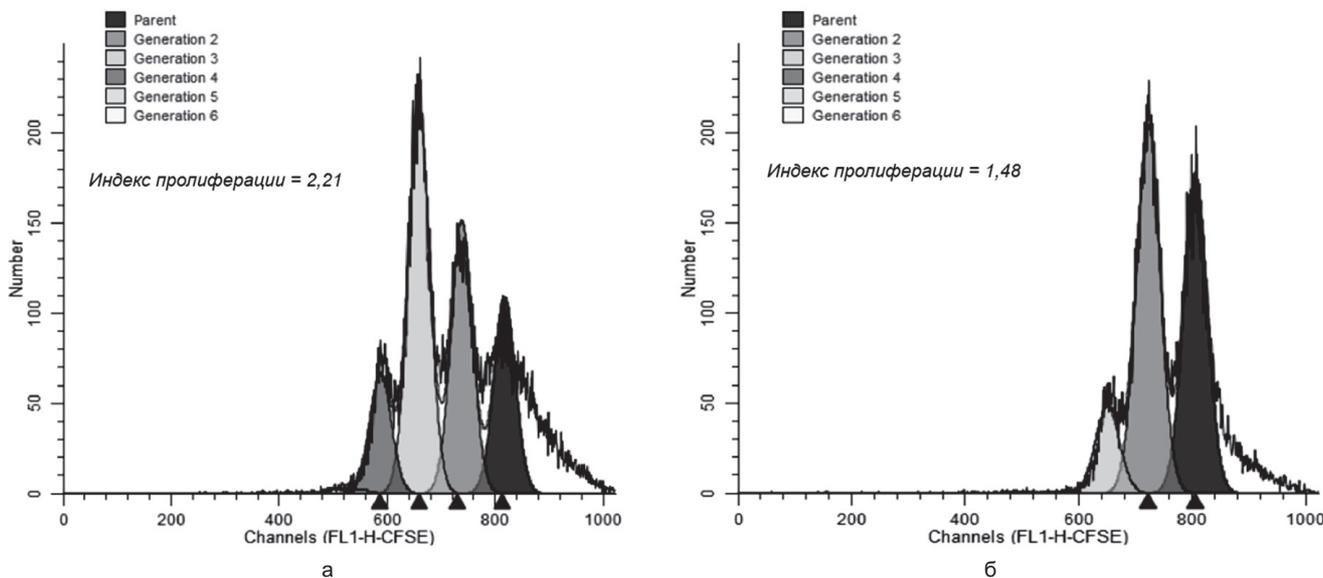


Рис. 2. Гистограмма флуоресценции, иллюстрирующая супрессию ЭМСК ОЭ ФГА-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов CD4+ периферической крови: а — контроль МПК; б — контактное сокультивирование СПК ОЭ и МПК

супрессии. Так, в некоторых случаях ингибиторную функцию МСК на клетки иммунной системы связывают с секрецией ИЛ-10 [13, 14].

Способность ЭМСК оказывать иммуносупрессивное влияние через продукцию ИЛ-10 ранее не была исследована. Таким образом, следующим этапом работы явилась оценка накопления культурами ЭМСК ОЭ ИЛ-10. Показано, что культуры ЭМСК не продуцируют ИЛ-10 (рис. 3); это свидетельствует о том, что иммуносупрессивный механизм ЭМСК не связан с секрецией ИЛ-10.

Для изменения функциональной активности Т-клеток требуется непосредственный контакт с МСК [4,

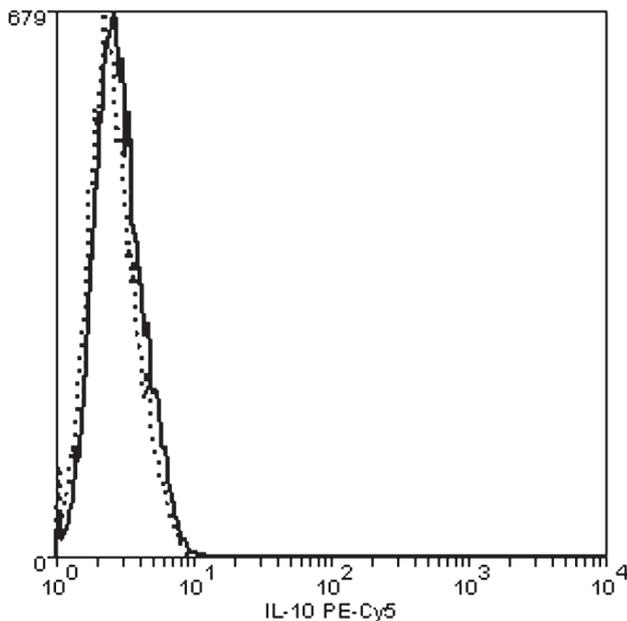


Рис. 3. Гистограмма, иллюстрирующая отсутствие продукции культурами ЭМСК ОЭ ИЛ-10

15, 16]. Тот факт, что при контактном сокультивировании отмечалось прикрепление МПК к ЭМСК, может свидетельствовать о первостепенной роли межклеточных контактов, а не секретлируемых факторов при запуске механизмов иммуносупрессии. Для проверки данной гипотезы было проведено культивирование МПК в условиях, содержащих кондиционированную среду ЭМСК без присутствия самих клеток. В процессе роста ЭМСК выделяли в среду различные продукты своего метаболизма, в том числе и возможные растворимые ингибиторы пролиферации Т-лимфоцитов.

Оценка пролиферации с использованием красителя CFSE показала, что интенсивность деления митоген-индуцированных Т-клеток CD4+ достоверно не различалась в контрольных культурах и в опытных образцах с добавлением кондиционированной ЭМСК культуральной среды (рис. 4). Значение ИП контрольных культур составило 2,17 [1,84—2,50], а культур Т-клеток, инкубированных с кондиционированной средой, — 2,13 [1,91—2,34] (n=4, P=1,0).

Полученные результаты свидетельствуют, что для ингибирования пролиферации Т-клеток имеет значение непосредственный контакт последних с ЭМСК. Это подтверждают другие исследования по сокультивированию МПК и МСК костного мозга в системе типа Трансвелл. В таких условиях не происходило ингибирование пролиферации Т-клеток при отсутствии непосредственного контакта клеток, при этом секретлируемые продукты могли беспрепятственно проникать от МСК к МПК и наоборот [17].

Модуляция функциональной активности лимфоцитов также может быть реализована за счет экспрессии на поверхности ЭМСК ОЭ коstimуляторных и коингибиторных молекул. К основным молекулам этого семейства относят В7-молекулы, обладающие коstimуляторными свойствами — В7-1 (CD80) и В7-2

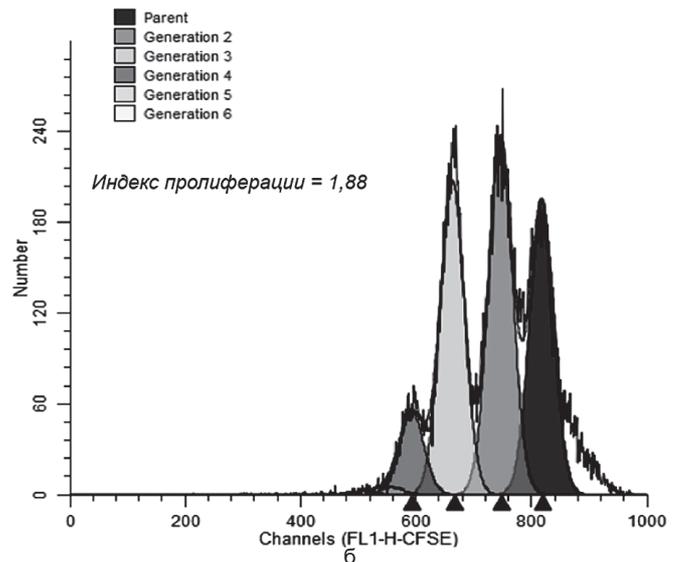
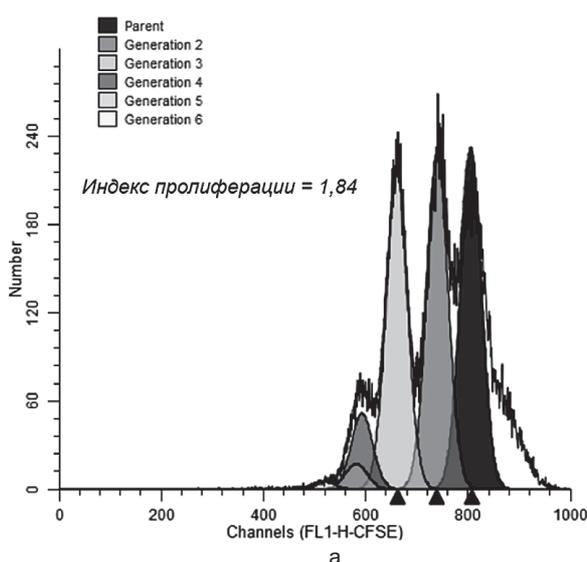


Рис. 4. Гистограмма флуоресценции, иллюстрирующая отсутствие супрессии ФГА-индуцированной пролиферации Т-лимфоцитов CD4+ при культивировании их в присутствии кондиционированной ЭМСК ОЭ культуральной среды (3-и сутки): а — контроль МПК; б — культивирование МПК в присутствии кондиционированной ЭМСК ОЭ культуральной среды

## 18 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

(CD86), и опосредующие коингибирование — B7-DC (CD273), B7-H1 (CD274) [18].

Экспрессия молекул CD80, CD86, CD273 и CD274 выявлена преимущественно на антигенпрезентирующих клетках (АПК). Причем высокая экспрессия коингибиторных молекул наиболее характерна для толерогенных дендритных клеток. Однако имеются сведения, что МСК также могут нести на своей поверхности антигены данной группы, с чем могут быть связаны их иммуномодулирующие свойства [1, 7, 19, 20].

В результате иммунофенотипического анализа установлено, что из костимуляторных молекул на поверхности ЭМСК ОЭ присутствует лишь антиген CD40 (рис. 5), а экспрессия CD80 и CD86 не выявлена ни в одной из исследованных культур клеток.

Нами впервые показана экспрессия коингибиторных молекул CD273 и CD274 ЭМСК ОЭ. Все клетки в культуре экспрессировали молекулу CD273, а экспрессия молекулы CD274 была выше 90%. При этом относительная интенсивность флюоресценции молекулы CD273 составила 59,6 [57,4—61,3] усл. ед., что превышает значения этого показателя на толерогенных дендритных клетках [21].

Следует подчеркнуть, что на ЭМСК ОЭ отсутствовала даже минимальная экспрессия молекулы HLA-DR, что исключает принадлежность изучаемых клеток к истинным АПК.

В условиях сокультуры различных по тканевому происхождению МСК и лимфоцитов никогда не наблюдалась активация последних. Причиной этого может быть отсутствие экспрессии стволовыми клетками костимуляторных молекул CD80 и CD86. Молекула CD40 помимо костимуляторной выполняет ряд других функций и является менее специфичной по сравнению с CD80 и CD86 и может быть выявлена на различных клетках: АПК, в том числе макрофагах и В-клетках, эндотелиальных, фибробластных, мышечных клетках [22].

В свою очередь, наличие коингибиторных молекул CD273 и CD274 на ЭМСК ОЭ позволяет объяснить проявление ими иммуносупрессорных свойств.

Известно, что молекулы CD273 и CD274 являются лигандами для рецептора PD-1. PD-1 (CD279) принадлежит к CD28-семейству иммунорецепторов и экспрессируется преимущественно активированными Т- и В-клетками [23]. Впервые этот протеин был обнаружен на линиях Т-клеток тимуса, для которых показано усиление экспрессии этого белка в ответ на стимуляцию проапоптотическими факторами [24]. При взаимодействии PD-1 со своими лигандами происходит ингибирование ответа Т- и В-клеток на антигенную стимуляцию, преимущественно за счет активации тирозин-фосфатазы SHP-2 [23].

Кроме того, экспрессию антигенов CD273/CD274 может положительно регулировать ИФН- $\gamma$ , который

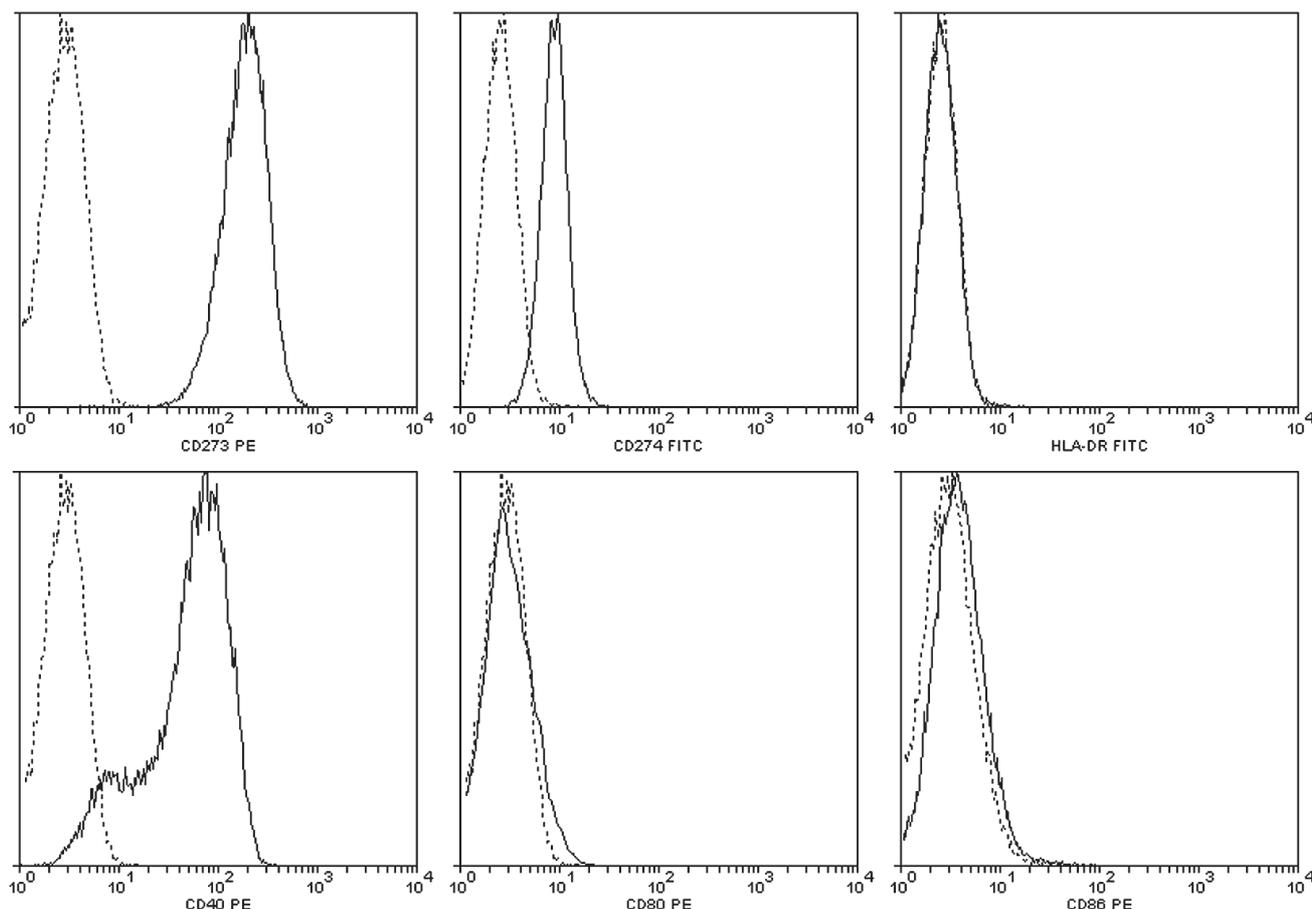


Рис. 5. Экспрессия культурами ЭМСК ЭО человека костимуляторных, коингибиторных молекул и антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса

продуцируется готовыми к пролиферации Т-лимфоцитами. Также ИФН- $\gamma$  параллельно может запускать дополнительные пути реализации иммуносупрессии. Этот цитокин является индуктором фермента индол-аминокислот-2,3-диоксигеназы (IDO) в МСК, который катализирует утилизацию триптофана по кинурениновому пути. В свою очередь запуск экспрессии IDO вызывает голодание по триптофану и накопление промежуточных продуктов его метаболизма, что ингибирует пролиферацию Т-клеток [21—23].

Дальнейшее изучение иммуномодулирующих свойств ЭМСК позволит детализировать механизмы их влияния на функциональную активность различных звеньев иммунного ответа и оценить возможность их использования в клеточной терапии заболеваний, вызванных нарушением функций иммунитета, по аналогии с другими широко используемыми типами стволовых клеток.

### Выводы

1. Культивируемые эктомезенхимальные стволовые клетки обонятельного эпителия (ЭМСК ОЭ) человека оказывают выраженный иммуносупрессивный эффект на Т-клетки CD4<sup>+</sup> периферической крови, что проявляется в снижении их пролиферативной способности.

2. Иммуносупрессивный эффект ЭМСК не связан с наличием растворимых факторов, секретируемых ЭМСК, поскольку рост Т-клеток в кондиционированной стволовыми клетками среде не приводил к подавлению пролиферации, а ЭМСК не продуцировали интерлейкин-10.

3. ЭМСК ОЭ экспрессируют коингибиторные молекулы CD273 и CD274, в то же время экспрессия костимуляторных молекул CD80 и CD86 отсутствует, что может являться одной из причин подавления пролиферации Т-клеток в условиях смешанной культуры и объяснять необходимость тесного контакта между клетками для проявления иммуносупрессивных свойств ЭМСК.

4. Полученные данные об иммуносупрессивных свойствах ЭМСК ОЭ человека в отношении Т-клеток свидетельствуют о возможности их использования в клеточной терапии заболеваний, связанных с избыточным и неконтролируемым иммунным ответом, направленным на собственные антигены (аутоиммунные заболевания), либо для предупреждения отторжения трансплантируемых органов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Figueroa F. E., Carrion F., Villanueva S., et al. // *Biol. Res.*— 2012.— Vol. 45.— P. 269—277;
2. Skrahin A., Ahmed R. K., Ferrara G., et al. // *Lancet Resp. Med.*— 2014.— Vol. 2, № 2.— P. 108—122;
3. Алейникова О. В., Лукашик С. П., Цыркунов В. М., и др. // *Вестн. НАН.*— 2010.— № 4.— С. 5—13.
4. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., et al. // *Stem Cell Res. Ther.*— 2010.— Vol. 1, № 1.— P. 2—17.
5. Han Z., Jing Y., Zhang S., et al. // *Cell Bioscience.*— 2012.— Vol. 2.— P. 8.
6. Devang M., Patel J., Shah F., et al. // *Stem Cells Int.*— 2013.— Vol. 23.— P. 15.
7. Trapani M., Bassi G., Ricciardi M., et al. // *Stem Cells Dev.*— 2013.— Vol. 22, № 22.— P. 2990—3002.
8. Tome M., Lindsay S. L., Riddell J. S., et al. // *Stem Cells.*— 2009.— Vol. 27, № 9.— P. 2196—2208.
9. Антоневиц Н. Г., Квачева З. Б., Чекан В. Л., и др. // *Клеточные культуры. Информацион. бюл.*— 2012.— Вып. 28.— С. 27—36.
10. Mackay-Sim A. // *Archives Italiennes de Biologie.*— 2010.— Vol. 148.— P. 47—58.
11. Nivet N., Vignes M., Girard S. D., et al. // *J. Clin. Invest.*— 2011.— Vol. 121, № 7.— P. 2808—2820.
12. Pandit S., Sullivan J. M., Egger V., et al. // *Stem Cells.*— 2011.— Vol. 29.— P. 670—677.
13. Aggarwal S., Pittenger M. F. // *Blood.*— 2005.— Vol. 105.— P. 1815—1822.
14. Oh J. Y., Kim M. K., Shin M. S., et al. // *Stem Cells.*— 2008.— Vol. 26, № 4.— P. 1047—1055.
15. Ren G., Zhao X., Zhang L., et al. // *J. Immunol.*— 2010.— Vol. 184.— P. 2321—2328.
16. Brooke G., Tong H., Levesque J., et al. // *Stem Cells Dev.*— 2008.— Vol. 17.— P. 929—940.
17. Nauta A. J., Fibbe W. E. // *Blood.*— 2007.— Vol. 110.— P. 3499—3506.
18. Freeman G. J., Sharpe A. H. // *Nat. Immunol.*— 2012.— Vol. 13, № 2.— P. 113—115.
19. Ni X., Jia Y. Q., Meng W. T., et al. // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*— 2009.— Vol. 17, № 4.— P. 990—993.
20. Sheng H., Wang Y., Jin Y., et al. // *Cell Res.*— 2008.— Vol. 18, № 8.— P. 846—857.
21. Романова И. В., Гончаров А. Е., Тумов Л. П. // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. трудов.*— 2013.— Вып. 6.— С. 240—245.
22. Chatzigeorgiou A., Lyberi M., Chatzilymperis G., et al. // *Biofactors.*— 2009.— Vol. 35, № 6.— P. 474—483.
23. Okazaki T., Honjo T. // *Cell.*— 2006.— Vol. 124, № 3.— P. 459—461.
24. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., et al. // *EMBO J.*— 1992.— Vol. 11, № 1.— P. 3887—3895.
25. Sheng H., Wang Y., Jin Y., et al. // *Cell Res.*— 2008.— Vol. 18, № 8.— P. 846—845.
26. Zhang J., Yuan Z., Ren G., et al. // *Cancer Res.*— 2014.— Vol. 74, № 5.— P. 1576—1587.
27. Curti A., Trabanelli S., Salvestrini V., et al. // *Blood.*— 2009.— Vol. 113.— P. 2394—2401.

Поступила 08.07.14.

#### IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES OF HUMAN OLFACTORY EPITHELIUM-DERIVED ECTOMESENCHYMAL STEM CELLS IN CULTURE

N. H. Antonevich, A. Y. Hancharou, V. L. Chekan

The aim of the current study consisted in evaluation of the immunosuppressive properties of human olfactory epithelium-derived ectomesenchymal stem cell (hOE-EMSC). The ability of hOE-EMSC to inhibit the mitogen-induced proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells was shown. It was shown that the immunosuppressive effect did not depend on soluble factors produced by stem cells including interleukin-10 but at the same time a direct contact of hOE-EMSC with lymphocytes was required to exhibit immunosuppressive properties. It was shown that hOE-EMSC expressed the co-inhibitory molecules CD273 and CD274 but were negative for CD80 and CD86 markers. It is supposed that immunosuppressive properties are dependent on CD273 and CD274 expression. Taking together, the hOE-EMSC may be used in cellular immunotherapy of immune system disorders which include autoimmune diseases and prevention of organ and tissue rejection.

**Key words:** stem cells, olfactory epithelium, immunosuppression.

#### Адрес для корреспонденции:

Антоневиц Наталья Георгиевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-32-67.

С. А. ДРАКИНА, Л. В. КОРБУТ, Л. А. АНИСЬКО,  
Н. С. ВЕРЕЩАКО, П. А. СЕМИЖОН, Е. П. СЧЕСЛЁНОК,  
Н. В. СОЛОВЕЙ, О. Р. КНЯЗЕВА, В. В. ЩЕРБА,  
А. Г. КРАСЬКО, И. А. КАРПОВ

## ВЫЯВЛЕНИЕ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОВ С КЛЕЩЕВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет, Городская клиническая инфекционная больница

**Цель исследования.** Выявление гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) у пациентов с укусом клеща с клинической картиной клещевой инфекции.

**Материал и методы.** Исследованы клещи из природных очагов республики и клинические пробы (плазма, ЦСЖ, сыворотка крови) от пациентов. Использованы стандартные молекулярно-биологические, иммунологические и клинико-лабораторные методы исследования.

**Результаты.** Впервые в Республике Беларусь клинически и лабораторно подтвержден диагноз гранулоцитарного анаплазмоза человека. При исследовании сывороток крови с помощью серологических методов антитела к ГАЧ выявляются чаще, чем в клещах при исследовании методом ПЦР. Это указывает на то, что анаплазма имеет более широкое распространение и заражение клещей отличается в популяциях.

**Заключение.** ГАЧ (как моно-, так и микст-инфекция (ЛБ+ГАЧ)) может протекать достаточно легко и осложняет клиническое течение Лайм-боррелиоза в том случае, когда идет массивное размножение возбудителя в клетках крови.

**Ключевые слова:** гранулоцитарный анаплазмоз человека, болезнь Лайма, непрямая реакция иммунофлюоресценции, иммуноферментный метод, метод полимеразной цепной реакции, иммуноглобулины М и G.

Анаплазмоз человека известен в США с середины 90-х годов прошлого века, а регистрировать его как заболевание начали с 1999 г. Возбудитель ранее относили к роду *Ehrlichia*, а в 2001 г., после таксономических преобразований, выделили в род *Anaplasma*.

Заболееваемость гранулоцитарным анаплазмозом (ГАЧ) увеличилась в США с 1,4 случая на 1 млн жителей в 2000 г. до 6,1 случая на 1 млн жителей в 2010 г. Летальность остается низкой (менее 1%). В группе риска находятся лица старше 60 лет и пациенты с иммунодефицитом [1].

В Европе данное заболевание впервые было зарегистрировано в Словении [2], а затем случаи стали отмечаться и в других странах Центральной Европы [3—5]. Заболевание регистрируется в сезон активности клещей с мая по октябрь. Длительность инкубационного периода составляет от 5 до 21 дня, в среднем 11 сут. Клинические симптомы ГАЧ неспецифичны и включают лихорадку, головную боль, слабость и миалгии. У некоторых пациентов отмечаются тошнота, рвота, диарея, кашель, артралгии, ригидность

затылочных мышц и нарушение сознания. Изредка появляются боли в животе, диарея, кашель, сыпь.

ВОЗ рекомендует рассматривать диагноз анаплазмоза как лихорадочное состояние, возникшее после укуса клеща. Лабораторными критериями являются обнаружение морулы в гранулоцитах, выявление ДНК ГАЧ методом ПЦР со специфическими праймерами, сероконверсия, 4-кратное увеличение титра антител и/или выделение возбудителя на культуре клеток (культивирование) [6].

Подтвержденным диагнозом ГАЧ считается при наличии клинической картины, эпидемиологических данных и положительного лабораторного теста. Обнаружение антител в острой фазе заболевания и при выздоровлении может свидетельствовать о возможном анаплазмозе.

Целью исследования явилось изучение циркуляции возбудителя анаплазмоза в природных очагах Республики Беларусь и выявление ГАЧ у пациентов с укусом клеща с клинической картиной клещевой инфекции.

### Материал и методы

Для серологических исследований использовали 104 пробы сывороток крови от пациентов, которые отмечали присасывание клещей *I. ricinus* в эпидсезонах 2009—2012 гг. Все сыворотки исследовали на наличие антител к Лайм-боррелиозу (ЛБ), 65 — на ГАЧ.

Для определения иммуноглобулинов М и G использовали тест-систему для выявления суммарных антител к возбудителю ЛБ методом непрямой иммунофлюоресценции «НИФМ-Лайм-АТ» (производство РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь) и иммуноферментные тест-системы ГАЧ-ИФА-IgM, ГАЧ-ИФА-IgG фирмы «Омникс» (Россия), в которых используется композиция рекомбинантных белков *A. phagocytophilum*.

Наличие возбудителя анаплазмоза в пробах клинического и полевого (клещи *I. ricinus*) материала определяли методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием коммерческой диагностической тест-системы «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris-FL*» (Россия).

### Результаты и обсуждение

При исследовании 763 клещей *I. ricinus* (131 пул) на носительство возбудителей клещевых инфекций человека (боррелии, анаплазмы, эрлихии и клещевой энцефалит (КЭ), собранных в 2010—2011 гг. с растительности на территории Брестской, Витебской, Гродненской, Гомельской и Минской областей, установлено, что чаще клещи являются носителями боррелий: *B. Burgdorferi* sl. выявлены в 55 (42%) пулах клещей, РНК вируса КЭ — в 31 (24%) пуле, ДНК возбудителя анаплазмоза человека (*A. phagocytophilum*) — в 5 (3,8%). В 4 пробах клещей, исследованных индивидуально, обнаружены одновременно оба возбудителя (боррелии и анаплазмы).

В результате исследования на носительство возбудителя анаплазмоза клещей *I. ricinus*, собранных в 2011 г. с растительности на территории Минской области, методом ПЦР проанализировали 154 клеща (19 пулов по 5—13 клещей в пуле) из Молодечненского, Минского, Вилейского и Солигорского районов. Выявлена циркуляция возбудителя анаплазмоза в 2 районах, на территории которых были собраны клещи. ДНК *A. phagocytophilum* (возбудитель ГАЧ) обнаружена в 2 пулах клещей, собранных на территории Молодечненского района (лесной массив в районе МПТД) и в 3 пулах клещей, собранных на территории Минского района (лесной массив Ждановичи).

Результаты исследования 104 проб сывороток крови пациентов на наличие антител к возбудителям ЛБ и ГАЧ, госпитализированных в Городскую клиническую инфекционную больницу Минска, РНПЦ неврологии и нейрохирургии, а также обратившихся в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии по поводу присасывания клеща показали достаточно высокий уровень антител к возбудителю ГАЧ — 9,3%. Среди них было 10% пациентов с хронической формой инфекции, протекающей с поражением нервной системы, которые в анамнезе отмечали присасывание клещей; 14,7% — с лихорадкой, имевшие в анамнезе присасывание клеща и диагностически значимые титры антител при исследовании методом НРИФ.

Таким образом, с помощью молекулярно-биологических методов исследования показано наличие циркуляции возбудителя анаплазмоза в природных очагах на территории Республики Беларусь. Выявление достаточно высокого уровня антител к возбудителю ГАЧ у пациентов, отмечавших присасывание клеща, также свидетельствует о встрече в прошлом с возбудителем анаплазмоза.

На основании полученных результатов провели ретроспективный анализ сывороток крови пациентов с диагнозом ЛБ на наличие антител к возбудителю ГАЧ методом ИФА. Установлено наличие антител у 7 пациентов.

У 1 пациента выявлены только IgM к возбудителю ГАЧ. В эпидемиологическом анамнезе отмечалось двукратное присасывание клещей в течение одного месяца с интервалом в 2 нед. Основные жалобы: головная боль, головокружение, общая слабость, сонливость, диарея в течение суток. При объективном осмотре отмечалась болезненность подчелюстных лимфоузлов и болезненность в левой подвздошной области. Лабораторные данные показали палочкоядерный сдвиг влево и незначительную лейкопению до  $3,9 \cdot 10^9/\text{л}$ , нормальные показатели трансaminaз и отрицательный СРБ. Пациент получал лечение доксициклином и был выписан с диагнозом клещевого боррелиоза безэритемной формы.

У 2 пациентов при серологическом обследовании обнаружены как IgM, так и IgG. У одного отмечались жалобы на температуру до 39°C и боль в паховой области. Объективно на коже в правой паховой области имелась эритема и увеличенный болезненный лимфоузел. В анализе крови выявлен лимфоцитоз

и преобладание палочкоядерных нейтрофилов. Окончательный клинический диагноз пациента: болезнь Лайма, эритемная форма. Второй пациент поступил в стадии поздней диссеминации боррелиоза с жалобами на головокружение, слабость, боли в мелких суставах кистей, снижение памяти и экзантему на тыльной поверхности левой кисти с шелушением. В анамнезе — укусы клеща 2 года назад и 2-недельный курс антибиотикотерапии. В крови выявлен лимфоцитоз и анизоцитоз в виде микроцитов, снижено содержание железа в сыворотке крови.

У 4 пациентов определялись только IgG. Клиническая картина у 2 пациентов характеризовалась острым началом в виде лихорадки, головной боли и слабости. У всех пациентов отмечались нарушения со стороны нервной системы в виде парестезий, нарушения координации (шаткость) при ходьбе до ограничения передвижения, слабости и снижения мышечной силы. Среди них у 2 пациентов развились энцефаломиелополиневриты.

Таким образом, клиническая картина помимо мигрирующей эритемы, которая является золотым стандартом при диагностике I стадии ЛБ, была разнообразна и включала как общинфекционные симптомы (лихорадка, головная боль, слабость, тошнота, головокружение, недомогание), так и симптомы, указывающие на поражение опорно-двигательного аппарата и нервной системы. Во всех случаях диагноз ЛБ был подтвержден обнаружением IgM к ЛБ с помощью НРИФ либо увеличением содержания IgG, методами иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. Отмечались изменения, которые не наблюдаются при ГАЧ: в общем анализе крови — анизоцитоз эритроцитов (микроцитоз); в биохимическом — уменьшение содержания железа в сыворотке крови. О снижении уровня железа в сыворотке крови при анаплазмозе указывалось при клинико-лабораторных исследованиях ГАЧ в Словении [7]. На ГАЧ и смешанные инфекции также указывают и лабораторные исследования, которые выявили наличие IgM к *A. phagocytophilum* на фоне развивающегося ЛБ, что и привело к развитию более тяжелой клинической картины в 3 случаях. Поздние антитела IgG к *A. phagocytophilum* выявлены у 1 пациента со стадией мигрирующей эритемы и у 2 — со II и III стадиями ЛБ. Это объясняет инфицирование возбудителем ГАЧ до заражения боррелиями и без клинических проявлений. У последних 2 пациентов развился нейроборрелиоз, что характерно для хронического ЛБ, когда агент запускает демиелинизирующий процесс.

У 2 пациентов методом ПЦР выделена ДНК *A. phagocytophilum*.

*П а ц и е н т к а К., 38 лет. Поступила 21.11.11 с жалобами на повышение температуры тела до субфебрильных значений, слабость, потливость, тянущие боли в мышцах нижних конечностей, послабление стула до 1—3 раз в сутки. В анамнезе отмечены субфебрилитет до 37,2—37,5°C, слабость, потливость возникшие после перенесенной внебольничной пневмонии и сохраняющиеся на про-*

## 22 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

тяжени последних 12 мес. За несколько дней до поступления в ГКИБ появился кашель, по поводу чего ей был назначен антибиотик.

**Эпидемиологический анамнез:** работает в лесной зоне, периодически снимала с себя клещей, в том числе в месяц, предшествующий текущему заболеванию. Профилактически антибиотики после удаления клеща не принимала. В анамнезе жизни грипп, частые ОРВИ в осеннее время, пневмония.

**При поступлении:** в сознании, кожные покровы чистые, мышечная и костно-суставная система в норме, температура 37,2°C, пульс 80 уд./мин, АД 120/80 мм рт. ст., тоны сердца ясные, границы не расширены, дыхание везикулярное, живот мягкий безболезненный, печень выходит из-под края реберной дуги на 1,0 см. Диурез в норме. Жидкий стул 1—2 раза в сутки. Неврологический статус без особенностей.

**Общий анализ крови:** эритроциты —  $4,31 \cdot 10^{12}/л$ ; лейкоциты —  $6,2 \cdot 10^9/л$ ; эозинофилы — 5%, палочкоядерные нейтрофилы — 10%, сегментоядерные нейтрофилы — 57%, лимфоциты — 24%, моноциты — 4%, СОЭ — 3 мм/ч. Другие лабораторные исследования (БАК, ОАМ, копрограмма, ИФА на клещевой энцефалит, энтеровирусы, пситтакоз, ВИЧ, РПГА на иерсиниоз) и инструментальные обследования (ЭКГ, УЗИ органов брюшной полости, ФГДС) не показали патологических отклонений, за исключением незначительно повышенного титра на иерсиниоз, который, вероятно, был связан с перенесенным ранее заболеванием. Учитывая сезон подъема заболеваемости клещевыми инфекциями, а также неоднократные присасывания клещей в анамнезе, пациентке также был выполнен НРИФ на клещевой боррелиоз (титр 1:64).

При исследовании крови методом ПЦР в режиме реального времени на возбудителей клещевых инфекций обнаружена ДНК *A. phagocytophilum*.

В стационаре пациентка получала патогенетическую и симптоматическую терапию и была выписана в удовлетворительном состоянии. Данные ПЦР-исследования (выявлена ДНК *A. phagocytophilum*) были получены после выписки из стационара.

Таким образом, в данном случае имелся убедительный эпиданамнез — работа в лесной зоне, периодические присасывания клещей при отсутствии постэкспозиционной антибактериальной профилактики, а также субъективные (слабость, потливость, миалгии, невыраженная диарея) и объективные (субфебрильная лихорадка) проявления, которые характерны для ГАЧ. В то же время, несмотря на детекцию возбудителя методом ПЦР в крови, не обнаружены типичные патологические изменения в гемограмме (лейкопения, тромбоцитопения), а заболевание протекало в легкой форме и разрешилось без этиотропной терапии, что может указывать на его достаточно благоприятное субклиническое течение у данной пациентки. Учитывая разнообразие патогенов, передающихся с присасыванием клещей, вызывающих малодифференцируемые клинически гриппоподобные заболевания, исполь-

зование методов молекулярно-генетической диагностики позволяет в большинстве случаев своевременно уточнить этиологический диагноз.

**П а ц и е н т к а Б., 31 год.** Поступила 10.07.2013 с жалобами на головную боль, боль в шейном отделе позвоночника, чувство скованности в шее, плечах, повышение температуры до 37,4—37,5°C.

**Анамнез заболевания:** считает себя больной 3 нед, когда появились боли в шейном отделе позвоночника. Принимала нестероидные противовоспалительные средства (диклоберл), которые эффекта не дали. Через 1,5 нед появились головные боли, рвота и повышение температуры до 37,5°C. С 05.07.13 по 09.07.13 находилась на лечении в Копыльской ЦРБ и была выписана без улучшения.

**Эпидемиологический анамнез:** проживала в частном доме в г. Копыль. Отмечает укусы клещей в 2011, 2012 гг.

**Анамнез жизни:** ОРЗ, остеохондроз шейного отдела позвоночника.

**При поступлении:** сознание ясное, положение активное, кожные покровы обычной окраски, чистые, видимые слизистые без изменений, мышечная и костно-суставная система без отклонений от нормы, температура 36°C, пульс 70 уд./мин, АД 110/70 мм рт. ст., тоны сердца ясные, ритмичные, границы сердца не расширены, дыхание везикулярное, частота дыхания — 18 в минуту, живот мягкий, безболезненный. Диурез и стул в норме. Ригидность затылочных мышц, опущение левого угла рта.

**ЭКГ от 16.07.13 в норме.**

**Общий анализ крови от 11.07.13:** лейкоциты —  $6,5 \cdot 10^9/л$ , эритроциты —  $5,39 \cdot 10^{12}/л$ , гемоглобин — 163 г/л, тромбоциты —  $263 \cdot 10^9/л$ ; среди лейкоцитов: эозинофилы — 1%, палочкоядерные нейтрофилы — 3%, сегментоядерные нейтрофилы — 59%, лимфоциты — 35%, моноциты — 2%, СОЭ — 8 мм/ч.

**Биохимический анализ крови:** глюкоза, АЛТ, АСТ, мочевины, СРБ — в пределах нормальных значений.

**Кровь на ЛБ методом НРИФ от 11.07.13:** суммарные антитела отрицательны.

**Общий анализ мочи от 11.07.13:** без особенностей.

**Исследование цереброспинальной жидкости от 10.07.13:** цвет — бесцветный, прозрачный, р. Панди 2+, белок — 1,1 г/л, глюкоза — 2,8 ммоль/л, цитоз —  $601 \cdot 10^6/л$ , в т. ч.: макрофаги — 1%, нейтрофилы — 3%, лимфоциты — 96%;

**от 22.07.13:** цвет — бесцветный, прозрачный, р. Панди слабо положительная, белок — 0,24 г/л, цитоз —  $218 \cdot 10^6/л$ , в т. ч.: лимфоциты — 100%.

**ИФА от 11.07.13:** ЦМВ IgM — отрицательно, ВПГ IgM — отрицательно, IgG — выявлены, ЭВ IgM — отрицательно, ВКЭ IgM — отрицательно, IgG — отрицательно.

**Кровь на лептоспироз от 15.07.13 — отрицательно.**

**Посев ликвора на микрофлору от 10.07.13 — отрицательно.**

ПЦР ЦСЖ от 10.07.13: ВПГ, ВЭБ, ЦМВ, ВЗВ, ЭВ, ВКЭ, КБ, МЭЧ — геном не обнаружен; ГАЧ — ДНК выявлена.

ПЦР плазмы от 11.07.13: ВПГ, ВЭБ, ЦМВ, ВЗВ, ЭВ, ВКЭ, КБ, МЭЧ, ГАЧ — геном не обнаружен.

Лечение: доксициклин, церебролизин, адаптол, эмоксипин, пирацезин, диакарб, глюкоза, инсулин.

Поставлен диагноз «анеплазмоз, менингеальная форма, средней тяжести».

Пациентка выписана в удовлетворительном состоянии.

Таким образом, впервые в Республике Беларусь выявлен и подтвержден лабораторными методами исследования ГАЧ. Показано, что ГАЧ может протекать как в виде моно-, так и микст-инфекции (ЛБ+ГАЧ). При исследовании сывороток крови серологическими методами антитела к ГАЧ выявляются чаще, чем в клещах при исследовании методом ПЦР. Это указывает на то, что анеплазма имеет более широкое распространение и зараженность клещей отличается в очагах.

ГАЧ (как моно-, так и микст-инфекция (ЛБ+ГАЧ)) может протекать достаточно легко в виде общеинфекционного синдрома либо с вовлечением ЦНС в виде серозного менингита и осложняет клиническое течение ЛБ в том случае, когда идет массивное размножение возбудителя в клетках крови. Это можно объяснить либо поздним обращением пациента за помощью, либо получением большой инфицирующей дозы патогена.

## ЛИТЕРАТУРА

1. [Электронный ресурс].— Режим доступа: <http://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats>.
2. Van Dobbenburgh A., Van Dam A. P., Fikrig E. // *N. Engl. J. Med.*— 1999.— Vol. 340.— P. 1214—1216.

3. Parkins M. D. // *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*— 2009.— Vol. 20, № 3.— P. 100—102.

4. Vogl U. M. // *Wien. Med. Wochenschr.*— 2010.— Bd 160, № 3—4.— S. 91—93.

5. Garsna J. C. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 2006.— Vol. 1078.— P. 545—547.

6. Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., et al. // *Clin. Microbiol. Infect.*— 2004.— Vol. 10.— P. 1108—1132.

7. Lotric-Furlan S. // *Wien. Klin. Wochenschr.*— 2006.— Bd 118, № 21—22.— S. 708—713.

Поступила 08.07.14.

### HUMAN GRANULOCYtic ANAPLASMOSIS DIAGNOSIS IN PATIENTS EXPOSED TO MITE INFECTION

S. A. Drakina, L. V. Korbut, L. A. Anisko, N. S. Vereshchako, P. A. Semizhon, E. P. Scheslenok, N. V. Solovey, O. R. Knyazeva, V. V. Shcherba, A. G. Krasko, I. A. Karpov

**Objective.** Human granulocytic anaplasmosis (HGA) diagnosis in patients exposed to mite infection and demonstrating clinical symptoms of mite infection was the purpose of the work.

**Materials and methods.** Mites from the Republic of Belarus natural foci and patients' clinical samples (plasma, cerebrospinal fluid, blood serum) were studied. Standard molecular-biologic, immunologic, and clinic-laboratory methods were used.

**Results.** Diagnosis of human granulocytic anaplasmosis was verified clinically and by laboratory assays for the first time. When blood serum samples were studied using serological techniques HGA antibodies were detected more often than in mites studied using the PCR technique. It indicated about a wider anaplasma incidence and the mite infestation being different in various populations.

**Conclusion.** HGA as a monoinfection and a mixed infection (LB+HGA) can have a rather mild course and the Lyme borreliosis can become complicated when the pathogens reproduce massively in blood cells.

**Key words:** human granulocytic anaplasmosis, Lyme disease, indirect immunofluorescence, enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, immunoglobulins M and G.

#### Адрес для корреспонденции:

Дракина Светлана Алексеевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-32-67.

В. Ф. ЕРЁМИН, Е. Л. ГАСИЧ, С. В. СОСИНОВИЧ,  
М. В. ДОМНИЧ, И. И. КУЧЕРОВ, Е. А. ШИШКИН,  
О. Н. СУЕТНОВ, И. А. КАРПОВ

## МУТАЦИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСА ВИЧ У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ/СПИДОМ, НАХОДЯЩИХСЯ НА ВААРТ И НЕ ПОЛУЧАВШИХ АРТ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Белорусский государственный медицинский университет

**Цель исследования.** Определить мутации резистентности ВИЧ у ВИЧ-инфицированных пациентов, находящихся на ВААРТ, и наивных, не получающих антиретровирусные препараты.

**Материал и методы.** Представлены данные по определению мутаций резистентности у 173 пациентов с ВИЧ/СПИДОМ, 77 из которых находились на ВААРТ, 96 не получали антиретровирусные препараты. Для выявления резистентных штаммов ВИЧ использовали методы РТ-ПЦР, секвенирование, программы Sequencing Analysis Software v. 5.1.1, BioEdit, SeqScape v. 2.6, MEGA 4.1.

**Результаты.** Из 59 пациентов (взрослые) у 38 (64,4%) (24 мужчины и 14 женщин) выявлена мутация в положении M184V/I, которая является причиной появления высокого уровня резистентности ВИЧ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ). В 27 (45,8%) случаях (13 женщин и 14 мужчин) определялась мутация K103N, ведущая к высокому уровню устойчивости ВИЧ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ). В 20 (33,9%) случаях (16 мужчин и 4 женщины) обнаружили мутацию G190G/S/A, с которой связано появление мутаций высокого уровня резистентности к НИОТ. В 15 (25,4%) случаях (3 женщины и 12 мужчин) определена комбинация мутаций M184V+G190S. У 11 (18,6%) пациентов (6 женщин и 5 мужчин) с ВИЧ-инфекцией обнаружена комбинация мутаций резистентности K103N+M184V. Из 18 детей у 15 (83,3%) (9 девочек и 6 мальчиков) определена мутация в положении M184V, ведущая к высокому уровню резистентности к НИОТ. В 10 (55,6%) и 2 (11,1%) случаях выявлялись мутации в положении G190S и K103S соответственно. У 2 детей определена мутация Y188L, которая ведет к появлению устойчивости ВИЧ высокого уровня к НИОТ. Определено, что распространенность первичных мутаций резистентности вируса к антиретровирусным препаратам в стране является низкой (<5%) для всех их классов.

**Ключевые слова:** ВИЧ, подтипы, ВААРТ, ИП, НИОТ, НИИОТ, резистентность, секвенирование, филогенетический анализ.

Одной из основных причин, влияющих на эффективность высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), является большая степень изменчивости определенных участков генома вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), ведущая к появлению мутаций, ассоциированных с резистентностью к препаратам антиретровирусной терапии (АРТ). В схемах АРТ применяется более 30 препаратов 5 классов, известны мутации в геноме вируса, ведущие к его устойчивости к этим препаратам [1—3]. Вместе с тем в настоящее время альтерна-

тивы ВААРТ не существует, применяющиеся схемы лечения позволяют значительно повысить жизненный статус данной категории пациентов. Своевременное определение мутаций резистентности и, соответственно, смена схемы лечения лежат в основе эффективности ВААРТ.

В Республике Беларусь наблюдается стабильно высокий рост количества случаев ВИЧ/СПИДа. На протяжении последних 5 лет в стране выявляется более 1000 новых случаев ежегодно. На 01.05.2014 в стране официально зарегистрировано 16 315 случаев ВИЧ/СПИДа, тогда как на 01.05.2013 было выявлено 14 663 ВИЧ-инфицированных. Таким образом, за год в стране выявлено 1652 новых случая инфицирования. Наибольшее количество случаев ВИЧ/СПИДа определялось в возрастной группе 15—29 лет (9005), в настоящее время большинство новых случаев ВИЧ-инфекции регистрируется в возрастной группе 30—45 лет, основным механизмом передачи вируса становится сексуальный. Так, если в 2012 г. на его долю приходилось 77,2% от всех новых случаев, то в 2014 г. более 83% пациентов инфицировались при половых контактах.

В настоящее время ВААРТ получают более 5000 пациентов, в 2008 г. — 1200, в 2004 г. — только 15 человек. Прогнозируется, что к 2015 г. АРТ будут получать 7000 пациентов.

Цель исследования — определить мутации резистентности ВИЧ у пациентов с ВИЧ/СПИДОМ, находящихся на ВААРТ, и у пациентов, не получающих АРТ.

### Материал и методы

Мутации резистентности высокого уровня определяли у 77 пациентов (59 взрослых и 18 детей) с ВИЧ/СПИДОМ, находящихся на ВААРТ, за период 2008—2013 гг. Плазма крови от 96 пациентов с первично выявленным ВИЧ/СПИДОМ, не получающих АРТ, была исследована на наличие первичных мутаций резистентности. Для определения мутаций использовали коммерческую тест-систему «ViroSeq™ HIV-1, HIV-1 genotyping system v. 2.0» («Abbott», США) с аналитической чувствительностью  $2 \cdot 10^3$  копий РНК/мл. Набор позволяет секвенировать участок гена *pol* ДНК ВИЧ-1, кодирующего синтез протеазы и 2/3 обратной транскриптазы (1800 п. н.). Электрофорез фрагментов ДНК после секвенирующей ПЦР проводили на генетическом анализаторе «ABI PRISM 3100-Avant» («Applied Biosystems», США).

Анализ полученных фрагментов и определение мутаций резистентности ВИЧ к препаратам АРТ осуществляли с использованием коммерческой базы данных «ViroSeq HIV-1 genotyping system software v. 2.6 analysis» («Abbott», США) и Stanford University «HIV Drug Resistance Database», а также с применением программных продуктов «Sequencing Analysis Software v. 5.1.1», «BioEdit», «SeqScape v. 2.6».

Для филогенетического анализа полученных фрагментов использовали программу «Mega 4.1» (дерево с корнем построено методом присоединения соседей).

### Результаты и обсуждение

**Пациенты с ВИЧ, получающие ВААРТ.** Из 59 пациентов (взрослые), у которых выявлен вирус с высоким уровнем резистентности к препаратам ВААРТ, было 39 мужчин (средний возраст  $37,2 \pm 4,8$  года) и 20 женщин (средний возраст  $33,9 \pm 4,9$  года). При гетеро-и/или гомосексуальных контактах инфицировались 20 пациентов (6 мужчин и 14 женщин), 39 (33 мужчины и 6 женщин) — парентерально при совместном внутривенном введении наркотических препаратов. Из Минской области было 35 пациентов, по 8 из Брестской области и Минска, 5 человек из Гомельской и 3 — из Витебской. Носителями подтипа A1 ВИЧ-1 являлись 55 (93,2%) пациентов, 3 (6%) были инфицированы рекомбинантными формами CRF06\_crx и CRF03\_AB, 1 (2%) пациент — подтипом В (рис. 1). Стаж заболевания 10 лет и более имели 29 (49,2%) пациентов, 25 (42,4%) — от 5 до 9 лет и 5 (8,4%) человек — менее 5 лет. На момент исследования 40 пациентов (25 мужчин и 15 женщин) получали AZT+3TC+NVP (EFV), 7 (5 мужчин и 2 женщины) находились на схеме FTC+TDF+NVP, 12 — на других схемах терапии и 1 не получал антиретровирусные препараты (АРП). Проведенный анализ результатов секвенирования по гену *pol* показал, что чаще всего в анализируемой группе пациентов встречались мутации резистентности к нуклеозидным (НИОТ) и нунуклеозидным (ННИОТ) ингибиторам обратной транскриптазы (рис. 2). У 38 (64,4%) пациентов (24 мужчины и 14 женщин) выявлена мутация в положении M184V/I, которая является причиной появления высокого уровня резистентности ВИЧ к НИОТ. В 27 (45,8%) случаях (13 женщин и 14 мужчин) выявлялась мутация K103N, определяющая высокий уровень устойчивости ВИЧ к ННИОТ. В 20 (33,9%) случаях (16 мужчин и 4 женщины) обнаружили мутацию G190G/S/A, с которой связано появление мутаций высокого уровня к ННИОТ. У 11 (18,6%) и 8 (13,6%) пациентов обнаружены мутации T215F и K70R, определяющие снижение чувствительности к AZT, d4T и ADC, а также AZT, d4T и TDF соответственно. В 15 (25,4%) случаях (3 женщины и 12 мужчин) определена комбинация мутаций M184V+G190S. У 11 (18,6%) пациентов (6 женщин и 5 мужчин) с ВИЧ-инфекцией обнаружена комбинация мутаций резистентности K103N+M184V.

В 29 (49,2%) случаях мутации резистентности высокого уровня определялись у пациентов, имеющих стаж болезни 10 лет и более. У 25 (42,3%) пациентов он составлял 5—9 лет и только у 5 (8,5%) пациентов — менее 5 лет. В 45 (76,3%) случаях мутации резистентности выявлялись у пациентов, имеющих стаж лечения 2—4 года, у 10 пациентов — менее 2 лет и у 4 пациентов — 5 лет и более.

Из 18 детей, рожденных ВИЧ-инфицированными матерями, 9 были мужского пола в возрасте  $10,2 \pm 1,7$  года и 9 женского — в возрасте  $9,9 \pm 3,6$  года. Из Минской области — 7 детей, из Гомельской — 5, по 2 — из Могилевской и Минска, по 1 — из Витебской и Брестской областей. Инфицированы подтипом A1 ВИЧ-1 16 детей, 1 ребенок — CRF02\_AG и 1 ре-

бенок — URF (рис. 3). В 15 (83,3%) случаях (9 девочек и 6 мальчиков) установлена мутация в положении M184V, определяющая, как сказано выше, высокий уровень резистентности к НИОТ. В 10 (55,6%) и 2 (11,1%) случаях выявлялись мутации в положении G190S и K103S соответственно. Они вызывали резистентность высокого уровня к ННИОТ (рис. 4). У 2 детей определена мутация Y188L, которая ведет к появлению устойчивости ВИЧ высокого уровня к ННИОТ. В 4 случаях мутация резистентности в положении M46I/L вызвала снижение чувствительности к ингибиторам протеазы ВИЧ: индинавиру (IDV/r), нелфинавиру (NFV), фосампренавиру (FPV/r), лопинавиру (LPV/r) и атазанавиру (ATV/r) в присутствии других мутаций. В 9 (50%) и 6 (33,3%) случаях определялись мутации T215F и K70R соответственно, 8 и 3 случаях — мутации K101EQH и Y181CFGV соответственно. Мутация K101EQH снижает чувствительность ВИЧ-1 к NVP, EFV и ETR, мутация Y181C/I/V определяет высокий уровень резистентности к NVP и DLV.

У 14 детей (8 девочек и 6 мальчиков) обнаружены разные комбинации мутаций, ведущие к резистентности высокого уровня.

Чаще всего мутации высокого уровня встречались у детей со стажем болезни 10 лет и более (50%) и 5—9 лет (44,4%). У 8 детей мутации высокого уровня определяли после 2—4 лет от начала лечения, у 6 — после менее чем 2 лет от начала терапии.

Как показали проведенные исследования, и у взрослых, и у детей, находящихся на ВААРТ, примерно с одинаковой частотой встречались мутации M184V и G190S. В то же время у детей реже определялась мутация K103N. Появление мутаций резистентности высокого уровня связано со стажем заболевания. Более 90% от всех пациентов (94,4% — дети и 91,5% — взрослые), у которых были определены мутации резистентности высокого уровня, имели стаж заболевания от 5 лет и более (стаж заболевания считается от момента выявления пациента и постановки Western blot, но пациенты могут быть с «продвинутой» ВИЧ-инфекцией, в том числе и в стадии СПИДа). Таким образом, выявление пациентов на ранних стадиях заболевания и, следовательно, своевременное назначение им соответствующих схем АРТ позволит повысить качество их лечения. Чаще мутации определяли у пациентов через 2—4 года от начала лечения. Так, например, у 45 (76,3%) взрослых и у 8 (50%) детей, через 2—4 года после начала приема АРП выявлены мутации резистентности высокого уровня. Настораживает тот факт, что у 6 (33,3%) детей мутации резистентности высокого уровня были определены менее чем через 2 года от начала терапии. Этот факт указывает на необходимость тщательного контроля приема АРП детьми, проживающими в неблагополучных семьях. В целом можно говорить о хорошей приверженности пациентов к терапии, только 18,8% обследованных имели мутации резистентности высокого риска, 39 (66,1%) из 59 взрослых относились к IDUs, у которых, как известно, не всегда высокая приверженность к терапии [4, 5].

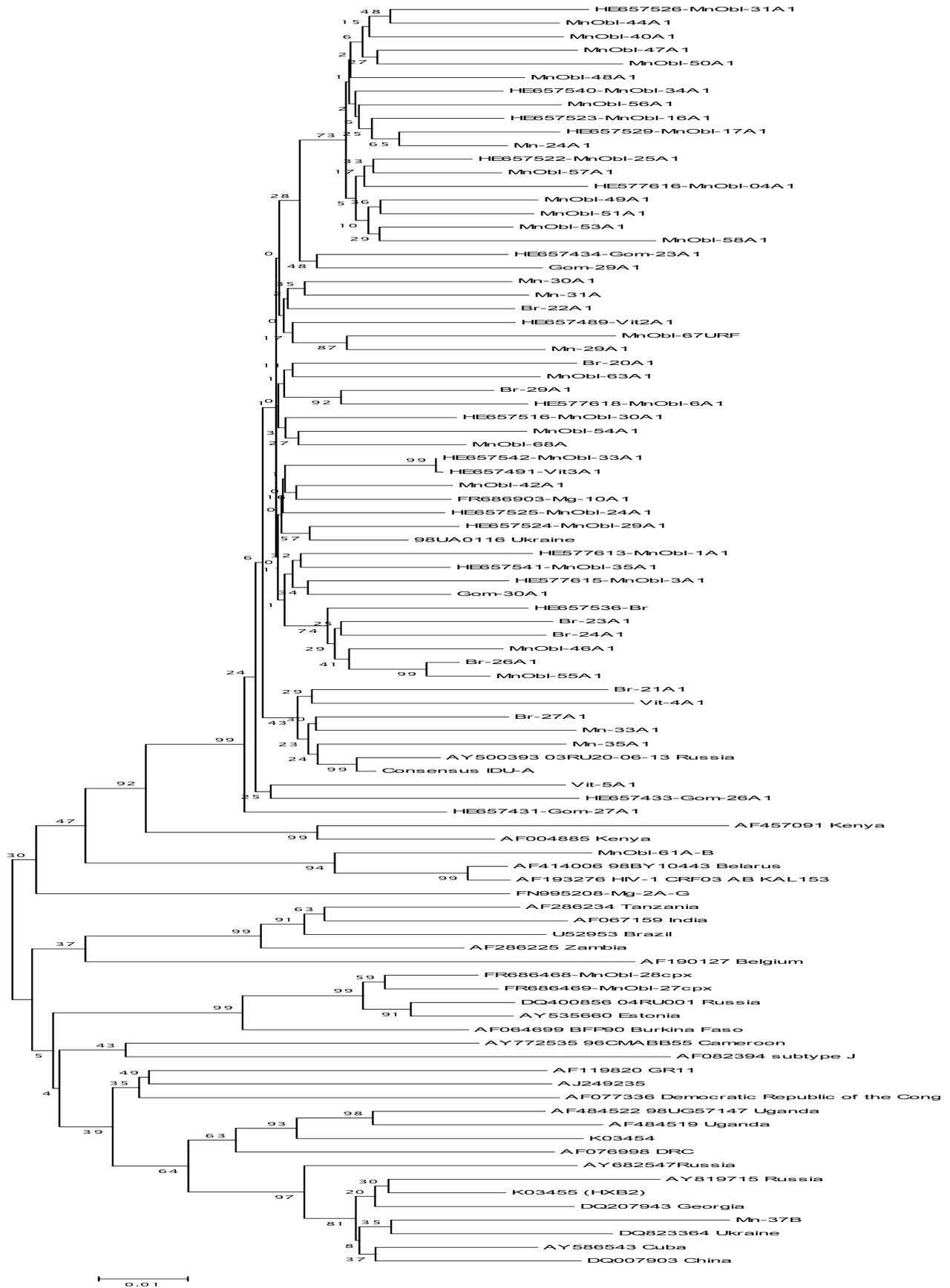


Рис. 1. Филогенетический анализ фрагментов ДНК по участку гена *pol* у взрослых пациентов, находящихся на ВААРТ

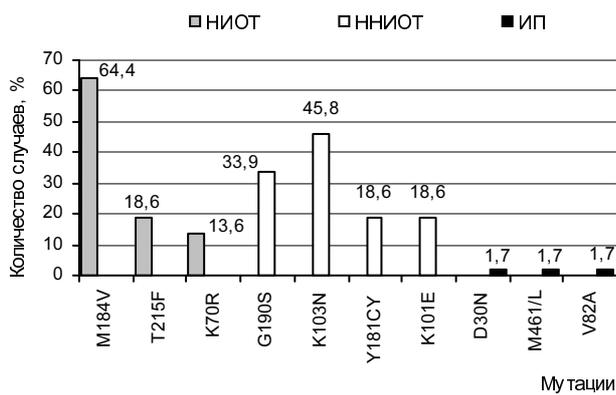


Рис. 2. Мутации резистентности, выявленные у взрослых пациентов, находящихся на ВААРТ

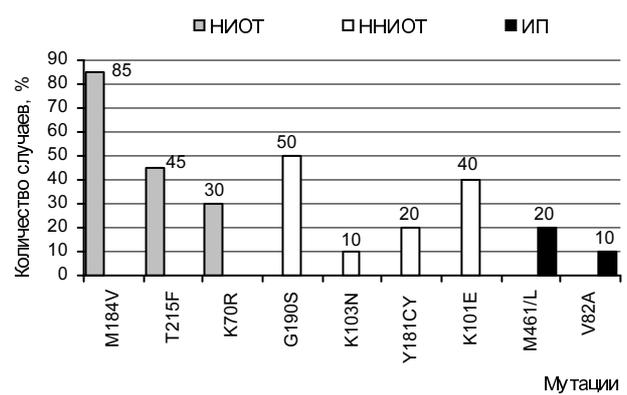


Рис. 4. Мутации резистентности, выявленные у детей, получающих ВААРТ

**Наивные пациенты.** Собраны 96 образцов сыворотки/плазмы крови у ВИЧ-инфицированных пациентов, не получавших АРП, 82 образца секвенированы и проанализированы. Из 82 проб 43 (51,8%) взяты у лиц женского пола, средний возраст пациентов составил 32—36 лет. У 67 (81,7%) пациентов ВИЧ-инфекция диагностирована 1—3 года назад. Проведенные секвенирование и филогенетический анализ полученных фрагментов ДНК показали, что из 82 образцов 74 (90%) относились к подтипу A1, 4 (4,9%) — B, 3 (3,7%) — к рекомбинантной форме CRF03\_AB, 1 — к подтипу G (рис. 5). Вирусы подтипа A1 формировали 3 большие группы. Самая большая включала 35 образцов, в основном из Светлогорска, в котором, как известно, в 1996 г. произошла вспышка ВИЧ-инфекции среди инъекционных наркопотребителей, связанная с так называемым светлогорским вариантом подтипа A1 [6]. Средняя р-дистанция между образцами внутри группы составила 0,039 и варьировала от 0,012 до 0,069, что может указывать как на циркуляцию старых вирусов, так и на новые случаи инфицирования. Вторая группа состояла из 24 проб и формировалась в основном за счет образцов из Гродненской области и Минска. Как известно, в начале 2000-х годов в Гродненской области отмечалась вспышка ВИЧ-инфекции среди инъекционных наркопотребителей, связанная с A1-подтипом вируса. Все образцы располагались вокруг референс-последовательностей из Украины AF413987, России AY500393 и консенсусной последовательности IDU-A (консенсус составлен на основании сиквенса ВИЧ-1, изолированного от внутривенных наркопотребителей из Светлогорска). Средняя р-дистанция равнялась 0,040 и варьировала от 0,026 до 0,056, что может свидетельствовать как о длительной циркуляции вируса в данной популяции, так и о новых случаях инфицирования. Третья группа включала 12 образцов, полученных от пациентов из Минской области, Солигорска и Слуцка, где в начале 2000-х годов была отмечена вспышка среди инъекционных потребителей наркотиков. Средняя р-дистанция между образцами в данной группе составила 0,039 и варьировала от 0,023 до 0,056, что указывало как на циркуляцию ранее занесенного в данную популя-

цию вируса, так и на недавние случаи инфицирования. ВИЧ-1 из данной группы был обозначен как «Солигорский». Образцы AF873832, FR87227 и FR873141 располагались отдельно от других групп, что может свидетельствовать о независимом проникновении данных вариантов вируса на территорию страны.

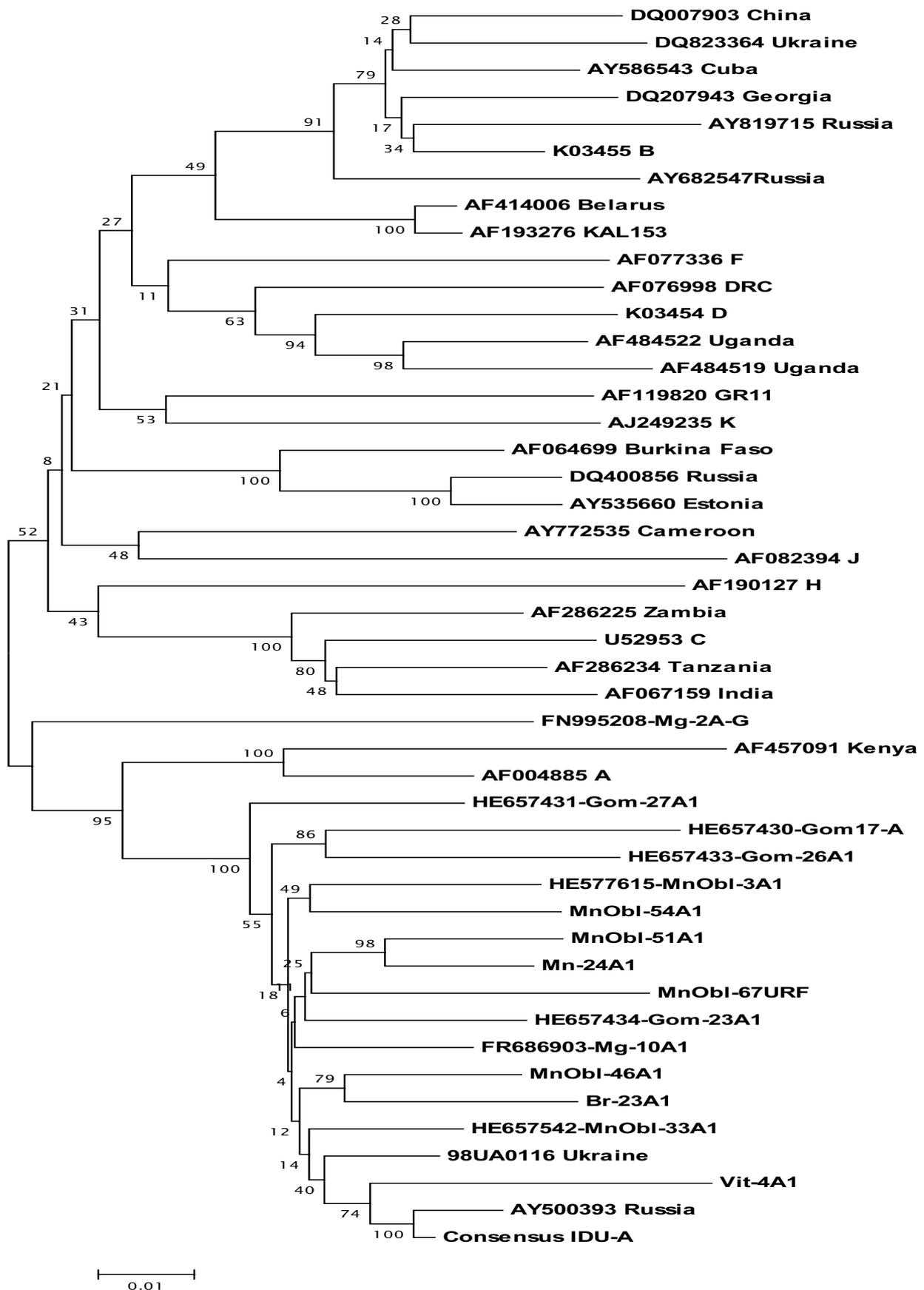
Мутации, ассоциированные с устойчивостью ВИЧ к АРП, имели 5 (6,1%) последовательностей ДНК ВИЧ-1, 2 (2,4%) мутации — в положении T69I, они определяли устойчивость ВИЧ к НИОТ, 3 (3,7%) — в M46L/I, они вызывали устойчивость к ингибиторам протеазы (ИП). Таким образом, в соответствии с методом оценки ВОЗ, определяющим первичные мутации резистентности ВИЧ отдельно к каждому классу препаратов, было определено, что распространенность первичных мутаций резистентности вируса к АРП является низкой (<5%) для всех их классов.

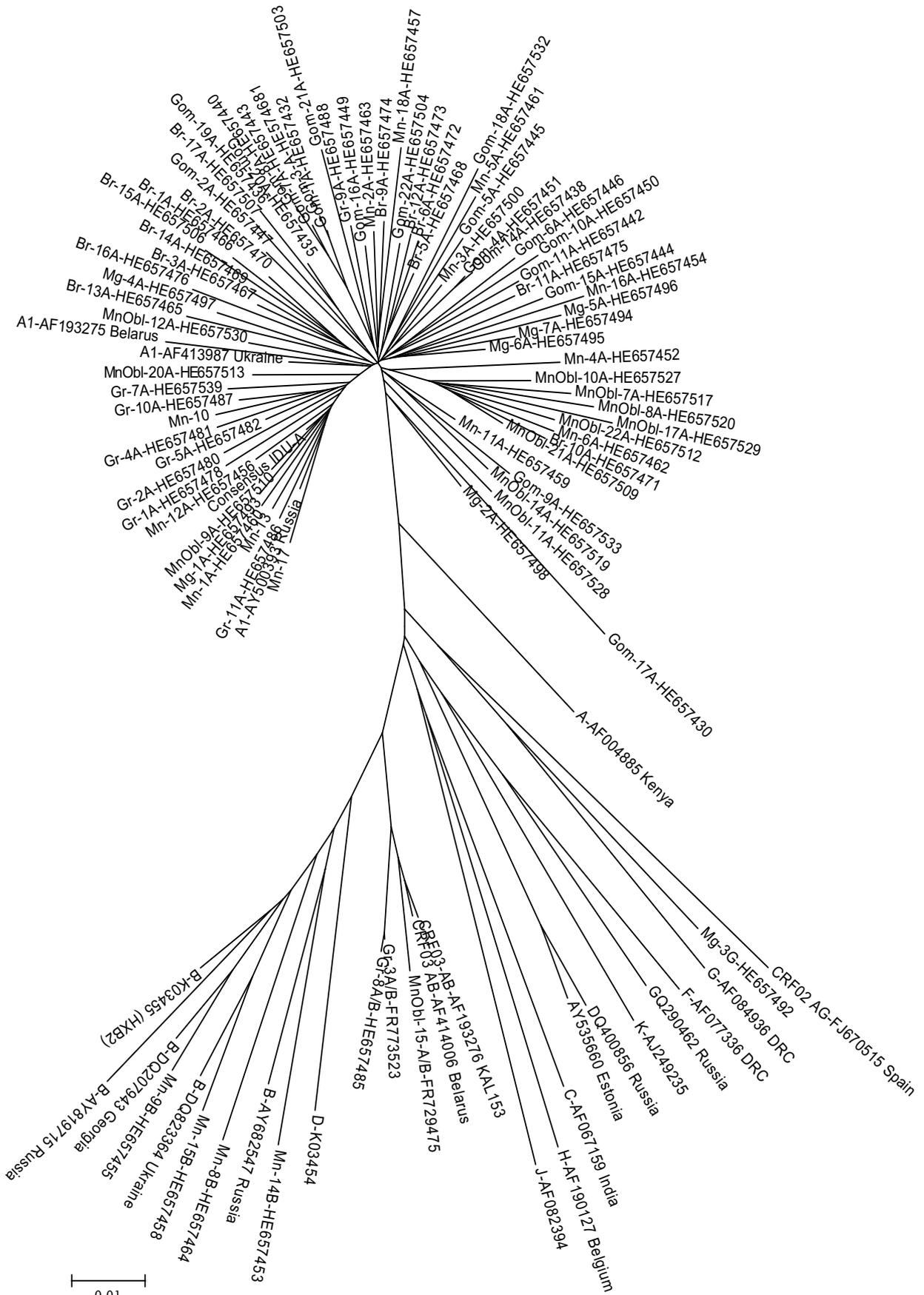
Шесть (7,3%) образцов имели мутации, включенные в перечень ВОЗ и базу данных Стэнфордского университета и относящиеся к так называемым минорным мутациям, не ведущим к значительному изменению чувствительности вируса к АРП: L10V — минорная мутация, связанная с резистентностью ВИЧ к ИП; L33F — минорная мутация, появляющаяся при использовании FPV/r, DRV/r, LPV/r, ATV/r, и TPV/r, ведущая вместе с другими мутациями к снижению чувствительности вируса к ИП; V118I — мутация вместе с другими мутациями к TAM ведет к снижению чувствительности ВИЧ к НИОТ: ЗТС и FTC; T74S — мутация, ассоциированная со снижением чувствительности к NFV; V108I — определяет low-level устойчивость к NVP и EFV.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ подобные исследования при низкой распространенности первичных мутаций резистентности у наивных пациентов должны быть повторены через 2 года, при этом смена схем АРВ-терапии не требуется.

Все последовательности участков генов *gag-pol* зарегистрированы в Международной базе данных GenBank.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Глобального фонда, проекта международной технической помощи «Профилактика и лечение

Рис. 3. Филогенетический анализ фрагментов ДНК по участку гена *pol* у детей, находящихся на ВААПТ

Рис. 5. Филогенетический анализ фрагментов ДНК по участку гена *rol* у наивных пациентов, не получающих ВААРТ

ВИЧ/СПИДа в Республике Беларусь» и Belarusian Office of World Health Organization (Minsk), которым мы выражаем искреннюю благодарность.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Boyer P. L., Sarafianos S. G., Arnold E., Hughes S. H. // *J. Virol.*— 2002.— Vol. 76.— P. 9143—9251.
2. Casado J. I., Moreno A., Hertogs K., et al. // *AIDS Res. Hum. Retrovir.*— 2002.— Vol. 18.— P. 771—775.
3. Kellam P., Larder B. A. // *J. Virol.*— 1995.— Vol. 69.— P. 669—674.
4. Krusi A., Milloy M. J., Kerr T., et al. // *Antivir. Ther.*— 2010.— Vol. 15, № 5.— P. 789—796.
5. Laisaar K. T., Uuskula A., Sharma A., et al. // *AIDS Care.*— 2013.— Vol. 25, № 7.— P. 863—873.
6. Lukashov V. V., Karamov E. V., Eremin V. F., et al. // *AIDS Res. Hum. Retrovir.*— 1998.— Vol. 14.— P. 1299—1303.

Поступила 08.07.14.

#### HIV RESISTANCE MUTATIONS IDENTIFIED IN HIV/AIDS PATIENTS ON HAART AND IN PERSONS NOT RECEIVING ART

V. F. Eremin, E. L. Gasich, S. V. Sosinovich, M. V. Domnich, I. I. Kucherov, E. A. Shishkin, O. N. Suetnov, I. A. Karpov

**Objective.** To identify HIV resistance mutations in HIV/AIDS patients on HAART and in naive patients not receiving ART was the aim of the study.

**Materials and methods.** Results of defining resistance mutations in 163 HIV/AIDS patients including 77 persons on VAART and 96 persons

receiving no anti-retrovirus preparations are presented. For identification of the HIV resistant strains the RT-PCR methods, sequencing technique, software Sequencing Analysis Software v. 5.1.1, BioEdit, SeqScape v. 2.6, MEGA 4.1 were used.

**Results.** Of 59 patients (adults) 38 (64.4%) persons (24 males and 14 females) had the M184V/I mutation which was the reason of development of a high level HIV resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). In 27 (45.8%) cases (13 females and 14 males) the K103N mutation resulting in a high level HIV resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) was defined. In 20 (33.9%) cases (16 males and 4 females) the G190G/S/A mutation associated with development of a high level HIV resistance to NNRTIs was found. In 15 (25.4%) cases (3 females and 12 males) the combination of M184V+G190S mutations was identified. At 11 (18.6%) patients (6 females and 5 males) the combination of K103N+M184V mutations was found. Among 18 children in 15 (83.3%) cases (9 girls and 6 boys) the M184V mutation resulting to a high level resistance to NRTIs was identified. In 10 (55.6%) cases and 2 (11.1%) cases the G190S and K103S mutations were identified, respectively. Two children had the Y188L mutation resulting in development of a high level HIV resistance to NNRTIs.

**Conclusion.** It was defined that prevalence of primary HIV resistance mutations to antiretroviral preparations in the country was low (<5%) for each class of anti-retroviral compounds.

**Key words:** HIV, subtypes, HAART, PI, NRTI, NNRTI, resistance, sequencing, phylogenetic analysis.

#### Адрес для корреспонденции:

Ерёмин Владимир Федорович.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, Минск, ул. Филимонова 23; сл. тел. (8-017) 268-04-16.

Е. П. СЧЕСЛЁНОК, П. А. СЕМИЖОН, Т. В. ШКОЛИНА,  
Е. Г. ФОМИНА, Н. А. ДУБКОВ, А. С. ВЛАДЫКО

## ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА НУКЛЕОКАПСИДНОГО БЕЛКА ВИРУСА МАРБУРГ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

**Цель исследования.** Клонирование, экспрессия в прокариотической системе и характеристика рекомбинантного полипептида, представляющего антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Марбург.

**Материал и методы.** В качестве исходного материала в работе использован вирус Марбург, штамм Voege, полученный из специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Для экспрессии рекомбинантного белка использовали бактериальный штамм *E. coli* BL21 (DE3). Использованы стандартные генно-инженерные, молекулярно-биологические и серологические методы исследования.

**Результаты.** С использованием генно-инженерных методов исследования получена гибридная векторная конструкция рJC40/NP MAR, обеспечивающая экспрессию рекомбинантного полипептида вируса Марбург в прокариотической системе *E. coli*, штамм BL 21 (DE3). Показана возможность использования высокоочищенного рекомбинантного полипептида для выявления специфических антител к вирусу Марбург методом иммунного блоттинга.

**Заключение.** Сконструирована плазида рJC40/NP MAR, в прокариотической системе *E. coli* экспрессирован рекомбинантный полипептид, представляющий антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Марбург. Получен очищенный рекомбинантный полипептид вируса Марбург, не содержащий примесей бактериальных белков, обладающий антигенными свойствами.

**Ключевые слова:** вирус Марбург, генно-инженерная конструкция, экспрессия, рекомбинантный полипептид, очистка белков, металлохелатная аффинная хроматография, гель-фильтрация, иммуноблоттинг.

Развитие международных интеграционных и экономических процессов, межэтнические и культурные контакты, миграционные потоки населения в силу экологических или экономических факторов приводят к возникновению новых или расширению ареалов известных опасных и особо опасных природно-очаговых инфекционных заболеваний.

Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний представляет собой важное звено системы здравоохранения. Профилактика и лечение любого заболевания значительно облегчается ранней и точной идентификацией вызвавшего его патогенного микроорганизма. Одним из основных путей создания эффективных диагностических препаратов для выявления возбудителей инфекционных заболеваний является серодиагностика, основанная на аффинном взаимодействии антигенов и вырабатываемых к ним антител. Для серодиагностики могут использоваться как нативные антигены (бактериальные клетки, вирусные частицы, нативные белки), так и синтетические молекулы. При-

менение рекомбинантных полипептидов, создаваемых современными генно-инженерными методами, является наиболее перспективным направлением в разработке иммунобиологических диагностикумов, поскольку практически исключается работа с опасными агентами. Использование в иммунобиологических тест-системах в качестве антигенов рекомбинантных полипептидов предполагает чрезвычайно высокие требования к степени их очистки для достижения высоких качественных показателей: специфичности и чувствительности диагностических тестов.

Проблема диагностики и лечения острых геморрагических лихорадок очень актуальна в настоящее время. Являясь природно-очаговыми вирусными заболеваниями, они характеризуются общими клиническими проявлениями независимо от природы возбудителя: развитием геморрагического синдрома на фоне остролихорадочного состояния. Лихорадка Марбург, входящая в их число, является особо опасной вирусной инфекцией, этиологическим агентом которой является РНК-геномный вирус из семейства *Filoviridae* [1].

Целью настоящего исследования явилось создание векторной конструкции, обеспечивающей экспрессию в прокариотической системе рекомбинантного полипептида, включающего антигенные детерминанты нуклеокапсидного белка вируса Марбург; получение и возможность использования высокоочищенного рекомбинантного полипептида в качестве антигена для выявления специфических антител к вирусу Марбург методом иммунного блоттинга.

### Материал и методы

В работе использовали вирус Марбург, штамм Voege, полученный из специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь и референс-сыворотку, содержащую антитела к вирусу Марбург, полученную от доктора MacCormik (США). В качестве экспрессирующего вектора применяли бактериальный штамм *E. coli* BL21 (DE3).

Топологический анализ аминокислотной последовательности нуклеокапсидного белка вируса Марбург с целью поиска антигензначимых участков проводили с использованием авторской компьютерной программы «wxGeneVee». За основу в данной программе взяты шкалы гидрофобности и гидрофильности, предложенные Hopp and Woods (1981) и Kyte and Doolittle (1982), критериями оценки которых являются такие параметры, как растворимость, заряд, удаленность от NC-остова, наличие спиралей, наличие сульфгидрильных остатков.

В качестве исходной матрицы для постановки обратной транскрипции брали вирусную РНК, которую получали из вируссодержащей культуральной жидкости. Выделение РНК осуществляли с помощью коммерческого набора реагентов «NucleoSpin RNA» (MACHERY-Nagel) согласно прилагаемой инструкции.

Олигонуклеотидные последовательности (праймеры) для амплификации фрагмента ДНК, кодирующего участок нуклеокапсидного белка вируса Марбург: PrD1 NC Marburg: 5'-CGCGAAGCTTATTGAGCACGAATCT-3' (прямой) — положение в последовательности: с 1427 по 1441 н. о.; PrR2 NC Marburg: 5'-GCGCCTCGAGCAAGTTCATCGCAACATG-3' (обратный) — положение в последовательности: с 2171 по 2188 н. о., были подобраны с использованием программы «Vector NTI» и искусственно синтезированы в ОДО «Праймтех» (Беларусь).

Постановку реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-Л» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Полученную комплементарную ДНК (кДНК) использовали для постановки ПЦР. Состав реакционной смеси: по 25 пмоль праймеров PrD1 NC Marburg, PrR2 NC Marburg, 5 мкл 10x Taq-буфера («Праймтех», Беларусь), 4 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл дНТФ (10 ммоль каждого), 10 мкл ОТ-продукта (кДНК), 2,5 ед. Taq-полимеразы («Праймтех», Беларусь), деионизованная вода до конечного объема 50 мкл. Режим амплификации: 94°C — 2 мин; 94°C — 15 с, 55°C — 45 с, 72°C — 1 мин, количество циклов — 35.

Анализ фрагментов ДНК, синтезированных в ПЦР, проводили методом электрофореза в 1,5—2% агарозном геле. Электрофорез вели при напряжении 10 В/см в трис-ацетатном буфере, pH 8,0. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью окрашивания геля бромистым этидием с последующим просмотром в УФ.

Лигирование фрагментов ДНК проводили в объеме 20 мкл при 22°C в течение часа. В качестве лигирующего фермента использовали «T4 DNA Ligase» («Fermentas», Литва) согласно прилагаемой инструкции.

Подготовку компетентной клеточной культуры, трансформацию клеток плазмидной ДНК проводили согласно описанным ранее методикам [2].

Выделение рекомбинантной плазмидной ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «QIAprep Spin Miniprep Kit» («Qiagen») согласно прилагаемой инструкции.

Рестриктию рекомбинантной ДНК проводили при 37°C в течение 2 ч соответствующими ферментами рестрикции по 1 МЕ каждого в конечном объеме 20 мкл. После инкубации ферменты рестрикции инактивировали в течение 15 мин при 65°C.

Металлохелатную аффинную хроматографию осуществляли на автоматическом жидкостном хроматографе среднего давления «FPLC AKTA Explorer 100» («GE Healthcare») с использованием колонки HisTrap Chelating HP («GE Healthcare») объемом 1 мл в денатурирующих условиях [2, 3].

Анализ рекомбинантного полипептида в полиакриламидном геле (ПААГ) осуществляли согласно методу, предложенному U. Laemmli [4].

Оценку специфичности рекомбинантного полипептида проводили методом иммуноблоттинга согласно методике, описанной ранее [2].

## Результаты и обсуждение

Для получения векторной конструкции, обеспечивающей экспрессию рекомбинантного полипептида, первоначально провели топологический анализ аминокислотной последовательности нуклеокапсидного белка вируса Марбург по профилю гидрофильности аминокислотных остатков (а.о.) с целью поиска участков, являющихся антигензначимыми. В результате в С-концевой части молекулы белка было выявлено 5 гидрофильных участков, которые экспонированы на поверхности молекулы и могут являться потенциальными участками связывания антител. Наиболее протяженный антигензначимый аминокислотный участок, представленный 4 В-сайтами и локализованный в области 442—700 а. о., выбрали для проведения дальнейших исследований.

С использованием специфической пары праймеров в ОТ-ПЦР на матрице РНК вируса Марбург амплифицировали фрагмент ДНК, представляющий нуклеотидную последовательность, кодирующую антигензначимый участок нуклеокапсидного белка вируса Марбург. Размер синтезированного фрагмента ДНК составил 782 пары оснований (п. о.) с учетом дополнительных нуклеотидных последовательностей, представляющих сайты узнавания для ферментов рестрикции и необходимых для последующего клонирования фрагмента в полилинкер плазмидного вектора (рис. 1). Оценку специфичности полученного кДНК-фрагмента осуществляли методом рестрикционного анализа по наличию уникального сайта узнавания для

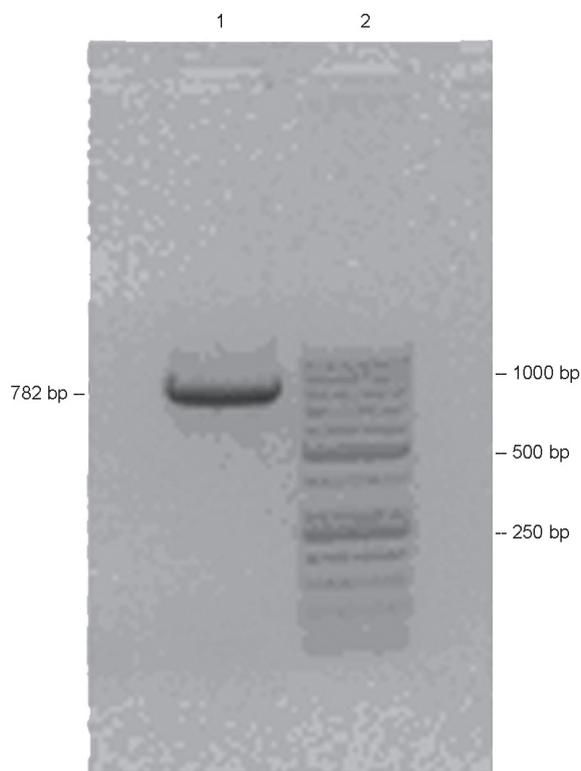


Рис. 1. Электрофоретический анализ фрагмента ДНК вируса Марбург: 1 — фрагмент ДНК, амплифицированный на матрице РНК вируса Марбург; 2 — ДНК маркер 50 bp DNA ladder

специфической рестриктирующей эндонуклеазы *EcoRV* (рис. 2). В результате гидролиза рестриктазой *EcoRV* ДНК-фрагмента, синтезированного на РНК-матрице вируса Марбург, произошло расщепление на 3 специфических участка ДНК размерами 312 п. о., 251 п. о. и 112 п. о. Полученные данные согласуются с данными теоретических расчетов и обусловлены наличием 2 сайтов узнавания для соответствующей рестриктирующей эндонуклеазы в полученной ДНК-последовательности.

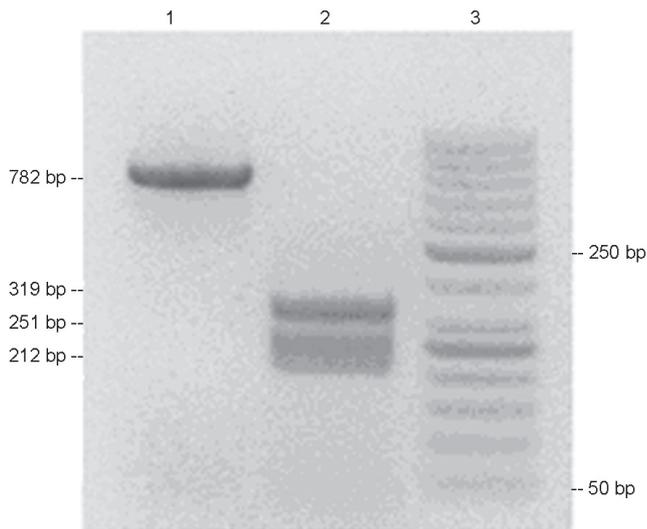


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов рестрикции кДНК-фрагмента, амплифицированного на матрице РНК вируса Марбург: 1 — амплифицированный кДНК-фрагмент; 2 — рестрикция фрагмента амплификации по сайту узнавания для рестриктазы *EcoRV*; 3 — ДНК маркер GeneRuler 50 bp DNA ladder

Для создания генно-инженерной конструкции, содержащей специфический участок генома вируса Марбург, в качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду *rJC40* [5]. Полученный ДНК-фрагмент и исходный вектор *rJC40* последовательно обработали рестриктирующими эндонуклеазами *Hind III* и *BamHI* и лигировали между собой. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм *Dh5 $\alpha$* . Клетки выращивали на твердой селективной питательной среде, содержащей 50 мкг/мл ампициллина. После инкубации в течение ночи при 37°C отдельные колонии клеток рассевали штрихом и выращивали при тех же условиях. Дальнейшее выделение рекомбинантной плазмидной ДНК и последующая ее обработка соответствующими рестриктазами позволили произвести селекцию клеточных клонов, несущих гибридную плазмиду *rJC40/NP MAR*. Для экспрессии рекомбинантного полипептида гибридной плазмидой трансформировали перmissive компетентные клетки *E. coli*, штамм *BL21(DE3)*. Полученные трансформанты выращивали на жидкой питательной среде LB, содержащей 0,2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина. В момент достижения бактериальной культурой оптической плотности  $OD_{600}=0,3$  осуществляли индукцию биосинтеза

рекомбинантного полипептида путем внесения в среду изопропил- $\beta$ -D-1-тиогактопиранозида до конечной концентрации 0,4 ммоль, после чего клетки инкубировали еще в течение 3,5 ч. Оценку уровня экспрессии рекомбинантного полипептида вируса Марбург осуществляли методом электрофоретического анализа в полиакриламидном геле (рис. 3). Гибридный бактериальный штамм *E. coli BL21 (DE3)*, содержащий плазмиду *rJC40/NP MAR*, на фоне подавления синтеза бактериальных белков эффективно экспрессирует рекомбинантный полипептид с молекулярной массой 48 кДа на фоне подавления синтеза бактериальных белков.

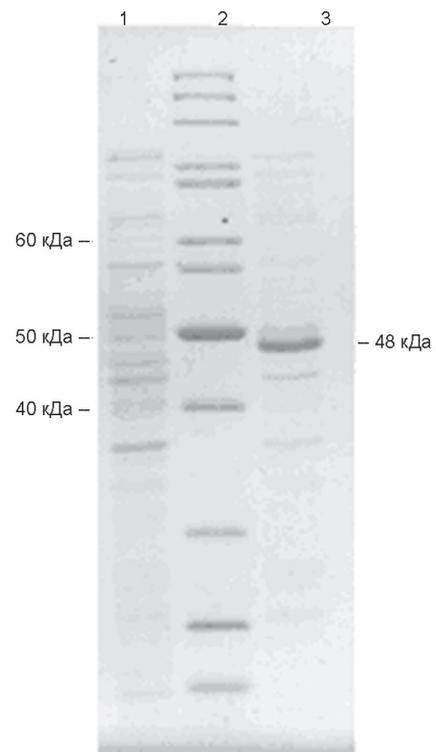


Рис. 3. Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида вируса Марбург в клетках *E. coli*, шт. *BL21(DE3)*: 1 — лизат клеток *E. coli*, шт. *BL21* (контроль); 2 — маркерные белки; 3 — лизат клеток *E. coli*, шт. *BL21*, экспрессирующих рекомбинантный полипептид вируса Марбург

Структура рекомбинантного полипептида, представляющего антигенный участок нуклеокапсидного белка вируса Марбург, представлена на рис. 4. Длина полипептида с учетом векторной части составляет 284 а. о., а молекулярная масса, рассчитанная при помощи компьютерной программы «Protein Calculator», — 32,2 кДа. Однако, как видно из рис. 3, рекомбинантный полипептид распределяется в ПААГ относительно белковых маркеров в области 48 кДа. Известно, что белки с высоким содержанием кислых аминокислотных остатков ( $Asp+Glu > 14\%$ ) и значительным отрицательным зарядом дают аномально высокую молекулярную массу при распределении в ПААГ [6, 7]. Таким образом, полученное несоответствие распределения рекомбинантного полипептида при проведении электрофореза в ПААГ относительно теор-

## 34 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

MGHHHHHHH HHSSGHI EGR HMKLIEH E H E S T E D S S S S S S F V D L N D P F A L L N E D E D T L D D S V  
 MIPGTT S R E F Q G I P E P P R Q S Q D L N N S Q G K Q E D E S T N P I K K Q F L R Y Q E L P P V Q E D D E S E Y T  
 T D S Q E S I D Q P G S D N E Q G V D L P P P L Y A Q E K R Q D P I Q H P A A N P Q D P F G S I G D V N G D I L E P I  
 R S P S S P S A P Q E D T R M R E A Y E L S P D F T N D E D N Q Q N W P Q R V V K K G R T F L Y P N D L L Q T N P P E  
 S L I T A L V E E Y Q N P V S A K E L Q A D W P D M S F D E R R H V A M N L L E D P G P 284  
 Asp+Glu=55

Рис. 4. Аминокислотная структура рекомбинантного полипептида вируса Марбург: выделены а. о. с отрицательно заряженными R-группами

ретически рассчитанной молекулярной массы можно объяснить особенностями аминокислотного состава полученного нами полипептида (содержание Asp+Glu=19%) и наличием высокого отрицательного заряда (при pH 8,80=-37,6).

Очистку полипептида осуществляли в 2 этапа на автоматическом жидкостном хроматографе «АКТА Explorer 100». На 1-м этапе белок очищали методом металлохелатной аффинной хроматографии (MXAX) с использованием колонки HisTrap Chelating HP 1 мл («GE Healthcare») с иммобилизованными катионами Ni<sup>2+</sup>. Поскольку ранее было показано [8], что более полная солюбилизация полипептидов и освобождение остатков гистидина происходят в денатурирующих условиях (в качестве денатурирующего агента была использована 6 М мочевины), все стадии аффинной хроматографии выполняли в присутствии 6 М мочевины. На всех этапах осуществляли измерение оптической плотности при 280 нм относительно связывающего буфера. Фракцию не связавшихся с колонкой белков и фракции элюции анализировали с помощью электрофореза в ПААГ (рис. 5).

На 2-м этапе очистки использовали гель-фильтрацию. Для этого фракции элюции, содержащие реком-

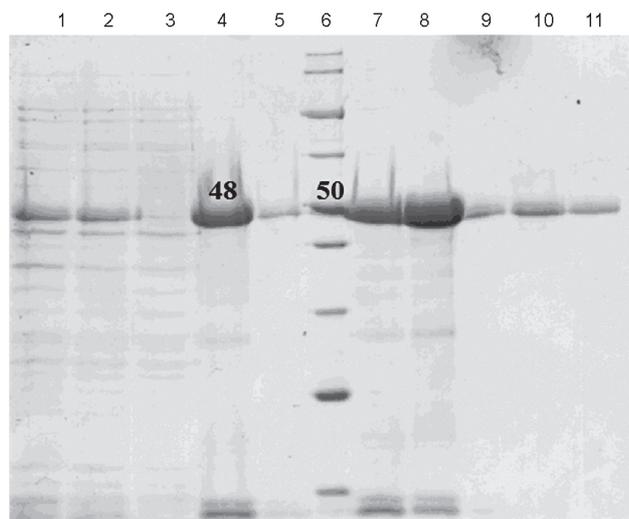


Рис. 5. Электрофоретический анализ рекомбинантного полипептида вируса Марбург в ПААГ: 1 — клеточный лизат, содержащий рекомбинантный полипептид; 2 — лизат после дезинтеграции; 3 — белок, не связавшийся с колонкой при MXAX; 4, 5 — фракции элюции при MXAX; 6 — маркер молекулярных масс; 7 — белок до обессоливания; 8 — обессоленный и сконцентрированный белок; 9—11 — фракции элюции при ГФ

бинантный полипептид (см. рис. 5), полученные в результате проведения металлохелатной хроматографии, объединяли и осуществляли концентрирование белка с постепенным обессоливанием и заменой буфера путем ультрафильтрации через фильтр «Amicon Ultra-4». За-

мену растворов осуществляли в последовательности: 6 М мочевины, 4 М мочевины, 2 М мочевины, буфер для гель-фильтрации (50 ммоль фосфатный буфер, 150 ммоль NaCl, pH 7,0). В качестве контроля наносили пробу на колонку в пробу дополнительно вносили 100 мкг апротинина. Гель-фильтрацию проводили с использованием колонки Superdex 75 («GE Healthcare») с эффективным диапазоном разделения 3000—70 000 М, на автоматическом жидкостном хроматографе «АКТА Explorer 100». Колонку уравнивали двумя объемами буфера (50 ммоль фосфатный буфер, 150 ммоль NaCl, pH 7,0). Пробу наносили на колонку со скоростью 0,5 мл/мин. На всех этапах осуществляли фракционирование (заданный объем фракций — 1 мл) и измерение оптической плотности при длине волны 280 нм относительно буфера (рис. 6). Фракции, соответствующие повышенному уровню оптической плотности, анализировали с помощью электрофореза в ПААГ (см. рис. 5).

Сравнительный анализ в ПААГ последовательных этапов очистки показал, что применение 2-этапной схемы очистки позволило достигнуть требуемой степени чистоты рекомбинантного полипептида. В результате экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* (BL21) с последующей очисткой аффинной металлохелатной хроматографией и гель-фильтрацией на автоматическом жидкостном хроматографе был получен рекомбинантный полипептид вируса Марбург, не содержащий следовых количеств примесей бактериальных белков.

Специфичность очищенного рекомбинантного полипептида вируса Марбург была показана при использовании его в качестве вирусного антигена при постановке иммунного блоттинга. Для сравнения на нитроцеллюлозную мембрану иммобилизовывали рекомбинантный полипептид вируса Мар-

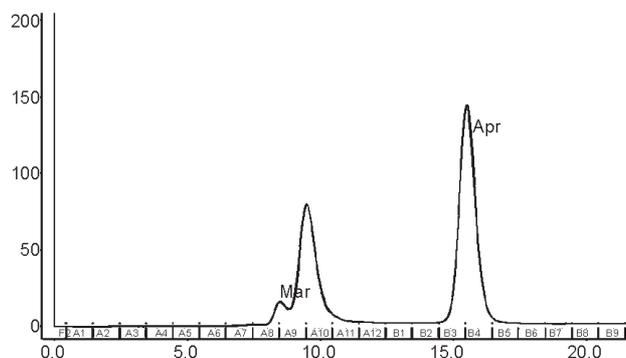


Рис. 6. Очистка рекомбинантного полипептида вируса Марбург гель-фильтрацией

бург, очищенный только методом металлохелатной хроматографии (см. рис. 6), и рекомбинантный полипептид, очищенный дополнительно гель-фильтрацией (см. рис. 6). Далее полипептиды обрабатывали референс-сывороткой, содержащей специфические антитела к вирусу Марбург. Результаты иммуноблоттинга показали, что рекомбинантные полипептиды специфически взаимодействовали с антителами, о чем свидетельствует наличие интенсивных мажорных полос в области, соответствующей распределению рекомбинантного полипептида вируса Марбург — 48 кДа. Однако для рекомбинантного полипептида, очищенного только методом металлохелатной хроматографии, отмечается присутствие неспецифической полосы в области ~27 кДа, в отличие от рекомбинантного полипептида, очищенного в 2 этапа (рис. 7). Применение 2-фазной схемы очистки (металлохелатная хроматография и гель-фильтрация) позволило получить рекомбинантный полипептид вируса Марбург, не содержащий примесей.

Таким образом, с использованием методов генетической инженерии сконструирована гибридная плазида *pJC40/NP MAR*, обеспечивающая экспрессию рекомбинантного полипептида вируса Марбург в прокариотической системе *E. coli*, штамм *BL 21 (DE3)*. Получен высокоочищенный рекомбинантный полипептид, который может быть использован в качестве антигена в диагностической тест-системе для выявления специфических антител к вирусу Марбург методом иммунного блоттинга и других иммунобиологических тестов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Martini G., Siebert R. *Marburg virus disease*.— Berlin, 1971.
2. Семизон П. А., Фомина Е. Г., Школина Т. В. и др. // *Здравоохранение*.— 2006.— № 11.— С. 35—37.
3. Hochuli E., Bannwarth W., Dobeli H., et al. // *Nature Biotechnology*.— 1988.— Vol. 6.— P. 1321—1325.
4. Laemmli U. // *Nature*.— 1970.— № 227.— P. 680—685.
5. Clos J., Brandau S. // *J. Protein Express. Purificat.*— 1994.— Vol. 5.— P. 133—137.
6. Armstrong D. J., Roman A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*— 1993.— Vol. 192.— P. 1380—1387.
7. Garcia-Ortega L., De los Rios V., Martinez-Ruiz A., et al. // *Electrophoresis*.— 2005.— Vol. 26 (Iss. 16).— P. 3407—3413.
8. Белова Н. Ф., Фомина Е. Г., Школина Т. В. и др. // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: Сб. науч. трудов*.— Минск, 2005.— С. 340—346.

Поступила 08.07.14.

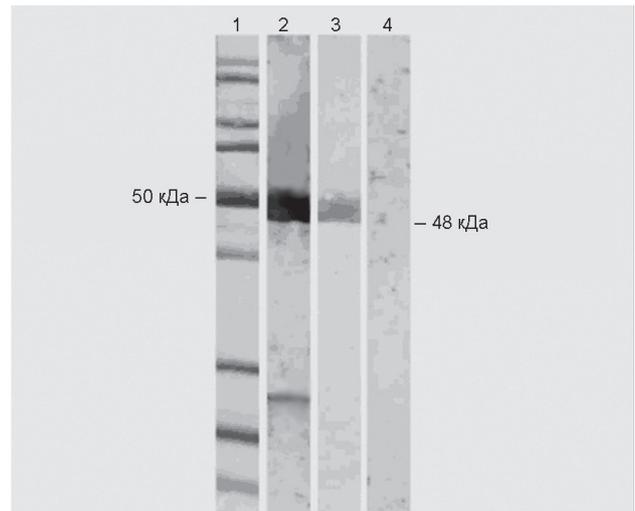


Рис. 7. Оценка специфичности очищенного рекомбинантного полипептида вируса Марбург методом иммунного блоттинга:

- 1 — маркеры молекулярных масс; 2 — рекомбинантный полипептид вируса Марбург, очищенный МХАХ;
- 3 — рекомбинантный полипептид вируса Марбург, очищенный ГФ; 4 — рекомбинантный полипептид, обработанный отрицательной референс-сывороткой (К-)

### PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT POLYPEPTIDE OF NUCLEOCAPSID PROTEIN OF MARBURG VIRUS

E. P. Scheslenok, P. A. Semizhon, T. V. Shkolina, E. G. Fomina, N. A. Dubkov, A. S. Vladyko

**Objective.** Cloning, expression in prokaryotic system and characterization of recombinant polypeptide representing highly antigenic sites of nucleocapsid protein of Marburg virus.

**Materials and methods.** Marburg virus Voegel strain and bacterial strain *E. coli* BL21 (DE3) were used as the starting material in the study. Common genetic engineering, molecular-biological and serological methods were used.

**Results.** A plasmid *pJC40/NP MAR*, containing a small insertion of Marburg virus genome, coding information about the nucleocapsid protein it was constructed. The recombinant polypeptide representing the antigen active domain of the nucleocapsid protein of Marburg virus was expressed in the prokaryotic *E. coli* system. The produced polypeptide possessed antigenic properties as reacted with the specific anti-Marburg serum in western blotting analysis.

**Key words:** Marburg virus, genetically engineered construction, protein expression, recombinant polypeptide, protein purification, immobilized metal-ion affinity chromatography, gel-filtration, Western-blot.

#### 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.

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

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БОКАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ (2010—2014)

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

**Цель исследования.** Изучение эпидемиологических аспектов бокавирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь в эпидемические сезоны 2010—2014 гг.

**Материал и методы.** Исследовали назофарингеальные мазки от госпитализированных детей 0—18 лет. Полученные образцы тестировали на наличие генетического материала следующих респираторных вирусов: гриппа типов А и В, парагриппа 1—4 типов, респираторно-синцитиального вируса, метапневмовируса, риновируса, аденовируса, коронавируса и бокавируса человека (HBoV). Статистическая обработка результатов исследования выполнена на персональном компьютере с использованием коммерческого пакета программы STATISTICA 6.0. Сравнение частоты появления качественных признаков проведено с помощью критерия  $\chi^2$ .

**Результаты.** Отмечена активная циркуляция бокавируса человека на территории Республики Беларусь. ДНК бокавируса человека обнаружена у 13,7% детей. Частота детекции бокавируса в разные сезоны составляла 7,5—22,4%. Показана активность HBoV в осенний период. Он поражает как верхние, так и нижние дыхательные пути с развитием клинической картины острого бронхита либо пневмонии. Нозологические формы HBoV чаще представлены в виде моноинфекции.

**Заключение.** Применение молекулярно-генетических методов (ПЦР) диагностики в повседневной практике позволит расширить эпидемиологические данные о бокавирусной инфекции, будет способствовать определению ее удельного веса в этиологической структуре ОРВИ, а также позволит проводить последующее изучение данного возбудителя.

**Ключевые слова:** бокавирус человека, полимеразная цепная реакция, частота выявления, возрастная структура, сезонность.

Острые респираторные вирусные заболевания (ОРВИ) занимают лидирующее место среди респираторной патологии у детей. Большинство детей переносят в течение года от 3 до 5 эпизодов ОРВИ, причем дети раннего возраста болеют в 2—2,5 раза чаще, чем дети постарше [1]. Частые, затяжные острые респираторные инфекции могут способствовать формированию астматических состояний и хронической патологии органов дыхания [2]. Существует предположение о связи тяжести протекания ОРВИ у детей раннего возраста с последующим высоким риском возникновения у них бронхиальной астмы [3, 4]. Возбудителями ОРВИ могут быть респираторные вирусы, энтеровирусы, коронавирусы, многочисленные бактерии, а также так называемые атипичные микроорганизмы — хламидии, микоплазмы, пневмоцисты, грибы. За последнее десятилетие с развитием молекулярных методов диагностики значительно расширился этиологический спектр возбудителей ОРВИ. Так, в сентябре 2005 г. сотрудники кли-

ники Каролинского университета (Стокгольм, Швеция) описали новый респираторный вирус — бокавирус человека (HBoV), обнаруженный в носоглоточных образцах у детей, госпитализированных с острыми респираторными инфекциями верхних и нижних дыхательных путей [5]. Последующие исследования показали циркуляцию бокавируса во многих странах [6]. Наиболее восприимчивыми к HBoV являются дети раннего возраста. Инфицирование HBoV может приводить к тяжелым заболеваниям верхних и нижних дыхательных путей, требующим госпитализации [5, 6]. Бокавирус человека — это ДНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству *Parvoviridae*, роду *Bocavirus*. Название рода *Bocavirus* произошло в результате комбинации первых букв названий описанных ранее вирусов, принадлежащих к этому роду: бычьего парвовируса (*bovine parvovirus*) и минутного вируса собак (*canine minute virus*) [6]. В настоящее время известно 4 генотипа бокавируса (HBoV 1—4). HBoV 1 является причиной респираторных заболеваний у детей, HBoV 2—4 наиболее часто выявляются у пациентов с симптомами гастроэнтерита. Для диагностики бокавирусной инфекции используют молекулярные методы диагностики (ПЦР и секвенирование), поскольку пока не найдена лабораторная модель для культивирования вируса. Проведенные нами исследования показали циркуляцию бокавируса на территории Республики Беларусь [7, 8], однако выявить эпидемиологические особенности его циркуляции не представлялось возможным вследствие короткого периода наблюдений.

Целью данного исследования явилось изучение эпидемиологических аспектов бокавирусной инфекции у госпитализированных детей в Республике Беларусь в эпидемические сезоны 2010—2014 гг.

### Материал и методы

Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные от детей в возрасте от 0 до 18 лет, госпитализированных с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Использовали клинический материал, полученный из всех административных районов страны с октября 2010 г. по апрель 2014 г. В сезон 2010—2011 гг. исследовали 479 образцов, 2011—2012 гг. — 496, 2012—2013 гг. — 537, 2013 г. — апрель 2014 г. — 576 образцов. Мазки собирали в транспортную среду и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения исследования. Доставку образцов осуществляли с соблюдением холодовой цепи в соответствии с инструкцией «Комплексная диагностика гриппа» от 18.01.2011 № 121-1210 [9]. К каждому образцу прилагалось направление, содержащее паспортные данные пациента, даты заболевания и забора материала, клинический диагноз. Полученные образцы тестировали на наличие генетического материала следующих респираторных вирусов: гриппа типов А и В, парагриппа 1—4 типов (ПГ1—4), респираторно-синцитиального вируса (РС), метапневмовируса (МПВ), риновируса (РВ), аденовируса (АД), коронавируса (КоВ) и бокавируса человека (HBoV). Выделение ДНК и РНК респираторных вирусов проводили с использованием коммерческого набора «Рибо-сорб» («Амплиценс»,

Россия). Выявление генетического материала респираторных вирусов проводили с помощью диагностических наборов «АмплиСенс» (Россия): «Influenza virus A/B-FL», «ОРВИ-скрин».

Амплификацию и анализ результатов исследования проводили на приборе «Rotor Gene 6000», («Corbett research», Австралия).

Статистический анализ результатов осуществляли с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартное отклонение (S), среднюю ошибку средней величины (m). Частоту проявления качественных признаков определяли при сравнении эмпирических распределений с помощью критерия  $\chi^2$ . Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

С октября 2010 г. по апрель 2014 г. исследовали 2090 клинических образцов от госпитализированных детей в возрасте 0—18 лет с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Генетический материал респираторных вирусов выявлен в 1293 (61,9%) случаях. ДНК бокавируса человека обнаружена в 177 (13,7%) образцах. Частота выявления респираторных вирусов в клинических образцах у госпитализированных детей представлена на рис. 1.

Отмечено, что наиболее часто в клиническом материале у госпитализированных детей выявлялись риновирусы (20,3%), РС-вирус (17,3%) и вирусы парагриппа 1—4 типов (15,0%).

Частота встречаемости НВов в этиологической структуре положительных образцов в зависимости от эпидемиологического сезона составляла 7,5—22,4% (рис. 2).

В сезон 2010—2011 гг. частота выявления генетического материала НВов составила 7,5%, 2011—2012 гг. — 22,4%, 2012—2013 гг. — 8,1% и 2013—2014 гг. — 17,4% ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ). Бокавирус стал 4-м вирусом по частоте встречаемости наряду с другими респираторными вирусами. Аналогичные данные были получены зарубежными исследователями [12].

Частота выявления бокавируса в сочетании с другими респираторными агентами составляет 10—90%

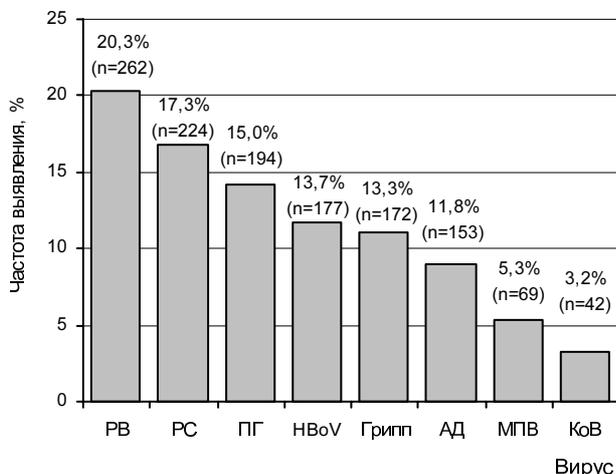


Рис. 1. Частота выявления респираторных вирусов в клинических образцах у госпитализированных детей

[10, 11]. Результаты наших исследований показали, что у 65,5% обследованных детей лабораторно подтверждена моноинфекция НВов и в 34,5% случаев инфекция протекала в виде сочетанных инфекций (рис. 3).

Отмечено, что частота выявления моно- и микст-инфекции НВов зависела от активности циркуляции данного вируса в эпидемические сезоны. При активной циркуляции вируса (сезоны 2011—2012 гг. и 2013—2014 гг.) отмечалась регистрация моноинфекции у детей, при снижении активности НВов (сезоны 2010—2011 гг. и 2012—2013 гг.) — увеличение числа микст-инфекций. Наиболее часто микст-инфекция регистрировалась в сочетании с РВ — 36% случаев, РС-вирусом — 29,5%, вирусом ПГ — 18%, АД — 16,4% ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ), что связано с активной их циркуляцией на территории страны на протяжении всего периода исследования.

При анализе периодичности заболеваемости НВов в разные сезоны выявлена следующая зависимость: если в предыдущий сезон пик активности НВов был низким (2010—2011 гг., 2012—2013 гг.), то в следующий за ним сезон наблюдалось повышение циркуляции НВов (2011—2012 гг., 2013—2014 гг.) (рис. 4).

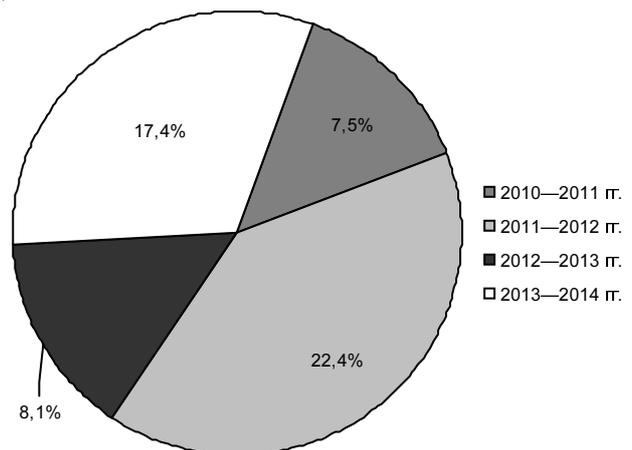


Рис. 2. Частота встречаемости НВов среди положительных образцов за эпидемические сезоны 2010—2014 гг.

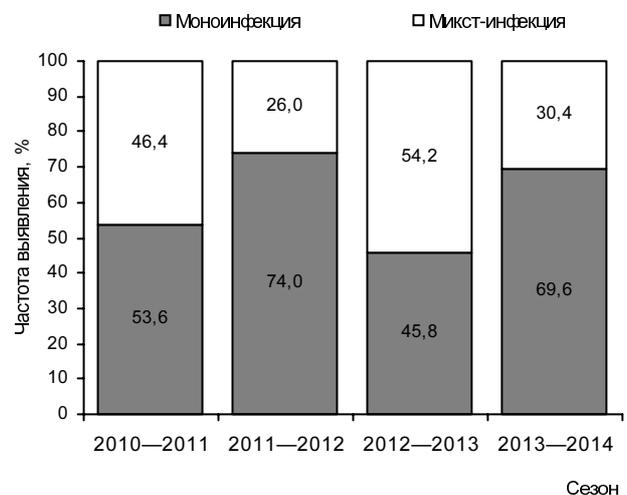


Рис. 3. Соотношение моно- и микст-инфекции НВов в разные сезоны исследования

**38 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней**

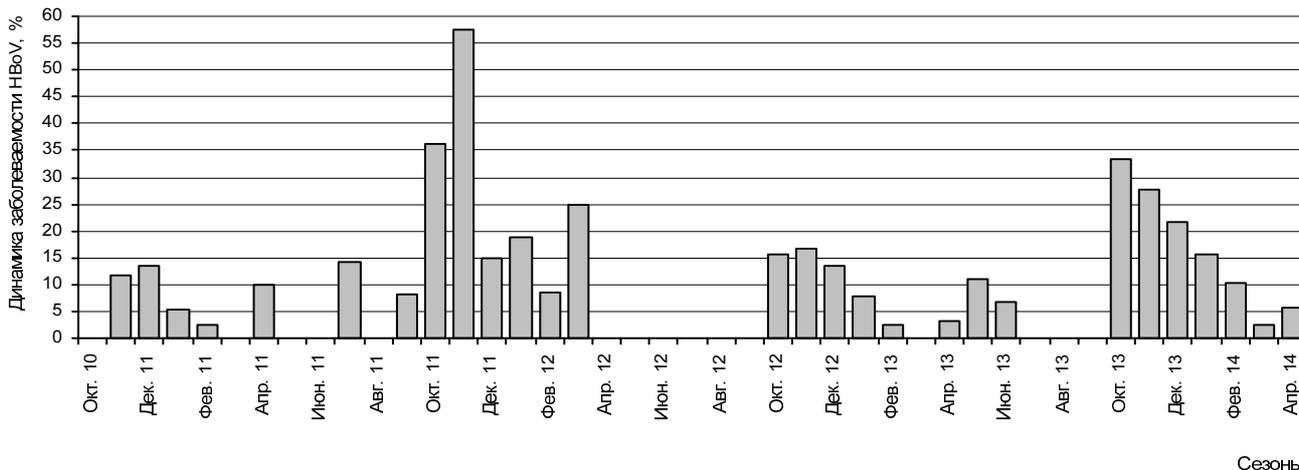


Рис. 4. Заболеваемость НВoV в разные сезоны

Также отмечен подъем заболеваемости бокавирусной инфекцией в осенний период с максимальной частотой выявления НВoV в ноябре. В мазках, забранных в период с января по май, а также в летний период генетический материал бокавируса выявлялся в виде спорадических случаев.

В ходе исследований была определена возрастная группа риска по заболеваемости НВoV. Наиболее восприимчивыми к данной инфекции являются дети в возрасте от 1 года до 3 лет (рис. 5). Среди всех положительных образцов 60,4% относились именно к данной возрастной категории. Низкая заболеваемость детей 1-го года жизни может быть связана с наличием трансплацентарного иммунитета. Вместе с тем если у матери отсутствует типоспецифический иммунитет к определенному типу респираторных вирусов, заболевание возможно и у новорожденного. Отмечено снижение выявления ДНК бокавируса в назофарингеальных мазках, полученных от детей 3—7 и 7—18 лет.

Известно, что бокавирус может вызывать респираторные заболевания верхних и нижних дыхательных путей с различными клиническими проявлениями у детей первых лет жизни [13]. Для изучения нозологических проявлений НВoV провели анализ направлений, сопровождающих каждый клинический образец. Нозологические формы НВoV представлены на рис. 6.

При изучении нозологических форм установлено, что НВoV характеризуется поражением как верхних, так и нижних дыхательных путей. Причем, по результатам наших исследований, данная инфекция протекала с преобладающим поражением нижних дыхательных путей с развитием клинической картины острого бронхита (32,2%) либо пневмонии (19,7%). Практически во всех нозологических формах НВoV чаще выявлялся в виде моноинфекции ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ).

Установлена активная циркуляция НВoV в Республике Беларусь. Частота выявления бокавируса на территории Беларуси характеризовалась неравномерным территориальным распределением (таблица).

Наиболее высокий удельный вес НВoV в структуре всех положительных образцов для каждого адми-

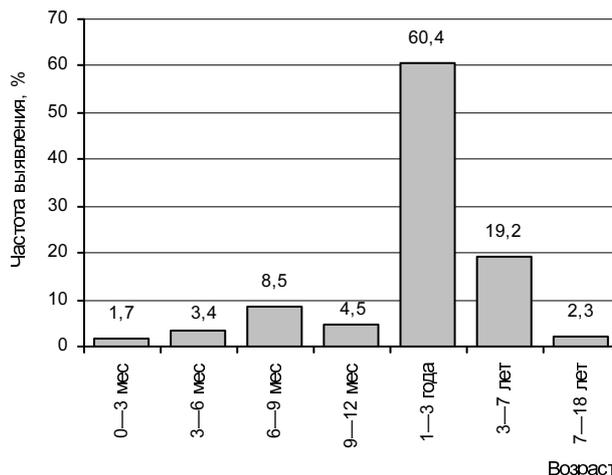


Рис. 5. Частота выявления НВoV у детей разного возраста

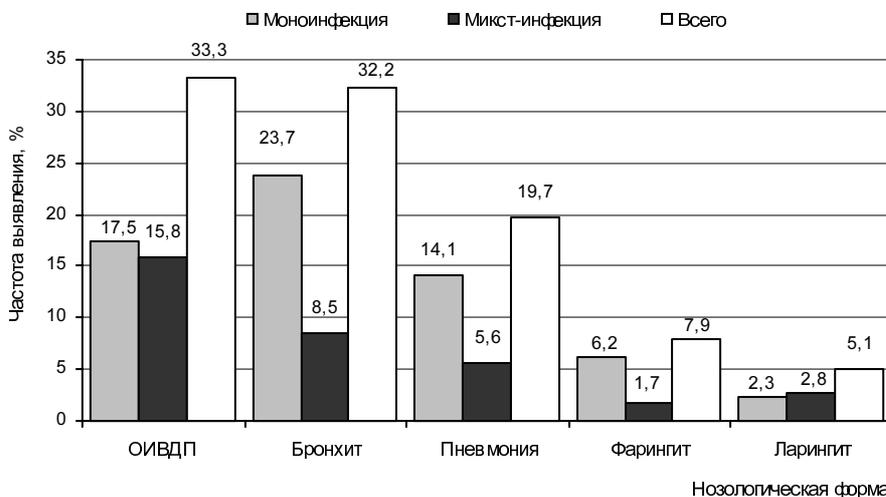


Рис. 6. Нозологические формы НВoV у госпитализированных детей

## Частота выявления НВов в административных районах Республики Беларусь

Административный район	Всего исследованных образцов, абс.	Всего положительных образцов		Всего положительных образцов с НВов	
		абс.	%	абс.	%
Минск	711	507	71,3	61	12,0
Минская область	244	127	52,0	20	15,7
Могилевская область	264	149	56,4	16	10,7
Витебская область	305	213	69,8	40	18,8
Гродненская область	127	63	49,6	11	17,5
Гомельская область	286	182	63,6	24	13,2
Брестская область	153	52	34,0	5	9,6
Всего:	2090	1293	61,9	177	13,7

административного района выявлен в Витебской (18,8%), Гродненской (17,5%) и Минской (15,7%) областях. Самый низкий показатель зафиксирован в Брестской области — 9,6% ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ).

## Выводы

1. За данный период исследований НВов был выявлен в 13,7% назофарингеальных образцах, полученных от госпитализированных детей с острыми заболеваниями верхних и нижних дыхательных путей. Частота выявления НВов составляла от 7,5 до 22,4%. Среди них у 65,5% обследованных детей лабораторно подтверждена НВов моноинфекция и у 34,5% — микст-инфекция.

2. Наиболее часто бокавирусной инфекции подвержены дети в возрасте от 1 до 3 лет. Изучение сезонного распределения инфекций выявило активную циркуляцию бокавируса человека в осенний период. Максимальные показатели частоты выявления НВов были отмечены в ноябре. НВов-инфекция характеризуется поражением как верхних, так и нижних дыхательных путей. Показано преимущественное поражение нижних дыхательных путей с развитием клинической картины острого бронхита либо пневмонии. Практически во всех нозологических формах НВов чаще выявлялся в виде моноинфекции. Наиболее высокий удельный вес данного вируса среди всех положительных образцов выявлен в Витебской, Гродненской и Минской областях. Самый низкий показатель зафиксирован в Брестской области.

3. Внедрение молекулярно-генетических методов (ПЦР) диагностики в повседневную практику расширит эпидемиологические данные о бокавирусной инфекции, будет способствовать определению ее удельного веса в этиологической структуре ОРВИ, а также позволит проводить последующее изучение данного возбудителя.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Овсянников Д. Ю. Острые респираторные инфекции у детей: Учеб.-метод. пособие к изучению курса «Детские болезни». — М., 2011.
2. Jartti T., Jartti L., Ruuskanen O., Soderlund-Venermo M. // *Curr. Opin. Pulm. Med.*— 2012.— Vol. 18, № 3.— P. 271—278.
3. Jackson D., Gangnon R., Evans M., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*— 2008.— Vol. 178, № 7.— P. 667—672.
4. Савенкова М. С. // *Леч. врач.*— 2011.— № 3.— С. 1—8.

5. Allander T., Tammi M. T., Eriksson M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*— 2005.— Vol. 102.— P. 12891—12896.

6. Schildgen O., Muller A., Allander T., et al. // *J. Clin. Microbiol.*— 2008.— Vol. 21.— P. 752—760.

7. Шмелева Н. П., Сивец Н. В., Грибкова Н. В. Изучение спектра возбудителей ОРВИ у госпитализированных детей с применением RealTime PCR: Сб. материалов конф.— М., 2010.— Т. VI.— С. 223—225.

8. Шмелева Н. П., Сивец Н. В., Сергеев Е. Н. и др. // *Мед. журн.*— 2011.— № 4.— С. 129—131.

9. Комплексная диагностика гриппа: Инструкция по применению. Утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 18.01.2011 № 121-1210.

10. Weissbrich B., Neske F., Schubert J., et al. // *BMC Infect. Dis.*— 2006.— Vol. 6.— P. 109—112.

11. Manning A., Russell V., Eastick K., et al. // *J. Infect. Dis.*— 2006.— Vol. 194.— P. 1283—1290.

12. Ahn J. G. // *J. Med. Virol.*— 2014.— DOI 0.1002/jmv.

13. Allander T. // *Clin. Infect. Dis.*— 2007.— Vol. 44.— P. 904—910.

Поступила 08.07.14.

## EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF BOCAVIRUS INFECTION IN BELARUS HOSPITALIZED CHILDREN IN 2010 – 2014

N. V. Sivets, N. V. Gribkova, N. P. Shmeleva

**Objective.** Epidemiological aspects of bocavirus infection in Belarus hospitalized children in 2010—2014 epidemic seasons were the subject of the study.

**Materials and methods.** Nasopharyngeal smears of hospitalized children aged 0—18 yrs were studied. The samples were tested for presence of genetic material of the following respiratory viruses: influenza A and D, parainfluenza type 1—4 (PI 1—4), respiratory syncytial (RC) virus, metapneumovirus (MPV), rhinovirus (RV), adenovirus (AV), coronavirus (CoV), and human bocavirus (HBoV). The results obtained were processed statistically at a personal computer using commercial software STATISTICA 6.0. The qualitative characteristics frequency was compared using the  $\chi^2$  criterion.

**Results.** The human bocavirus was found to circulate actively in the Republic of Belarus. The human bocavirus DNA was identified in 13.7% of children. The bocavirus detection frequency was 7.5% to 22.4% in various seasons. The HBoV was shown to be active during the autumn season. It caused infections of both the upper and the lower respiratory ways demonstrating clinical symptoms of acute bronchitis or pneumonia. The HBoV nosological forms caused mono-infections mostly.

**Conclusion.** Application of molecular genetic methods (PCR) of diagnosis in the everyday practice will make possible extension of epidemiological data on the bocavirus infection, will favor determination of its share in the ARVI etiological structure, and make possible studying the pathogen in future.

**Key words:** human bocavirus, polymerase chain reaction, detection frequency, age structure, seasonal fluctuation.

## Адрес для корреспонденции:

Сивец Наталья Валерьевна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-32-67.

О. О. ЯНОВИЧ, Л. П. ТИТОВ, В. В. ЩЕРБА

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ АЛЬФА-ФНО, ИЛ-1РА И ИНФ-ГАММА У ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь,  
Городская клиническая инфекционная больница Минска

**Цель работы.** Изучить частоту полиморфизма генов цитокинов у пациентов с инфекционным мононуклеозом.

**Материал и методы.** Обследовано 17 пациентов с инфекционным мононуклеозом в возрасте 23,9±1,5 года (14 мужчин и 3 женщины). Контрольную группу составили 28 практически здоровых человек в возрасте 33,7±2,5 года (13 мужчин и 15 женщин).

Геномную ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-сорбВ» (Россия). Полиморфизм генов цитокинов  $\alpha$ -ФНО в позиции –308 и ИНФ- $\gamma$  в позиции +874 определяли аллель-специфической ПЦР, для ИЛ-1 РА — тандемные повторы размером 86 п. о.

**Результаты.** Показано, что наличие аллеля А в позиции –308 гена  $\alpha$ -ФНО достоверно снижено у пациентов с инфекционным мононуклеозом по сравнению с контролем. Выявлено, что сочетание генотипов АА ИНФ- $\gamma$ +874/ГГ ФНО- $\alpha$ –308 достоверно выше у пациентов с инфекционным мононуклеозом по сравнению с лицами контрольной группы.

**Заключение.** Полученные результаты показали, что полиморфизм генов хозяина может оказывать влияние на чувствительность к заболеванию. Дальнейшие исследования по определению комбинаций генотипов позволят выявить лиц с высоким риском развития тяжелой и продолжительной болезни после инфицирования, что будет способствовать проведению индивидуальных профилактических мер.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна—Барр, инфекционный мононуклеоз, цитокины, полиморфизм генов.

Распространение герпесвирусных инфекций является одной из актуальных проблем в медицине и связано как с широкой циркуляцией этих возбудителей среди населения, так и с высокой восприимчивостью человека. Вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ) принадлежит к семейству герпесвирусов и является лимфотропным, вызывающим инфекции иммунной системы. ВЭБ инфицировано более 95% населения земного шара. Клинические проявления вируса Эпштейна—Барр широко варьируют: от бессимптомной формы до острой инфекции с тяжелыми осложнениями [1, 2].

Одним из проявлений инфекционного процесса, вызванного ВЭБ, является инфекционный мононуклеоз (ИМ), характеризующийся лихорадкой, интоксикацией, генерализованной лимфаденопатией, увеличением печени и селезенки и своеобразными изменениями состава элементов крови (появление атипичных мононуклеаров).

Половина населения подвержена первичной инфекции в раннем возрасте, вторая волна заболеваемости приходится на подростковый период [3]. Заболеваемость ИМ в мире составляет 60—100 случаев на 100 000 населения [4]. В России ежегодно регистрируют 40—80 случаев инфекционного мононуклеоза на 100 000 населения [5].

Главный путь проникновения инфекции состоит во взаимодействии белка ВЭБ gp350 со специфическим рецептором CD21 (рецептор для С3b-компонента комплемента) на поверхности В-лимфоцитов. Роль рецептора выполняют молекулы класса II HLA [6]. Еще одним рецептором для белка gp350 ВЭБ является CD35 (рецептор комплемента типа 1) [7].

Одним из важных антигенов, экспрессируемых ВЭБ, является латентный мембранный протеин (LMP-1), отвечающий за трансформацию В-лимфоцитов [8], а мишенью, активируемой вирусным белком, — рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [6, 9].

Часто ВЭБ пожизненно присутствует в организме человека, проявляя высокую адаптацию к его иммунной системе. Его существование зависит от врожденной и специфической иммунной защиты хозяина.

ВЭБ способен самостоятельно реализовывать механизмы иммуносупрессии, не позволяющие иммунной системе взять под контроль инфекционный процесс. Например, белок ВЭБ BCRF-1 имеет 70% гомологии с ИЛ-10 и способствует подавлению синтеза ИНФ- $\gamma$  периферическими мононуклеарами [6, 9, 10]. Другой белок BARF-1 оказывает ингибирующее действие на секрецию ИНФ- $\alpha$  мононуклеарными клетками [11].

Репродукция ВЭБ находится под контролем Т-системы иммунитета. Основным механизмом защиты считают ранний ответ CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов, которые лизируют вирусосодержащие клетки и продуцируют ряд цитокинов [12].

Ген  $\alpha$ -ФНО картирован на хромосоме 6p21.3 в регионе главного комплекса гистосовместимости. Клетками продуцентами  $\alpha$ -ФНО являются многие клетки, в том числе макрофаги, нейтрофилы и активированные Т-лимфоциты. В 1992 г. А. G. Wilson и соавт. идентифицировали транзицию G—A в положении –308 промотора этого гена [13]. Установлено, что аллель –308А ассоциируется с более высокой интенсивностью продукции цитокина.

Ген, кодирующий антагонист рецептора интерлейкин-1 (ИЛ-1РА), расположен в хромосоме 2 и содержит полиморфный участок во 2-м интроне, включающем различное число тандемных повторов размером 86 п. о. [14]. Описано наличие 5 аллелей, из них аллель 2 ассоциируется с различными воспалительными заболеваниями [15, 16]. ИЛ-1 РА продуцируется макрофагами, моноцитами и другими клетками. Его ингибирующий эффект обусловлен способностью связывать рецепторы ИЛ-1, тормозя соединение и последующую сигнальную трансдукцию обеих форм ИЛ-1.

Ген ИНФ- $\gamma$  расположен на 12 хромосоме (12q24.1). Установлено, что точка мутации +874 (интрон 1) расположена в регионе связывания ядерного транскрипционного фактора NFkB и замена в данной позиции может сказываться на транскрипции гена ИНФ- $\gamma$  и, соответственно, на уровне продукции этого регуляторного белка [17]. Показано, что наличие аллели +874Т в гене ИНФ- $\gamma$  сопровождается высокой его

продукцией, тогда как наличие у индивидуума аллели +874А — низкой [18].

Цель работы — изучить частоту полиморфизма генов цитокинов  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-1, ИНФ- $\gamma$  у пациентов с ИМ.

### Материал и методы

Обследованы 17 пациентов с ИМ в возрасте  $23,9 \pm 1,5$  года (14 мужчин и 3 женщины), проходивших лечение в Городской клинической инфекционной больнице Минска. Контрольную группу составили 28 практически здоровых человек (13 мужчин и 15 женщин, средний возраст  $33,7 \pm 2,5$  года).

Геномную ДНК выделяли с помощью набора «ДНК-сорбВ» (Россия).

Для оценки полиморфизма гена ИНФ- $\gamma$  в позиции +874 применяли аллель-специфическую ПЦР. В качестве праймеров использовали следующие последовательности олигонуклеотидов:

F1 — 5'-ttcttacaacacaaaatcaaatca-3';

F2 — 5'- ttcttacaacacaaaatcaaatct-3';

R — 5'-tcaacaagct-gatactcca-3'.

Полиморфизм гена ИЛ-1 РА представляет собой наличие в гене tandemных повторов размером 86 п. о. Для проведения статистической оценки полученных данных проводили объединение аллелей с более чем двумя повторами в группу L, с двумя повторами — в группу 2\*. Для определения числа повторов в гене ИЛ-1 РА использовали следующие праймеры:

F — 5'-ctcagcaacactcctat-3';

R — 5'-tcctggctgcaggtaa-3'.

Для выявления полиморфизма гена  $\alpha$ -ФНО в позиции -308 использовали аллель-специфическую ПЦР. Праймеры для накопления фрагмента гена  $\alpha$ -ФНО были следующие:

F1 — 52-ataggtttgaggggcatcg-32;

F2 — 52-ataggtttgaggggcatcg-32;

R — 52-aagaatcattcaaccagcgg-32.

Анализ продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием этидием бромистым и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).

Для статистического анализа полученных результатов использовали компьютерную программу STATISTICA 8. Данные представлены в виде доли от общего числа. Для сравнения долей применялся метод хи-квадрат, разница считалась достоверной при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследована частота полиморфизма в генах следующих цитокинов: ИНФ- $\gamma$  в позиции +874, ИЛ-1 РА (tandemные повторы),  $\alpha$ -ФНО в позиции -308 (таблица).

Результаты исследования полиморфного локуса -308 гена  $\alpha$ -ФНО показали, что у пациентов с ИМ частота гетерозигот AG достоверно снижена по сравнению с контролем (12,5% против 43,5%,  $P < 0,05$ ). Соответственно наблюдается достоверное снижение частоты аллеля А и тенденция к увеличению частоты аллеля G у пациентов с ИМ.

Анализ встречаемости генотипов гена ИЛ-1 РА показал, что в контрольной группе и у пациентов с ИМ чаще выявлялся генотип L/L (72% и 60% соответственно). Частота встречаемости аллеля 2\* у лиц контрольной группы составляла 16%, у пациентов с ИМ — 23,7%, достоверные различия в распространенности аллелей гена ИЛ-1 РА не обнаружены.

Сравнительный анализ распределения генотипов в отношении полиморфизма ИНФ- $\gamma$  (+874) у здоровых лиц и пациентов с ИМ выявил, что в обеих группах преобладал гетерозиготный генотип AT (47,4% и 52,9% соответственно).

У пациентов с ИМ чаще, чем в контроле встречались гомозиготы с генотипом AA (41,2%), гомозигота TT выявлена только у 1 пациента. Анализ генетических частот аллелей в позиции +874 гена ИНФ- $\gamma$  у пациентов с ИМ и в контроле показал снижение числа лиц с аллелем T.

При анализе сочетанных взаимодействий различных генотипов выявлено, что у пациентов с ИМ сочетания генотипов AA ИНФ- $\gamma$  +874/GG  $\alpha$ -ФНО -308 встречались достоверно чаще (37,5%), чем у лиц контрольной группы (4,3%,  $P < 0,05$ ).

В настоящее время существует множество доказательств связи иммуногенетического статуса хозяина с восприимчивостью или тяжестью течения многих заболеваний.

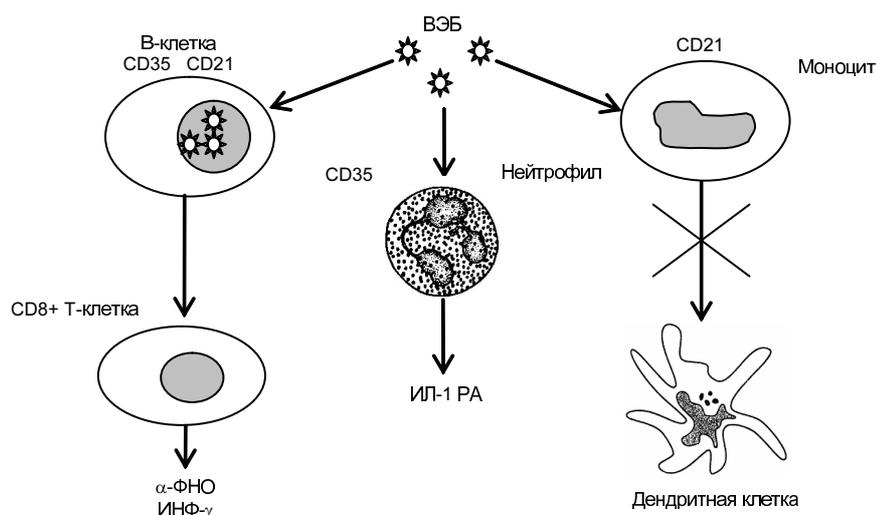
ИМ развивается в виде острой инфекции, при этом подобно другим герпесвирусам ВЭБ может сохраняться в «дремлющем» состоянии в лимфоцитах, частота и сила рецидивов заболевания указывают на отклонения в системе взаимодействия «вирус—хозяин», обусловленные индивидуальными врожденными особенностями защитных реакций хозяина.

Инфицированные ВЭБ клетки миндалин усиленно продуцируют провоспалительные цитокины:  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6. В острую фазу инфекции в крови пациен-

### Частота встречаемости (%) генотипов генов цитокинов у пациентов с инфекционным мононуклеозом

Цитокин	Генотип	ИМ (n=17)	Контроль (n=28)
$\alpha$ -ФНО в позиции -308	AA	0	0
	AG	12,5*	43,5
	GG	87,5	56,5
	A	6,3*	21,7
	G	93,7	78,3
ИЛ-1 РА tandemные повторы	2/2	6,7	4,0
	2/L	33,3	24,0
	L/L	60,0	72,0
	L	76,7	84,0
	2*	23,7	16,0
ИНФ- $\gamma$ в позиции +874	TT	5,9	17,9
	AT	52,9	47,4
	AA	41,2	17,9
	A	67,6	50,0
	T	32,4	50,0

\*Достоверность показателей по сравнению с таковыми в контрольной группе,  $P < 0,05$ .



Действие ВЭБ на клетки иммунной системы

тов с ИМ возрастает уровень ИЛ-1 и ИНФ- $\gamma$  (рисунок) [19, 20]. Заражение ВЭБ сопровождается поликлональной активацией В-лимфоцитов. Основным механизмом иммунной защиты являются ВЭБ-специфические CD8+ цитотоксические Т-лимфоциты, которые выделяют провоспалительные цитокины ( $\alpha$ -ФНО, ИНФ- $\gamma$ ), что приводит к активации макрофагов. Связываясь с поверхностью нейтрофилов, ВЭБ индуцирует в них синтез ИЛ-1 РА, ингибирующего ИЛ-1-зависимые механизмы клеточного иммунитета. Моноциты при ИМ также вовлекаются в инфекционный процесс, очевидно поэтому одним из видов атипичных мононуклеаров являются видоизмененные моноциты [21]. Инфицирование моноцитов ВЭБ ингибирует их дифференцировку в дендритные клетки. Участие моноцитов в иммунном ответе при ИМ также выражается в повышении уровня фермента аденозиндеаминазы в плазме пациентов с инфекционным мононуклеозом [22].

Функциональные полиморфизмы в генах цитокинов могут существенно влиять на их продукцию и, следовательно, на тяжесть и хронизацию заболевания при инфицировании ВЭБ. Существует много исследований роли полиморфизма генов ИФ- $\gamma$ ,  $\alpha$ -ФНО, ИЛ-1 РА при различных заболеваниях. Однако сведений о роли полиморфизма генов цитокинов у пациентов с ИМ мало.

Главным медиатором воспаления является  $\alpha$ -ФНО, он стимулирует иммунную систему во многих ее звеньях, изменяет экспрессию многих цитокинов и ростовых факторов. Отмечено повышение продукции  $\alpha$ -ФНО В-лимфоцитами в ответ на действие ВЭБ [23, 24]. С другой стороны, при стимуляции моноцитов липополисахаридами ВЭБ ингибирует на транскрипционном уровне синтез  $\alpha$ -ФНО на 70—90% [25]. Исследования, проведенные М. S. Wu и соавт., показали наличие достоверной связи аллеля А в позиции -308  $\alpha$ -ФНО с ВЭБ-ассоциированной карциномой желудка [26].

ИЛ-1 РА — важный регулятор воспаления, естественный конкурентный ингибитор, связывающий ре-

цепторы цитокинов ИЛ-1- $\alpha$  и ИЛ-1- $\beta$ , но не активирующий сигнальную трансдукцию. Установлено, что в ответ на действие ВЭБ уровень ИЛ-1 РА в нейтрофилах превышает во много раз уровень ИЛ-1- $\alpha$  и ИЛ-1- $\beta$ , таким образом, ВЭБ ингибирует действие ИЛ-1 на клетки [27].

М. Hurme и соавт. показали, что в контрольной группе частота аллелей 2\*ИЛ-1РА/2\*ИЛ-1 (-511) выше, чем у пациентов с ИМ, в крови которых выявлены антитела к ВЭБ [28]. Авторы предполагают, что отсутствие этих аллелей обеспечивает защиту от ВЭБ.

Являясь основным цитокином, секретируемым CD4+ Th-1-клетками, ИФ- $\gamma$  усиливает транскрипцию ряда генов, чьи продукты участвуют в презентации антигена и деградации вирусной РНК, пролиферации и дифференцировке лимфоцитов. Выявлена достоверная связь между генотипом АА +874 и риском активации ВЭБ у пациентов после трансплантации стволовых клеток [29].

Проведенное исследование показало, что количество аллеля А в позиции -308 гена  $\alpha$ -ФНО достоверно снижено у пациентов с ИМ по сравнению с контролем. Также выявлено, что сочетание генотипов АА ИФ- $\gamma$  +874/GG  $\alpha$ -ФНО -308 достоверно выше у пациентов с ИМ по сравнению с лицами контрольной группы. По данным литературы, аллель А гена  $\gamma$ -ИНФ в позиции +874 связан со снижением уровня цитокина, также как и у носителей аллеля G гена  $\alpha$ -ФНО в позиции -308 наблюдается снижение продукции  $\alpha$ -ФНО [30]. Полученные данные подтверждают, что люди с указанным сочетанием генотипов обладают слабым иммунным ответом и более подвержены действию ВЭБ.

Главная функция иммунной системы хозяина заключается в контроле репродукции вируса вплоть до его полной элиминации из организма. Полученные результаты показали, что полиморфизм его генов может оказывать влияние на чувствительность к заболеванию. Люди с врожденным ослабленным иммунным ответом, вероятно, являются более чувствительными к действию возбудителя. Дальнейшие исследования по определению комбинаций генотипов позволят выявить лиц с высоким риском развития тяжелой и продолжительной болезни после инфицирования, что сделает возможным проведение индивидуальной профилактики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Малашенкова И. К., Дидковский Н. А., Сарсания Ж. Ш. и др. // *Леч. врач.* — 2003. — № 9. — С. 32—38.
2. Титов Л. П., Самойлович Е. О., Вольф Х. И., Кочановский Б. // *Вопр. вирус.* — 1999. — Т. 44, № 1. — С. 21—24.

3. Давидович Г. М., Карпов И. А. Эпштейна—Барр вирусная инфекция: Учеб.-методич. пособие.— Минск, 2008.
4. Morris M. C., Edmunds W. J. // *J. Infect.*— 2002.— Vol. 45, № 2.— P. 107—109.
5. Иванова В. В., Шилдова И. В., Симованьян Э. Н. и др. // *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии.*— 2006.— № 6.— С. 44—51.
6. Cohen J. I. // *N. Engl. J. Med.*— 2000.— Vol. 343, № 7.— P. 481—492.
7. Ogembo J. G., Kannan L., Ghiran I., et al. // *Cell Rep.*— 2013.— Vol. 3, № 2.— P. 371—385.
8. Kaye K. M., Izumi K. M., Mosialos G., Kieff E. // *J. Virol.*— 1995.— Vol. 69, № 2.— P. 675—683.
9. Kawaguchi H., Miyashita T., Herbst H. // *J. Clin. Invest.*— 1993.— Vol. 92.— P. 1444—1450.
10. Kawa K. // *Inf. J. Hematol.*— 2000.— Vol. 71.— P. 108—117.
11. Cohen J. I., Lekstrom K. // *J. Virol.*— 1999.— Vol. 73, № 9.— P. 7627—7632.
12. Crawford D. H. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. sci.*— 2001.— Vol. 356, № 1408.— P. 461—473.
13. Wilson A. G., Di Giovine F. S., Blakemore A. I. F., Duff G. W. // *Human. Mol. Genet.*— 1992.— № 1.— P. 353.
14. Tarlow J. K., Blakemore A. F., Lennard A., et al. // *Hum. Genet.*— 1993.— Vol. 9.— P. 403—404.
15. Mansfield J. C., Holden H., Tarlow J. K., et al. // *Gastroenterology.*— 1994.— Vol. 106.— P. 637—642.
16. Tarlow J. K., Blakemore A. F., Cork M. J., et al. // *Lymphokine. Cytokine. Research.*— 1993.— Vol. 12.— P. 181.
17. Rossouw M., Nel H. J., Cooke G. S., et al. // *Lancet.*— 2003.— Vol. 361.— P. 1871—1872.
18. Pravica V., Perrey C., Stevens A., Lee J. H. // *Hum. Immunol.*— 2000.— Vol. 61, № 9.— P. 863—866.
19. Foss H. D., Herbst H., Hummel M., et al. // *Blood.*— 1994.— Vol. 83, № 3.— P. 707—712.
20. Шаркова В. А., Гордеев А. В., Савина О. Г. // *Совр. науко-емкие технологии.*— 2008.— № 3.— С. 94.
21. Уразова О. И., Помогаева Ф. П., Новицкий В. В. и др. // *Инфекционные болезни.*— 2004.— Т. 2, № 4.— С. 17—21.
22. Янович О. О., Титов Л. П., Щерба В. В. // *Здравоохранение.*— 2012.— № 12.— С. 17—19.
23. Spender L. C., Cornish G. H., Rowland B., et al. // *J. Virol.*— 2001.— Vol. 75.— P. 3537—3546.
24. Roncella S., Baldi L., Cutrona G., et al. // *Clin. Immunol. Immunopathol.*— 1995.— Vol. 77.— P. 162—171.
25. Gosselin J., Menezes J., D'Addario M., et al. // *Eur. J. Immunol.*— 1991.— Vol. 21.— P. 203—208.
26. Wu M. S., Huang S. P., Chang Y. T., et al. // *J. Infect. Dis.*— 2002.— Vol. 185, № 1.— P. 106—109.
27. Roberge C. J., Poubelle P. E., Beaulieu A. D., et al. // *J. Immunol.*— 1996.— Vol. 156.— P. 4884—4891.
28. Hurme M., Helminen M. // *Scand. J. Immunol.*— 1998.— Vol. 48, № 3.— P. 219—222.
29. Bugunia-Kubic K., Mlynarczewska A., Jaskula E., Lange A. // *Br. J. Haematol.*— 2005.— Vol. 132.— P. 326—332.
30. Sallakci N., Coskun M., Berber Z., Gurkan F., et al. // *Tuberculosis.*— 2007.— Vol. 87.— P. 225—230.

Поступила 08.07.14.

**POLYMORPHISM OF TNF-ALPHA, IL-1RA, AND INF-GAMMA CYTOKINE GENES IN PATIENTS WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS**

**O. O. Yanovich, L. P. Titov, V. V. Shcherba**

**Objective.** Studying of the polymorphic cytokine genes incidence in patients with infectious mononucleosis was the purpose of the work.

**Materials and methods.** Seventeen patients with infectious mononucleosis aged 23.9±1.5 yrs (14 men and 3 women) were examined. The control group was formed of 28 practically healthy persons aged 33.7±2.5 yrs (13 men and 15 women). The genome DNAs were identified using a DNA-sopV set (Russia). Polymorphic genes of the TNF- $\alpha$  cytokines in position -308 and of the INF- $\gamma$  cytokines in +874 were identified using the allele specific PCR, and the IL-1RA tandem 86 b.p. patterns were determined.

**Results.** It has been shown that allele A presence in genes of the TNF- $\alpha$  cytokines in position -308 is reliably lower in patients with infectious mononucleosis than in the control persons. It has been found that combination of the genotypes AA of INF- $\gamma$  +874/GG TNF- $\alpha$  -308 occur more often in patients with infectious mononucleosis than in the control persons.

**Conclusion.** The results obtained show that the host genes polymorphism can impact on the susceptibility to the disease. Further studies of genotypes combinations determination will make possible identification of persons at a high risk for a severe and long-time disease development in the infected persons. It will help to prevent the disease development individually.

**Key words:** Epstein—Barr virus, infectious mononucleosis, cytokines, genes polymorphism.

**Адрес для корреспонденции:**

Янович Ольга Олеговна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-95-33.

И. Н. ГЛИНСКАЯ, Е. О. САМОЙЛОВИЧ,  
А. М. ДАШКЕВИЧ, М. А. ЕРМОЛОВИЧ, Г. В. СЕМЕЙКО,  
Е. Ю. СВИРЧЕВСКАЯ, Т. Н. СВЕТОГОР,  
Н. А. СТАНКЕВИЧ, В. П. ШИМАНОВИЧ, Н. П. ЖУКОВА,  
И. В. КОНДРЕСКУЛ

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЗАВОЗНОГО ВИРУСА КОРИ В МИНСКЕ

Минский городской центр гигиены и эпидемиологии,  
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

*Представлен анализ ситуации по кори в Минске в первом полугодии 2014 г. В апреле—июне выявлено и лабораторно подтверждено 30 случаев кори. По эпидемиологическим данным и результатам молекулярно-генетического изучения вируса, подтвержден завозной характер 1-го случая (из России, генотип D8). Еще 2 случая являются завозными по эпидемиологическим данным (из Израиля и Грузии), остальные 27 классифицированы как связанные с завозными. Заболевшие корью были в возрасте 18—59 лет, 87% относились к возрастной группе 20—45 лет. Широкомасштабное проведение противозидемических мероприятий позволило в короткие сроки стабилизировать эпидемическую ситуацию и не допустить широкого распространения инфекции.*

**Ключевые слова:** корь, вирус, эпидемический процесс, противозидемические мероприятия.

Введение вакцинации в 1967 г. и ревакцинации в 1987 г. с использованием моновакцины против кори обеспечило существенное снижение заболеваемости среди населения Минска по сравнению с довакцинальным периодом. Применение с 1996 г. однократной, а с 2000 г. двукратной иммунизации 3-компонентной вакциной против кори, эпидемического паротита и краснухи, а также достижение и поддержание оптимального охвата иммунизацией детей декретированных возрастов обеспечили дальнейшее снижение заболеваемости и создание условий для элиминации кори. Наряду с плановой иммунизацией в Минске использовали и другие возможности активного влияния на заболеваемость среди контингентов риска — проводили кампании подчищающей иммунизации среди населения 15—19 лет (2003), 20—29 лет (2006, 2012).

Заболеваемость корью в Минске, как и в республике в целом, в последнее десятилетие низкая. Регистрируют единичные завозные или связанные с завозными случаи этой инфекции [1]. В отдельные годы (2008, 2009) корь не регистрировали вовсе. Исключением явился 2006 г., когда в Минске выявлено 42 случая кори, в республике — 151 случай [2]. Рост заболеваемости был связан с многочисленными завозами вируса кори генотипа D6 из Украины, где в это время было зарегистрировано более 44 000 случаев кори.

В 2014 г. в Минске и в целом по республике ситуация по кори несколько осложнилась, что явилось следствием обострения эпидемической ситуации в соседних странах, и прежде всего в России. В течение пер-

вого полугодия 2014 г. в Республике Беларусь зарегистрировано 62 лабораторно подтвержденных случая кори, половина из которых (30 случаев) — в Минске.

Целью данного исследования явилось изучение клинико-эпидемиологических характеристик кори в Минске в первом полугодии 2014 г. и использование полученных результатов для разработки профилактических мероприятий, направленных на стабилизацию эпидемической ситуации и недопущение ее последующего ухудшения.

### Материал и методы

В январе—июне 2014 г. в Минске выявлены и лабораторно обследованы 82 пациента с клиническими критериями кори. Выявление подозрительных на корь пациентов и направление клинического материала на лабораторное исследование проводили в соответствии с Санитарными нормами и правилами № 130 от 26.12.2013 г. «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение заноса, возникновения и распространения кори и краснухи». Отмечалось как пассивное (при обращении за медицинской помощью), так и активное (при проведении медицинскими работниками наблюдения среди контактных лиц) выявление пациентов.

Лабораторное обследование пациентов проводили в Республиканской референс-лаборатории по кори и краснухе (РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь). Лабораторную диагностику кори осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ, она включала выявление IgM-антител к вирусу кори в сыворотке крови, обнаружение РНК вируса в клиническом материале (гепаринизированная кровь, носоглоточный мазок, моча) [3]. При необходимости также проводили исследование содержания IgG-антител в парных сыворотках крови. В целях генотипирования выполняли секвенирование С-терминальной области N-гена (450 нуклеотидов) вируса кори.

Антитела классов М и G к вирусам кори определяли с использованием соответствующих иммуноферментных тест-систем производства «Siemens» (Германия). Для выделения вирусной РНК использовали набор «QIAamp Viral RNA Mini Kit» («QIAGEN», Германия). Идентификацию вируса кори проводили с помощью гнездовой ОТ-ПЦР, описанной J. R. Kremer и соавт. [4]. Синтез ПЦР-продуктов анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, pH 8,5 (0,04 М трис-ацетат, 0,002 М ЭДТА) с добавлением красителя GelStar Gel Stain («Lonza», США).

Аmplифицированный фрагмент кДНК вируса кори вырезали из геля, очищали с использованием набора «QIAquick Gel Extraction Kit» («QIAGEN», Германия) и секвенировали в обоих направлениях с помощью набора «BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing kit» («Applied Biosystems», США) на капиллярном секвенаторе (Model 3100 Avant, «Applied Biosystems», США).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием алгоритма Clustal W, встроенного в программу «BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.9.0». Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA, версия 6. Эволюционные расстояния между последовательностями определяли на основании двухпараметрической модели эволюции Кимура. Достоверность топологий филограмм оценивали методом псевдореплик (проанализировано 1000 псевдореплик) [5].

Материалом для клинико-эпидемиологического анализа служили 30 лабораторно подтвержденных случаев кори. Случаи кори, возникшие в результате непосредственного инфицирования от завозного случая, относили к 1-й генерации. Заболевшие в результате контакта со случаями 1-й генерации отнесены ко 2-й генерации и т. д. Эпидемиологический анализ проводили с применением общепринятых методов эпидемиологической диагностики [6]. Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Определяли частоту признаков (количество пациентов, у которых встречался изучаемый признак). Для каждой частоты рассчитывали 95% доверительные интервалы (ДИ) [7].

### Результаты и обсуждение

В Минске в течение января—июня 2014 г. при лабораторном обследовании 82 пациентов с клиническими критериями кори диагноз кори подтвержден у 30 заболевших, у 52 лабораторные данные позволили исключить этот диагноз.

В течение первых 2,5 мес 2014 г. ни одного случая кори зарегистрировано не было. Первый случай заболевания отмечен 26.03.2014 (пациент Ч., 39 лет). По эпидемиологическим данным и результатам генотипирования выделенного вируса кори (генотип D8, вариант Франкфурт) случай был классифицирован как завозной (из Российской Федерации, Сочи).

Далее эпидемический процесс инфекции развивался достаточно быстро, и в апреле был выявлен 21 заболевший корью (рис. 1).

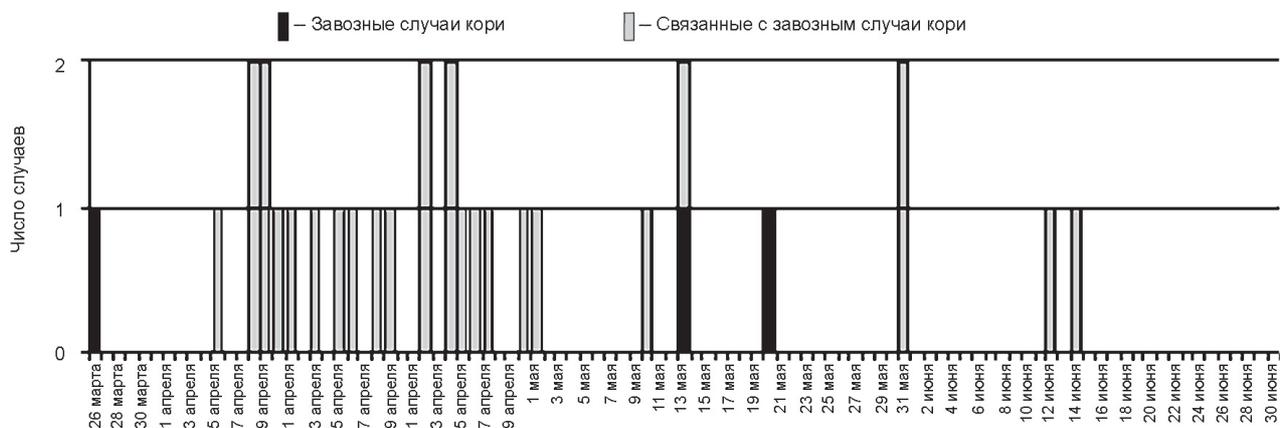
Благодаря проведенным масштабным противоэпидемическим мероприятиям уже в мае отмечалось существенное снижение интенсивности эпидемического процесса инфекции (7 случаев), а в июне выявлено только 2 случая кори.

Среди 30 зарегистрированных случаев кори, помимо первого случая, еще 2 были классифицированы как завозные (из Израиля, дата начала заболевания 13.05.2014, и из Грузии, дата начала заболевания 20.05.2014), остальные 27 являлись связанными с завозными и относились к 1-й (14 случаев), 2-й (11 случаев) или 3-й (2 случая) генерации распространения инфекции (рис. 2).

Выполненное генотипирование еще 4 вирусов кори (у пациентов, заболевших 4, 10, 22 и 24 апреля) показало, что они также относятся к генотипу D8 (вариант Франкфурт) и являются абсолютно идентичными вирусу, изолированному от 1-го случая (BLR/MV-1199) (рис. 3). Вирусы от случаев кори, которые рассцениваются как завозные по эпидемиологическим данным (из Израиля и из Грузии), находятся в процессе изучения.

Как показывает детальный эпидемиологический анализ выявленных случаев кори, наиболее вероятным местом заражения являлся общественный транспорт. Отмечены случаи заражения корью и в учреждениях здравоохранения. Этому способствовала нетипичная клиническая картина в начале заболевания и обусловленная этим кратковременная консультация или госпитализация отдельных пациентов в стационарах неинфекционного профиля. Заболевшие корью обращались в 24 учреждения здравоохранения Минска. В 3 больничных учреждениях здравоохранения зарегистрированы последовательные случаи заболеваний в виде 1-й генерации инфекции. Случаев, относящихся ко 2-й генерации, не возникло, что свидетельствует о своевременности и эффективности проведенного комплекса противоэпидемических мероприятий в стационарах.

Несмотря на то что традиционно корь относится к детским инфекциям, ситуация последних десятилетий свидетельствует, что благодаря вакцинопрофилакти-



День, март—июнь 2014 г.

Рис. 1. Регистрация лабораторно подтвержденных случаев кори (по датам заболевания) в Минске в 2014 г.

46 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

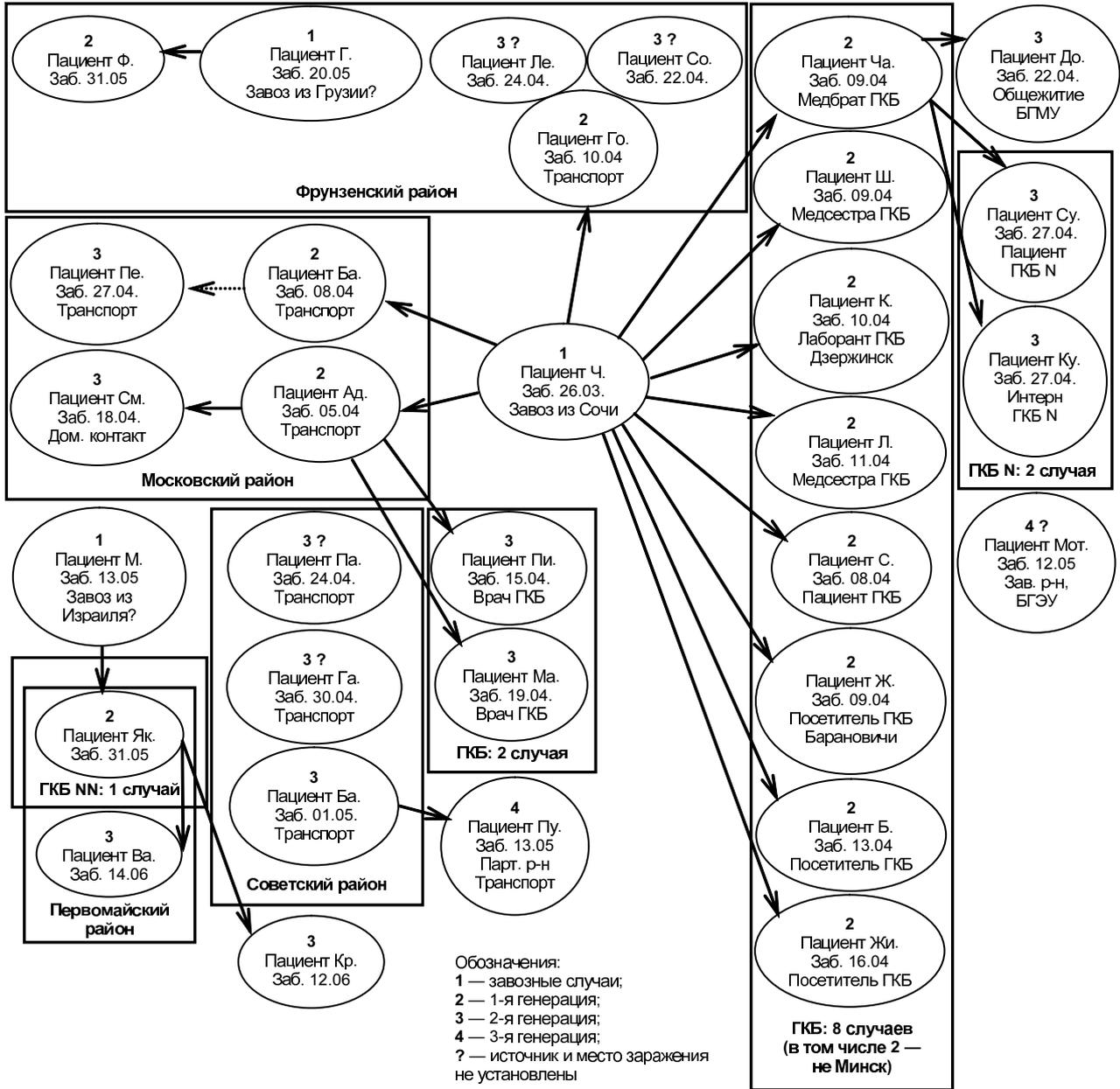


Рис. 2. Схема распространения кори в Минске в марте—июне 2014 г.

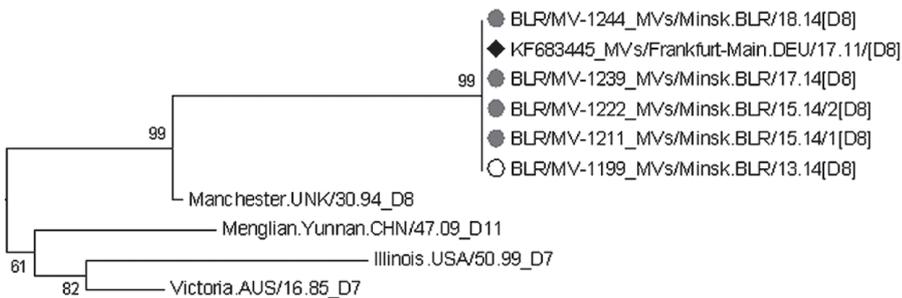


Рис. 3. Филогенетический анализ вирусов кори, выявленных в Минске в апреле 2014 г.

тите эта инфекция существенно «повзрослела» и в Республике Беларусь уже практически не является детской. Анализ возрастного распределения заболев-

ших корью в апреле—июне 2014 г. в Минске также показывает, что детское население не было вовлечено в эпидемический процесс. Все случаи кори были зарегистрированы среди лиц 18—59 лет (рис. 4), 87,0% (95% ДИ [75—99]) случаев относились к возрастной группе 20—45 лет.

Как известно, одним из инструментов прогнозирования эпидемического процесса инфекции является периодическое изучение популяционного иммунитета. Выполненные в 2011 г. сероэпидемиологические исследования свидетельствовали

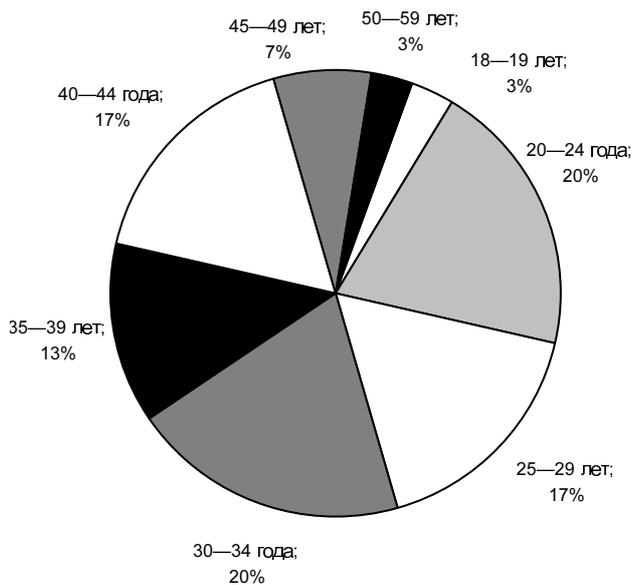


Рис. 4. Возрастная структура заболевших корью в апреле—июне 2014 г. в Минске

о том, что наибольшая доля серонегативных в отношении кори лиц сосредоточена в возрастных группах 20—29 и 30—39 лет (с поправкой на 2014 г. — возрастные группы 23—32 и 33—42 года). Анализ случаев кори в 2014 г. подтверждает, что наиболее высокие показатели заболеваемости были зарегистрированы именно в тех возрастных группах взрослых, среди которых был выявлен наибольший удельный вес серонегативных лиц (рис. 5).

Большинство заболевших (60,0%, 95% ДИ [42—78]) не были привиты против кори или не имели в медицинской документации сведений о проведенных прививках против кори. У 40,0% (95% ДИ [22—58]) лиц имелись сведения об одной или двух прививках

против кори с использованием моновакцины. Можно предположить, что иммунизация вышеуказанных лиц была проведена вакцинами низкоиммуногенных серий, не позволившими сформировать достаточную защиту от заболевания, но обеспечивших отсутствие тяжелого течения и осложнений после перенесенной инфекции. В пользу этой версии может свидетельствовать тот факт, что при анализе медицинской документации 11 заболевших, имевших сведения о 2 прививках, была выявлена серия моновакцины против кори (серия 7), которую получили несколько человек. Не исключен факт, что могли быть допущены и нарушения требований «холодовой цепи» при транспортировке и хранении доз вакцины.

Большинство случаев кори имели среднюю степень тяжести (87,0%, 95% ДИ [75—99]). Один случай протекал в тяжелой форме. Осложнения после перенесенной кори не зарегистрированы.

Как известно, в последние годы во многих европейских странах наблюдались крупные вспышки кори. Так, в 2013 г. в регионе в целом были зарегистрированы 31 520 случаев кори. Наиболее высокая заболеваемость отмечалась в Грузии (7830 случаев), Турции (7404), Украине (3308), Нидерландах (2499 случаев), Италии (2216 случаев), Российской Федерации (2174 случая), Великобритании (1900 случаев), Германии (1773 случая) [8]. В 2011 г. более 14 000 случаев кори зарегистрировано во Франции [9], в 2012 г. 12 744 случаев кори — в Украине [10].

В целях недопущения широкого распространения вируса кори в Минске противоэпидемические мероприятия организованы во всех учреждениях здравоохранения, куда обращались пациенты, а также среди близких контактных лиц (в семье, местах временного пребывания (у родственников и т. д.), среди контактных лиц по подъезду, по месту работы или учебы и т. д.). Более 10 тыс. контактных лиц находились под медицинским наблюдением в учреждениях здравоохранения Минска и других регионов страны.

В первые 2-е суток с момента выявления заболевшего корью проводили оценку прививочного анамнеза контактных лиц. Контактным в возрасте от 9 мес и старше, у которых отсутствовали сведения о проведенной ранее иммунизации против кори или имелись сведения только об одной прививке, не обозначенной как ревакцинация, в течение первых 3 сут с момента выявления пациента предлагали проведение постэкспозиционной вакцинопрофилактики с использованием многокомпонентной вакцины против кори, эпидемического паротита и краснухи. Постэкспозиционную вакцинопрофилактику

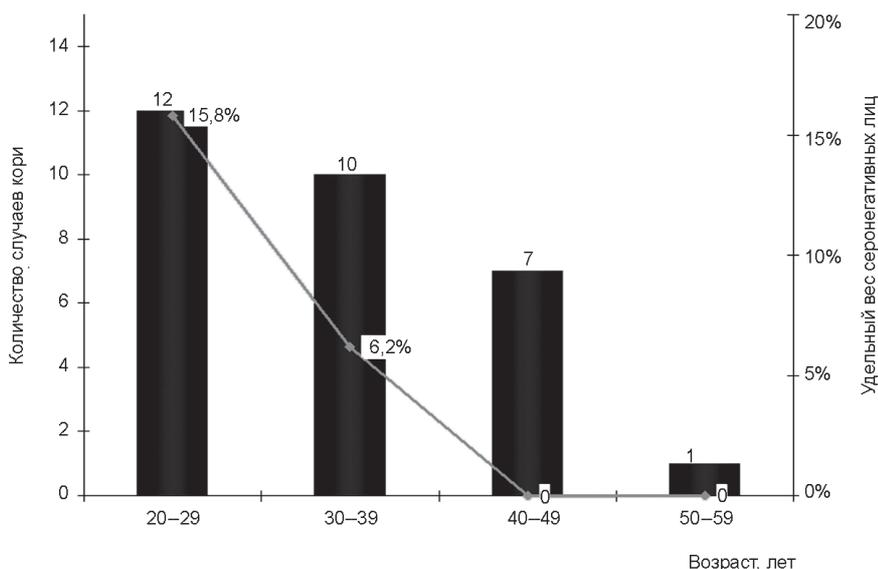


Рис. 5. Количество случаев кори в различных возрастных группах в апреле—июне 2014 г. в Минске и удельный вес серонегативных к кори лиц (по данным исследования 2011 г.)

ку за изучаемый период получили более 2,5 тыс. контактных лиц, ни один человек из них не заболел корью. У 5 человек были зарегистрированы побочные реакции (повышение температуры тела и наличие пятнисто-папулезной сыпи), что потребовало проведения дифференциальной диагностики с корью.

Таким образом, в апреле—июне 2014 г. отмечались завозы вируса кори в Минск с последующим ограниченным распространением среди населения города. В эпидемический процесс были вовлечены 30 человек в возрасте 18—59 лет, 87% из которых относились к возрастной группе 20—45 лет. У 40% заболевших имелись сведения о проведенной ранее вакцинации с использованием моновакцины. Вероятными причинами отсутствия иммунитета к кори у привитых лиц могли быть низкая иммуногенность ранее используемых вакцин, а также нарушения условий «холодовой цепи» при их транспортировке либо хранении. Ни одного случая кори у детей выявлено не было, что свидетельствует о высокой эффективности используемой в настоящее время тактики вакцинации. Широкомасштабное проведение противоэпидемических мероприятий позволило в короткие сроки стабилизировать эпидемическую ситуацию и не допустить широкого распространения инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Самойлович Е. О. // *Мед. журн.*— 2014.— № 2.— С. 94—99.
2. Samoiloich E. O., Yermalovich M. A., Semeiko G. V., et al. // *Euro Surveill.*— 2006.— Vol. 11.— P. E060727.3.
3. WHO. *Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection.*— Geneva, 2006.
4. Kremer J. R., Nguyen G. H., Shulga S. V., et al. // *J. Med. Virol.*— 2007.— Vol. 79, № 7.— P. 987—994.
5. Tamura K., Peterson D., Peterson N., et al. // *Mol. Biol. Evol.*— 2011.— Vol. 20, № 10.— P. 2731—2739.
6. Адамович М. М. *Методы эпидемиологической диагностики: Учеб.-метод. пособие / Под ред. Г. Н. Чистенко.*— Минск, 2003.
7. Petrie A., Sabin C. *Medical Statistics at a glance / Под ред. В. П. Леонова.*— М., 2009.— С. 31—32.
8. Muscat M., Shefer A., Ben Mamou M., et al. // *Clin. Microbiol. Infect.*— 2014.— Vol. 20.— P. 12—18.
9. CDC. *Increased Transmission and Outbreaks of Measles // MMWR.*— 2011.— Vol. 60, № 47.— P. 1605—1610.
10. WHO EpiBrief. *A report on the epidemiology of selected vaccine-preventable diseases in the European Region.*— 2013.— № 1.

Поступила 08.07.14.

#### DISTRIBUTION OF DELIVERED MEASLES VIRUS IN MINSK

I. N. Glinskaya, E. O. Samoiloich, A. M. Dashkevich, M. A. Yermalovich, G. V. Semeiko, E. Yu. Svirchevskaya, T. N. Svetogor, N. A. Stankevich, V. P. Shimanovich, N. P. Zhukova, I. V. Kondreskul

The situation for measles in Minsk had been analyzed for the first half of 2014. Thirty cases of measles were detected and confirmed by laboratory tests in April—June. According to the epidemiological data and the results of studying the virus molecularly and genetically the first case was confirmed to have been delivered (from Russia, genotype D8). Two more cases were determined to have been delivered as well (from Israel and Georgia) and the remaining 27 cases were classified as associated with the delivered ones. The persons got ill with measles were 18 to 59 years of age, 87% referred to the age group of 20—45 years. The wide-scale anti-epidemic actions allowed stabilize the epidemiological situation quickly and prevent the infection expansion.

**Key words:** measles, virus, epidemic process, anti-epidemic actions.

#### Адрес для корреспонденции:

Глинская Ирина Николаевна.  
Минский городской центр гигиены и эпидемиологии.  
220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 13, корп. 1;  
сп. тел. (8-017) 292-47-54.

В. Г. ГУДКОВ, И. В. ФЕДОРОВА, Г. Н. ЧИСТЕНКО,  
Е. Г. ФИСЕНКО, И. Н. ГЛИНСКАЯ, Н. Н. ЛЕВШИНА,  
К. Ю. ПЛОТНИКОВА, В. Л. ЗУЕВА, Л. К. НАРОЙЧИК,  
В. В. ПАШКОВИЧ, А. С. ВИРИНСКАЯ

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА А

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь, Белорусский государственный медицинский университет, Минский городской центр гигиены и эпидемиологии, Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, Минск

**Цель исследования.** Изучение эпидемиологических параметров вирусного гепатита А (ГА) в Республике Беларусь в периоды с различной интенсивностью эпидемического процесса, проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга за популяцией вирусов гепатита А, установление частоты выявления защитной концентрации антител к возбудителю гепатита А у населения Минска.

**Материал и методы.** Использованы данные официальной регистрации заболеваний ГА населения Республики Беларусь за период 1962—2013 гг. Анализ материалов по заболеваемости проводили с применением методов эпидемиологической диагностики. С целью изучения иммунитета населения к вирусу ГА было обследовано 1473 человека на наличие суммарных антител — иммуноглобулинов анти-ВГА. Определение суммарного количества антител проводили методом иммуноферментного анализа с помощью тест-систем «VIDAS Anti-HAV Total (HAVT) REF 30312» («БиоМерье», Франция).

**Результаты.** На современном этапе эпидемический процесс ГА проявляется минимальным уровнем базового потенциала, стабильно низкой (менее 3,0 на 100 000 населения) инцидентностью, вовлечением преимущественно взрослого городского населения, наличием сезонной заболеваемости, периодическим завозом инфекции из неблагополучных стран ближнего и дальнего зарубежья, циркуляцией преимущественно 3 субгенотипов возбудителя (IA, IB, IIIA).

**Заключение.** Показано, что в Минске дети и подростки, а также лица в возрасте 18—19 лет более чем в 82% случаев в равной степени остаются незащищенными от вируса ГА. Высокому риску заболевания в случае инфицирования подвержены лица в возрасте 18—19, 20—29 лет, относящиеся к социальной группе студентов. Прогнозируемая вероятность наличия восприимчивых лиц в данных возрастных группах составляет 91,7% и 82,7% соответственно.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит А, эпидемиологические параметры, защитная концентрация антител, популяционный иммунитет, молекулярно-эпидемиологический мониторинг, группы риска, вакцинопрофилактика.

Вирусный гепатит А (ГА) является причиной возникновения значительной части заболеваний и серьезных экономических потерь во многих регионах мира. Республика Беларусь также входит в их число, относясь в различные периоды времени к территориям с интенсивной, умеренной и низкой степенью эндемичности по ГА. Для обеспечения эпидемического благополучия по ГА на территории республики необходимо осуществлять постоянный эпидемиологический надзор, включая мониторинг интенсивности эпидемического процесса, факторов и условий, влияющих на распространение инфекции, охвата иммуни-

зацией населения, состояния популяционного иммунитета, а также проводить молекулярно-эпидемиологическое слежение за популяцией возбудителя.

Целью исследования является изучение эпидемиологических параметров ГА в периоды с различной интенсивностью эпидемического процесса, иммунологической структуры населения Минска, проведение молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции вируса гепатита А (ВГА).

### Материал и методы

В работе использованы данные официальной регистрации заболеваний ГА в Республике Беларусь за период 1962—2013 гг. При анализе многолетней динамики заболеваемости ГА определяли многолетнюю эпидемическую тенденцию методом прямолинейного выравнивания динамического ряда по параболе первого порядка, верхний предел круглогодичной заболеваемости — по методике Пуассона [1]. Достоверность различий в показателях заболеваемости оценивали по критерию Стьюдента [2].

Материалом для изучения иммунитета к ВГА у различных групп населения являлись 1473 сыворотки крови детей и взрослых в возрасте от 1 года до 63 лет, отобранных случайным образом из числа пациентов, обратившихся за оказанием медицинских услуг в поликлиники Минска. В исследование включали субъектов только после подписания информированного согласия. Каждый участник заполнял индивидуальную анкету. При изучении состояния иммунитета у пациентов сыворотку отделяли от крови и тестировали с целью обнаружения суммарных антител к ВГА, использовали метод комбинированной ингибирующей технологии с флуоресцентным количественным определением суммарных антител, которое проводили на автоматическом анализаторе «miniVidas» в микробиологической лаборатории МингорЦГЭ. Для иммуноферментного анализа применяли тест-систему «VIDAS Anti-HAV Total (HAVT) REF 30312» («БиоМерье», Франция). Для исследования использовали сыворотку в разведении 1:100. Результаты определения концентрации антител представлены в мМЕ/мл (стандарт ВОЗ). Полученные результаты интерпретировались VIDAS следующим образом: при концентрации антител менее 15 мМЕ/мл — пациентов считали серонегативными; более 15 мМЕ/мл, но менее 20 мМЕ/мл — граница положительного; серопозитивными считали пациентов с защитной концентрацией антител к вирусу ГА 20 мМЕ/мл и более.

Для изучения иммунитета к ВГА дети и подростки от 1 года до 17 лет, привитые против ГА, а также с неизвестным прививочным статусом были исключены из анализа. Среди взрослых 18—63 лет привитые против ГА лица отсутствовали. Статистической обработке подверглись результаты обследования 748 детей в возрасте 1—17 лет и 526 взрослых в возрасте 18—63 лет.

Сравнение относительных частот бинарного признака (наличие или отсутствие защитного титра антител) в исследуемых возрастных и социальных груп-

пах проводили путем сравнения их доверительных интервалов. Расчет верхней и нижней границ 95% доверительного интервала для относительной частоты бинарного признака проводили по формуле:

$$P \pm 1,96 \cdot \left( \sqrt{\frac{P(1-P)}{n} + \frac{1}{2n}} \right),$$

где  $P$  — относительная частота события,  
 $n$  — число наблюдений [2].

Для определения связи между явлениями использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ). Значимость коэффициента корреляции оценивали по таблице Л. С. Каминского [1]. Для установления зависимости между удельным весом серопозитивных лиц и их возрастом применяли метод простой линейной регрессии. Расчет спрогнозированной вероятности наличия защитной концентрации антител в различных возрастных и профессиональных группах осуществляли с использованием метода бинарной логистической регрессии [3]. Обработку полученных результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ «SPSS for Windows» (версия 19.0) и табличного процессора Microsoft Excel (2010).

### Результаты и обсуждение

Многолетняя динамика заболеваемости ГА в Республике Беларусь за период 1962—2013 гг. характеризовалась выраженной тенденцией к снижению интенсивности эпидемического процесса со средним темпом прироста (Тпр. ср.)  $-6,8\%$ ,  $P < 0,05$  (рис. 1). За изучаемый промежуток времени нами выделены периоды высокой, средней и низкой интенсивности эпидемического процесса (ЭП). Период высокой интенсивности ЭП характеризовался уровнем заболеваемости более 100, средней — 10—100, низкой — менее 10 случаев на 100 000 населения.

Период высокой интенсивности ЭП ГА на территории республики регистрировали на протяжении 30 лет. Показатель заболеваемости ГА колебался от 116,3 слу-

чая на 100 000 населения в 1976 г. до 553,6 в 1983 г. Средний многолетний показатель заболеваемости за изучаемый период составил  $230,6\%$ . Для динамики заболеваемости ГА в данный период характерна умеренная тенденция к росту интенсивности эпидемического процесса, с Тпр. ср.  $3,6\%$  ( $P < 0,05$ ). Фазы подъема и спада заболеваемости чередовались с временным интервалом 3—5 и 4—6 лет соответственно.

С 1992 г. по 2004 г. наблюдался второй период (средней интенсивности ЭП), который характеризовался снижением показателей заболеваемости ГА на протяжении 13 лет со средним многолетним темпом  $-3,6\%$  ( $P < 0,05$ ). Средний многолетний годовой показатель заболеваемости во втором периоде снизился в 4 раза по сравнению с первым и составил  $57,7\%$ . Длительность фазы эпидемиологического благополучия составила 6 лет, неблагополучия — 3 года.

На современном этапе развития ЭП ГА (2005—2013 гг.) показатели заболеваемости не превышали 10 случаев на 100 000 населения республики. Заболевание регистрировали круглогодично в виде спорадических случаев. Многолетняя динамика заболеваемости ГА характеризовалась выраженной тенденцией к снижению ее уровня, Тпр. ср. составил  $-27,1\%$  ( $P < 0,05$ ). Средний многолетний годовой показатель заболеваемости в период низкой интенсивности ЭП снизился в 26 раз по сравнению с периодом средней интенсивности и составил  $2,2\%$ . Характер многолетней цикличности ЭП отличался более продолжительными фазами эпидемиологического благополучия — 3—4 года по сравнению с фазами неблагополучия — 1—2 года.

Аналогичные выводы позволяют сделать анализ периодичности ЭП ГА в республике, исходя из уровня его базового потенциала. Анализируя кривую заболеваемости ГА, можно отметить по крайней мере 5 выраженных циклов эпидемического процесса с пиками подъема заболеваемости в 1964, 1973, 1983, 1989 и 2001 гг. Однако обращает внимание достаточно стабильный уровень минимальной заболеваемости в определенные периоды ее снижения. Именно этот уровень минималь-

ной заболеваемости обусловлен сочетанием продолжительно действующих факторов, он характеризует так называемый базовый потенциал ЭП. Появление дополнительных, стимулирующих ЭП временно действующих факторов, например, ухудшение качества воды, уменьшение иммунной прослойки в популяции, интенсивная миграция населения, изменение биологических свойств вируса и т. п., вызывает циклические подъемы заболеваемости, которая после восстановления баланса в процессе взаимодействия макро- и микропопуляций возвращается к базовому уровню. В случае же длительного воздействия стиму-

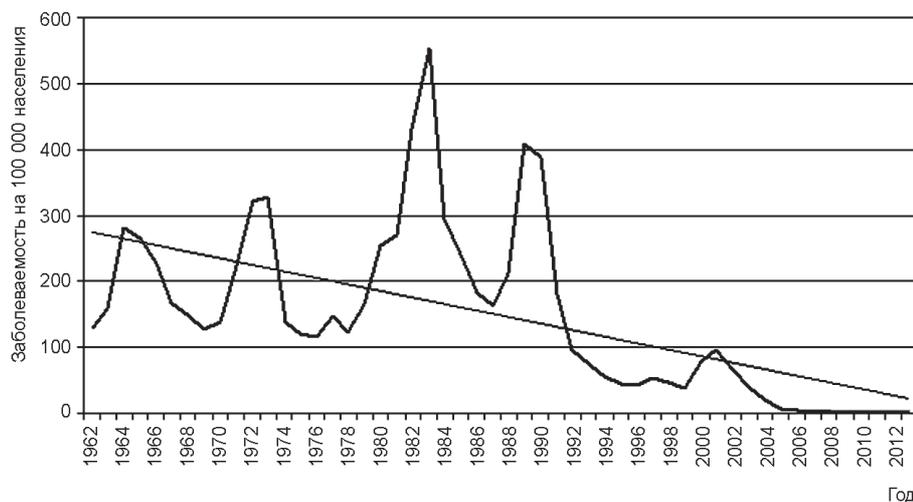


Рис. 1. Многолетняя динамика и эпидемиологическая тенденция заболеваемости ГА в республике за 1962—2013 гг.

лирующих ЭП или, напротив, угнетающих его факторов базовый потенциал и отражающий его уровень минимальной заболеваемости изменяются, характеризую наступление нового периода взаимодействия этих популяций [4]. Поскольку базовый потенциал ЭП изменяется в динамике, как и сам этот процесс, по-видимому, его динамическая граница может быть достаточно адекватно отражена линией регрессии, рассчитанной по значениям уровней минимальной заболеваемости в фазах ее спада. Отклонение от линии регрессии значений минимальной заболеваемости свидетельствует о наступлении нового периода ЭП с измененным в ту или иную сторону базовым потенциалом [5].

В 2013 г. зарегистрировано 102 случая ГА, показатель заболеваемости составил  $1,07\text{‰}$ . Выше республиканского показателя заболеваемости установлена в Могилевской области — на 80% ( $1,94\text{‰}$ ), в Минске — на 31% ( $1,41\text{‰}$ ) и Минской области — на 17% ( $1,25\text{‰}$ ).

Заболеваемость городского населения республики была в 2,3 раза выше, чем сельского, и составила 1,24 и 0,53 случая на 100 000 населения соответственно.

При изучении годовой динамики заболеваемости ГА в 2013 г. регистрировали сезонный подъем на протяжении 8 мес — январь, апрель, июнь, август—декабрь. Удельный вес круглогодичной заболеваемости составил 66,3%, сезонной — 33,6% соответственно.

В период низкой интенсивности изменения претерпели эпидемиологические параметры в разных возрастных группах населения республики. В структуре заболевших удельный вес взрослых (18 лет и старше) составил 72,5%. При стандартизации показателей заболеваемости ГА по возрастам инцидентность составила среди детей 0—2 лет — 0,01, 3—6 лет — 0,07, 7—14 лет — 0,13, 15 лет и старше — 0,85 случая на 100 000 населения данных возрастных групп.

Механизм развития ЭП ГА в естественных условиях определяется инфекционно-иммунологическими отношениями, которые складываются между популяцией возбудителя и восприимчивостью организма [6—8]. Активное вовлечение в ЭП населения приводит к формированию коллективного иммунитета, обеспечивая в последующем длительные периоды эпидемического благополучия. В свою очередь, продолжительные периоды низкой заболеваемости способствуют накоплению прослойки серонегативных лиц, что создает условия для активизации ЭП ГА. Считается, что популяционный иммунитет к ВГА обеспечивает достаточный противозидемический уровень защиты населения, когда удельный вес иммунной прослойки с защитным титром антител составляет 70—75% и выше.

ЭП ГА эффективно управляется средствами специфической профилактики. Наглядно эффективность вакцинопрофилактики ГА представлена в эпидемиологической модели развития ЭП в условиях реализации стратегии вакцинации в Минске [9, 10], которая предусматривала поэтапное вовлечение в иммунизацию контингентов с высоким риском инфицирования вирусом ГА: с 2003 г. была внедрена плановая вакцинация детей 6—7 лет, поступающих в началь-

ную школу; с 2004 г. — вакцинация контактных детей в очагах; с 2005 г. — иммунизация детей 6—13 лет, проживающих в общежитиях, а также взрослых лиц, работающих на эпидемиологически значимых предприятиях; с 2006 г. — вакцинация всех контактных лиц в очагах; с 2008 г. — плановая вакцинация детей 18—24 мес. Развитие стратегии вакцинопрофилактики ГА способствовало значительному снижению заболеваемости и стабилизации ее на низком уровне. В соответствии с перечнем профилактических прививок по эпидемическим показаниям, установленным постановлением Минздрава Республики Беларусь № 106 от 18 июля 2012 г., иммунизация против ГА проводится только по эпидемическим показаниям лицам, находящимся в очаге. В Минске осуществляется вакцинация детей в возрасте 18 мес и ревакцинация — в 24 мес. Всего, по данным государственной отчетной формы № 2 «Прививки», в 2013 г. в Республике Беларусь подлежало иммунизации против ГА 32 423 человека, из них доля привитых детей составила 96,2%. Всего было сделано 69 250 профилактических прививок, в том числе 55 664 (80,4%) — в Минске.

При изучении состояния популяционного иммунитета к вирусу ГА у жителей Минска установлены закономерности, свойственные для территорий с умеренным типом ЭП [11, 12]. Общий удельный вес серопозитивного населения в возрасте 1—17 лет составил 12,6%, среди лиц 18 лет и старше — 49,8% (рис. 2). У детей 1—5 лет антитела к вирусу ГА (анти-ВГА) обнаружены в 12,3% случаев. У детей 6—9 лет доля серопозитивных лиц составила 17,9%, у детей и подростков 10—14 лет — 12,6%, среди подростков 15—17 лет — 12,2%, среди взрослых 18—19 лет — 13,0%. Достоверные различия показателей относительной частоты выявления иммуноглобулинов анти-ВГА у детей и подростков, а также у лиц 18—19 лет отсутствовали ( $P > 0,05$ ). В каждой более старшей возрастной группе, начиная с 20—29 лет, доля иммунного населения увеличивалась. Среди лиц в возрасте 20—29 лет удельный вес серопозитивных составил 36,9%, 30—39 лет — 45,0%, 40—49 лет — 68,1%. Максимальная частота (93,4%) выявления антител к ВГА отмечалась у лиц в возрасте 50 лет и старше.

Показатели относительной частоты выявления иммуноглобулинов анти-ВГА у взрослого населения достоверно различались ( $P < 0,05$ ), за исключением возрастных групп 20—29 и 30—39 лет ( $P > 0,05$ ).

При расчете линейной регрессии установлена достоверная статистическая зависимость между удельным весом лиц с защитной концентрацией антител и возрастом взрослого населения (коэффициент регрессии  $b=19,1$ ), методом корреляции выявлена сильная прямая связь ( $r=0,989$ ,  $P < 0,01$ ).

При изучении иммунитета к ВГА в отдельных социально-профессиональных группах населения Минска установлено, что у рабочих суммарные антитела в защитном титре обнаружены в 60,0% случаев — это статистически достоверно выше, чем у учителей/государственных служащих/работников офиса (47,1%) и студентов (13,0%). Доля серопозитивных лиц сре-

## 52 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней

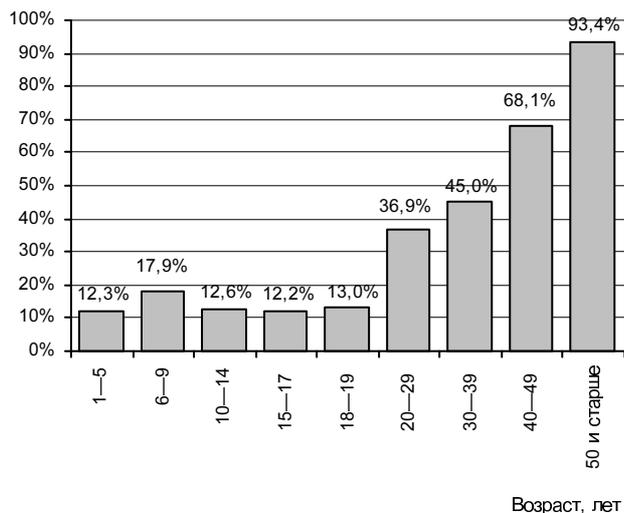


Рис. 2. Частота выявления защитной концентрации антител к вирусу ГА в разных возрастных группах населения Минска

ди работников здравоохранения составила 54,2%, работников сферы питания — 45,7%, домохозяек и безработных лиц — 55,7% ( $P > 0,05$ ). Минимальный показатель частоты выявления антител к ВГА был установлен у студентов — 13,0%.

В результате обработки данных методом бинарной логистической регрессии вычислены прогнозные показатели вероятности наличия защитной концентрации иммуноглобулинов анти-ВГА у взрослого населения Минска в зависимости от сочетанного влияния факторов «возраст» и «занятость/профессия». Прогнозируемая вероятность определения удельного веса серонегативных (восприимчивых) лиц была максимальной для студентов в возрасте 18—19 и 20—29 лет и составила 91,7% и 82,7% соответственно. Именно эти группы представляют собой наиболее уязвимые контингенты, которые целесообразно защищать с помощью вакцинопрофилактики.

В последние годы на фоне низкого уровня заболеваемости в ряде стран, включая Республику Беларусь, большое значение приобретает проблема трансграничного переноса (завоза) инфекции. Эпидемиологическое расследование с использованием современных методов генотипирования вирусов ГА позволяет установить такие случаи. Так, по данным Европейской системы раннего предупреждения и реагирования (EWRS), с 1 октября 2012 г. по 5 июля 2013 г. в Дании, Финляндии, Норвегии и Швеции зарегистрированы случаи заражения субгенотипом IB ВГА с двумя схожими последовательностями, приведшие к вспышке заболеваемости. Ни один из пациентов не выезжал за пределы ЕС в период потенциального заражения. За время этой вспышки зарегистрировано 103 случая заболевания ГА, из них 59 подтверждены лабораторно. Общий источник вспышки не определен, однако эпидемиологические исследования в Дании и Швеции указывают на замороженную клубнику как на вероятный фактор распространения инфекции.

С мая по июнь 2013 г. EWRS зарегистрирована вспышка ГА, вызванная одним и тем же штаммом ви-

руса, у туристов из Германии, Польши и Голландии, которые путешествовали по Северной Италии в период повышения там уровня заболеваемости ГА как в указанном регионе, так и стране в целом. Фактором распространения ГА также была замороженная клубника.

Результаты молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя ГА, который осуществлялся в научно-инновационной лаборатории РНПЦ эпидемиологии и микробиологии в течение 2006, 2008—2012 гг., показали, что в Минске за указанный период циркулировали вирусы трех субгенотипов: IA, IB и IIIA. Все выделенные вирусы субгенотипа IB были связаны с завозными случаями ГА, страной происхождения вируса чаще являлся Египет. В сентябре 2011 г. установлен завозной случай ГА, вызванный субгенотипом IB возбудителя, из Украины (Одесса).

Заболевания, обусловленные субгенотипом IIIA ВГА, не имели между собой эпидемиологической взаимосвязи по месту предположительного инфицирования. Вместе с тем на возможные общие источники инфекции указывало формирование двух достоверных кластеров, каждый из которых содержал вирус с установленной завозной природой. В обоих случаях группы включали вирусы из Таджикистана, это позволяет предположить возможность завоза ВГА с продуктами питания из этого региона (большинство заболевших признавали употребление кураги и других сухофруктов без достаточной обработки).

В сентябре 2009 г. через 1 мес после возвращения из Таджикистана ГА заболел ребенок 6 лет. Секвенирование и филогенетический анализ показали близость выделенного вируса к штамму субгенотипа IIIA, вызвавшему в 2007 г. вспышку в Южной Корее. Спустя 27 сут с аналогичным диагнозом в инфекционную клиническую больницу поступил его брат, а еще через 18 сут — подруга брата. Очевидность эпидемиологической связи 3 случаев была опровергнута молекулярно-биологическими исследованиями, согласно которым вирус, полученный из сыворотки крови девушки, не имел сходства с вирусом из семейного очага и принадлежал к другому генотипу. Значительно позже, в марте 2011 г., был выявлен похожий вирус у человека, который за 22 сут до начала заболевания посещал Литву (Вильнюс).

Данные эпидемиологических исследований и молекулярно-эпидемиологического мониторинга популяции вирусов ГА показали, что значительная часть заболеваний в Минске за 2011—2012 гг. носила завозной характер, инфицирование происходило за пределами республики в странах ближнего и дальнего зарубежья. В условиях низкого уровня базового потенциала ЭП ГА в Минске отмечались небольшие очаги инфекции, объединяющие 2—4 случая и вызванные одним штаммом вируса (исключение составляли только вспышки 2006 г. и конца 2008 — начала 2009 г., охватившие большее число людей). Анализ многолетних данных указывает на возможность «возвращения» некоторых штаммов ВГА. Страной происхождения вируса субгенотипа IA чаще является Киргизия, субгенотипа IB — Египет, субгенотипа IIIA — Таджикистан [13].

Требуется повсеместное и адекватное использование возможностей существующей системы эпидемиологического надзора и контроля за ГА и ее дальнейшее совершенствование. Последнее возможно прежде всего за счет адаптации и внедрения автоматизированной системы эпидемиологического надзора за эпидемиологически значимыми объектами [14], а также оригинального метода оценки вирулицидной активности дезинфектантов в отношении вирусов ГА [15], разработанных в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

### Выводы

1. Эпидемический процесс ГА на территории Республики Беларусь имеет периоды высокой, средней и низкой интенсивности с существенно различающимися уровнями его базового потенциала.

Период эпидемического процесса ГА (2005—2013) характеризуется минимальным уровнем базового потенциала; стабильно низким (менее 3,0 на 100 000 населения) уровнем спорадической заболеваемости; вовлечением в эпидемический процесс преимущественно взрослого населения, проживающего в городах (до 70—80%); наличием сезонных подъемов длительностью 6—8 мес; периодическим завозом инфекции из неблагополучных стран ближнего и дальнего зарубежья; циркуляцией преимущественно 3 субгенотипов возбудителя (IA, IB, IIIA).

2. Реализация стратегии вакцинопрофилактики ГА позволяет эффективно управлять эпидемическим процессом. Иммунизация контактных лиц на раннем этапе осложнения эпидемиологической ситуации, особенно в организованных детских коллективах, позволяет эффективно предотвращать распространение ВГА. С 2004 г. в организованных детских коллективах и среди населения республики вспышки ГА не регистрировали.

3. Изучение популяционного иммунитета к ВГА у жителей Минска в 2007—2008 гг. позволило количественно охарактеризовать долю незащищенных лиц разного возраста. Так, дети и подростки, а также лица в возрасте 18—19 лет более чем в 82% случаев (82,1—87,8%) в равной степени остаются незащищенными от ВГА. Эти группы подвержены высокому риску заболевания в случае инфицирования, что является основанием для применения вакцинопрофилактики.

4. В Республике Беларусь сохраняется стабильная благополучная эпидемиологическая ситуация в отношении ГА, однако растущая и разнонаправленная трудовая миграция населения, интенсивные туристические и деловые поездки в страны, в которых заболеваемость значительно выше, создают риск завоза инфекции и роста заболеваемости среди неиммунного к ВГА детского и взрослого населения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чистенко Г. Н. Эпидемиологическая диагностика / Под ред. Г. Н. Чистенко.— Минск, 2007.
2. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA.— М., 2002.
3. Наследов А. Д. Математические методы психологического исследования: анализ и интерпретация данных.— СПб., 2007.

4. Гудков В. Г. // Проблемы бактериологии и иммунологии: Материалы юбил. науч. конф. (к 80-летию кафедры микробиол., вирусол., иммунол. БГМУ).— Минск, 2005.— С. 82—92.

5. Гудков В. Г., Мороз А. Г. // Актуальные проблемы гигиены и эпидемиологии: Материалы науч.-практ. конф., посвященной 80-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь.— Минск, 2006.— С. 400—405.

6. Шахгильдян И. В. // Мир вирусных гепатитов.— 2006.— № 1.— С. 10—13.

7. Мукомолов С. Л. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 2001.— № 3.— С. 35—39.

8. Быстрова Т. Н. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика.— 2004.— № 5.— С. 24—27.

9. Федорова И. В., Чистенко Г. Н., Глинская И. Н. и др. // Мед. журнал.— 2013.— № 4.— С. 102—106.

10. Федорова И. В., Фисенко Е. Г. // Материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. Всемирному дню здоровья 2008 г., защите здоровья от изменений климата, 60-летию создания ВОЗ.— Киев, 2008.— С. 127—128.

11. Фольмер А. Я. // Эпидемиология и инфекционные болезни.— 2007.— № 6.— С. 29—34.

12. Шляхтенко Л. И. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.— 1994.— № 5.— С. 42—45.

13. Плотникова К. Ю., Гудков В. Г. // Здравоохранение.— 2011.— № 12.— С. 30—35.

14. Гудков В. Г., Мороз А. Г., Ефимов А. В. и др. // Здравоохранение.— 2004.— № 10.— С. 36—39.

15. Плотникова К. Ю., Гудков В. Г. Метод определения вирулицидной активности дезинфектантов в отношении вируса гепатита А с помощью антигенсвязывающей полимеразной цепной реакции: Инструкция по применению.— Рег. № 008-1013. Утв. МЗ РБ 23.12.2013.

Поступила 08.07.14.

### DESCRIPTION OF VIRAL HEPATITIS A EPIDEMIC PROCESS

V. G. Gudkov, I. V. Fedorova, G. N. Tchistenko, E. G. Fisenko, I. N. Glinskaya, N. N. Levshina, K. Yu. Plotnikova, V. L. Zueva, L. K. Narojchik, V. V. Pashkovich, A. S. Virinskaya

**Objective.** Investigation of the viral hepatitis A (HA) epidemiological characteristics in the Republic of Belarus during periods of the epidemic process various intensities, molecular and epidemiological monitoring for the hepatitis A virus population, determination of the hepatitis A virus protective concentration rate in Minsk residents were the objectives of the study.

**Materials and methods.** The official HA registration data for the Republic of Belarus residents for 1962—2013 were used in the analysis. The morbidity data were analyzed using methods of epidemiological diagnosis. In order to study the population immunity to the HA virus 1473 persons were examined for presence of total antibodies — anti-HAV immunoglobulins. The antibodies total numbers were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay using test-systems «VIDAS Anti-HAV Total (HAVT) REF 30312» («BioMerier», France).

**Results.** At the present stage the HA epidemic process demonstrates the minimal level of the basic potential, a stably low (less than 3.0 per 100,000) incidence, prevalence of adult city residents among the diseased persons, the seasonal character of the disease incidence, the infection periodic delivery from socially problem countries of the far and near abroad, prevalence of three agent subgenotypes (IA, IB, IIIA) among the circulating ones.

**Conclusion.** It has been shown that Minsk children and adolescents as well as persons aged 18—19 remain equally unprotected from the HA virus in more than 82% of cases. In case of being infected persons aged 18—19, 20—29 referred to the student social group are at a high risk for getting ill. The suspected numbers of persons in those age groups sensitive to the virus are 91.7% and 82.7%, respectively.

**Key words:** viral hepatitis A, epidemiological characteristics, antibodies protective concentration, population immunity, molecular and epidemiological monitoring, groups of risk, vaccination.

### Адрес для корреспонденции:

Гудков Владимир Георгиевич.  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.  
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 237-69-92.

Л. В. РУБАНИК, А. Н. АСТАШОНОК, Г. К. ЖАВНЕРКО,  
Н. Н. ПОЛЕЩУК

## ИНДИКАЦИЯ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* С ПОМОЩЬЮ ИММУНОМАГНИТНЫХ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ФОРМЕ ИНФЕКЦИИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

**Цель исследования.** Разработать и апробировать методику индикации *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей и функционально активных композиционных конъюгатов иммуномагнитных частиц, содержащих флюоресцентную метку.

**Материал и методы.** Соскобный материал из урогенитального тракта 45 пациентов исследован культуральным методом, ПЦР, МФА и с помощью сконструированного «микрочипа» и флюоресцентных иммуномагнитных наночастиц. В качестве положительного контроля в экспериментах использовали лабораторный штамм *C. trachomatis* СТ-869. Детекцию ДНК возбудителя осуществляли с помощью ПЦР тест-системы «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*» — Ерh. Реакцию иммунофлюоресценции проводили с использованием тест-системы «ХламиСкан». В качестве отрицательного контроля использовали интактную 2-суточную культуру клеток McCoу.

Основой (матрицей) для создания сенсорной поверхности «микрочипа» являлись стандартные предметные 8-луночные стеклянные планшеты с химически модифицированной поверхностью и иммобилизованными противохламидийными антителами. Для индикации возбудителя использовали функционально активные композиционные флюоресцентные иммуномагнитные микросферы (ММС). Учет результатов осуществляли на флюоресцентном микроскопе.

**Результаты.** Продемонстрирована эффективность выбранного нанотехнологического подхода к детекции *C. trachomatis* в пробах биологического материала, в том числе первичном соскобном материале пациентов с урогенитальной патологией.

Получены достаточно высокие показатели информативности индикации *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей и функционально активных композиционных конъюгатов иммуномагнитных частиц, содержащих флюоресцентную метку: чувствительность — 96,3%, специфичность — 100%, точность — 97,8%.

Показано, что конъюгаты ММС способны селективно связываться и концентрировать возбудителя на своей поверхности в диапазоне 5—200 частиц *C. trachomatis* на реакцию (Ме 60 частиц), что свидетельствует о возможности индикации возбудителя даже при низких концентрациях его в образце.

**Заключение.** Методом иммуномагнитной сепарации с использованием ММС, покрытых биосовместимой оболочкой и конъюгированных с аффинными противохламидийными антителами, продемонстрирована возможность детекции небольших количеств *C. trachomatis* в биологическом материале. Создан аналитический «микрочип» и получены конъюгаты ММС с флюоресцентной меткой, которые позволяют проводить индикацию и идентификацию патогена как при острой, так и персистентной форме инфекции.

**Ключевые слова:** *C. trachomatis*, персистенция, индикация, нанобиотехнология.

Заболееваемость урогенитальным хламидиозом (УГХ) во всем мире по-прежнему остается высокой.

В 2012 г. в Швеции зарегистрировано 394,4 случая УГХ на 100 тыс. населения, Дании — 476,7, Финляндии — 244,8, США — 456,7, Республике Беларусь — 93,8 случая на 100 тыс. населения (<http://www.cdc.gov>, <http://www.epinorth.org>). Особое внимание к данной инфекции обусловлено тем, что зачастую она протекает в хронической форме и приводит к серьезнейшим осложнениям не только урогенитального тракта, но и костно-суставной, дыхательной, пищеварительной, нервной и сердечно-сосудистой систем организма человека [1—3]. Считают, что известные 19 генотипов возбудителя отличаются по вирулентности, патогенности, репродуктивной активности. Показано, что серовары G, I и D ассоциированы с развитием рака шейки матки, а серовар K — с бесплодием. Проведенными ранее эпидемиологическими исследованиями установлена циркуляция на территории Республики Беларусь генотипов D, K и C [4—6]. Недавно были типированы штаммы *C. trachomatis*, относящиеся к генотипам B, G и J, в том числе и бесплазмидные варианты. Зачастую инфекция протекает в хронической форме и приводит к серьезнейшим осложнениям (бесплодию, самопроизвольным выкидышам, эктопическим и замершим беременностям, внутриутробному инфицированию плода, патологии новорожденного). Почему происходит хронизация хламидийной инфекции до конца не изучено.

Жизненный цикл возбудителя уникален и связан с образованием различных по морфологии и функциональной активности форм паразита: внеклеточных элементарных, внутриклеточных промежуточных и ретикулярных телец. Способность хламидий к трансформации в L-подобную форму или переход в другие морфологические формы (аберрантные, дефектные) осложняет диагностику хламидийной инфекции. Несмотря на существование достаточно широкого арсенала лабораторных методов (МФА, ИФА, ПЦР, культуральный), наиболее трудными с точки зрения лабораторной верификации остаются бессимптомные формы персистентной хламидийной инфекции, распространенность которых составляет 17—70% [5, 7]. Поэтому актуальным является совершенствование имеющихся и разработка новых методов лабораторной диагностики *C. trachomatis* с использованием нанотехнологических подходов.

В последнее десятилетие активное развитие нанобиотехнологии и ее достижения находят все большее применение в биологии и медицине [7—12]. Открытие так называемых квантовых точек — полупроводниковых нанокристаллов размерами 2—10 нм, обладающих уникальными флюоресцентными свойствами, послужило основой для разработки новых флюоресцентных меток. Успехи в развитии методов синтеза флюоресцентных нанокристаллов с заданными свойствами и методов функционализации их поверхности открыли пути к созданию нового класса флюорофоров для многочисленных биологических и медицинских применений. Флюоресцентные нанокристаллы детектируются как индивидуальные объекты с помощью обычных флюоресцентных микроскопов, что позволяет визуализировать процессы на уровне единичных молекул.

Достоинством нанокристаллов по сравнению с органическими флюорофорами является их высокая яркость, обусловленная большим коэффициентом поглощения, уникально высокая фотостабильность и узкий, симметричный пик эмиссии. Длина волны флюоресценции нанокристаллов зависит от их размеров, при этом для возбуждения нанокристаллов всех цветов достаточно одного источника излучения. Такие уникальные свойства делают нанокристаллы идеальными флюорофорами для сверхчувствительной детекции биологических объектов и медицинской диагностики.

В связи с вышеизложенным изыскания, направленные на применение биомаркеров нового поколения для медицинской диагностики, в том числе для индикации *C. trachomatis* при персистентной форме инфекции, являются перспективным направлением нанобиотехнологии.

Целью работы является разработка и апробация методики индикации *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей и функционально активных композиционных конъюгатов иммуномагнитных частиц, содержащих флюоресцентную метку.

### Материал и методы

Для проведения исследования использовали соборный материал из урогенитального тракта 26 пациентов с лабораторно верифицированной хламидийной инфекцией, а также образцы клинического материала 19 пациентов, в котором наличие возбудителя — *C. trachomatis* — не было подтверждено ни одним из методов (культуральный, ПЦР, МФА). Материал предварительно вносили в транспортную среду, обеспечивающую выживание *C. trachomatis* при транспортировке и хранении ( $-20^{\circ}\text{C}$ , 1—2 сут). С целью удаления избытка клеточного «дебриса» при изоляции возбудителя и повышения концентрации хламидийных частиц во внеклеточной среде проводили предварительную пробоподготовку исследуемых биопроб по методу, предложенному E. Wahlstrom и соавт. [13].

В качестве положительного контроля использовали штамм *C. trachomatis* СТ-869 (титр  $5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ) — депонент В-04/2012 от 10.10.2012 — из специализированной коллекции вирусов и бактерий РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Детекцию ДНК возбудителя осуществляли с помощью ПЦР (тест-система «АмплиСенс *C. trachomatis*» — Ерн ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Россия). Реакцию иммунофлюоресценции проводили с помощью тест-системы «ХламиСкан» («ЛабДиагностика», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали интактную 2-суточную культуру клеток McCoу.

Основой (матрицей) для создания сенсорной поверхности «микрочипа» являлись стандартные предметные 8-луночные стеклянные планшеты. Модификация поверхности планшетов включала проведение 2 основных этапов: химическая очистка их поверхности и формирование силикоксанового слоя путем обработки 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС). С целью получения сенсорных покрытий на стеклянную поверхность последовательно из водных растворов осаждали карбоксиметилдекстран (КМД) и авидин

(1 мг/мл) (A9275, «Sigma», США), после чего осуществляли целенаправленную иммобилизацию в заданные лунки «микрочипа» поликлональных противохламидийных антител (РА1-27223, «ThermoFisher Scientific», США), направленных к различным поверхностным антигенам *C. trachomatis*. Исследования всех проб с помощью сконструированного «микрочипа» проводили 3-кратно, включая использование лунок, не активированных противохламидийными антителами.

Для индикации возбудителя использовали композиционные флюоресцентные иммуномагнитные микросферы (ММС), которые получали методами коллоидной химии. С целью исключения неспецифического связывания оболочку ММС модифицировали КМД, затем проводили активацию поверхности магнитного носителя через авидинобиотиновую связь биотинилированными противохламидийными антителами. Учет результатов осуществляли на флюоресцентном микроскопе «Nikon E50i» (Япония) при возбуждающем свете с длиной волны 490 нм и фильтром 520—540 нм. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 6.0 («StatSoft Inc.»). Количественные признаки при нормальном распределении представлены в виде среднего арифметического и среднего квадратического отклонения или в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха [25%; 75%] при распределении, отличном от нормального. Для анализа взаимосвязи между показателями использовали U-критерий Манна—Уитни, непараметрический двусторонний коэффициент корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Для сравнения 2 независимых выборок использовали t-критерий Стьюдента и точный двусторонний критерий Фишера. За уровень статистической значимости принимался  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Принципиальная схема обнаружения *C. trachomatis* в пробах биологического материала на активированных сенсорных поверхностях «микрочипа» с использованием конъюгатов композиционных ММС представлена на рис. 1. На 1-м этапе в исследуемую биопробу вносятся флюоресцентные магнитные частицы, покрытые противохламидийными антителами. Если в пробе содержатся частицы *C. trachomatis*, то происходит прочное их связывание на ММС в участке контакта с противохламидийными антителами. Далее после процедур отмывки образцы ММС наносятся в определенные лунки «микрочипа», предварительно активированные поликлональными антителами. Затем после инкубации проводится тщательная отмывка лунок, при которой удаляются неспецифически адсорбировавшиеся компоненты и на «микрочипе» остаются только частицы возбудителя, связавшиеся с иммуномагнитными конъюгатами. Наличие флюоресцентной метки на поверхности магнитных микросфер позволяет визуализировать *C. trachomatis* в исследуемом образце с помощью люминесцентной микроскопии.

В сериях экспериментов продемонстрирована диагностическая эффективность сконструированного

**56 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней**

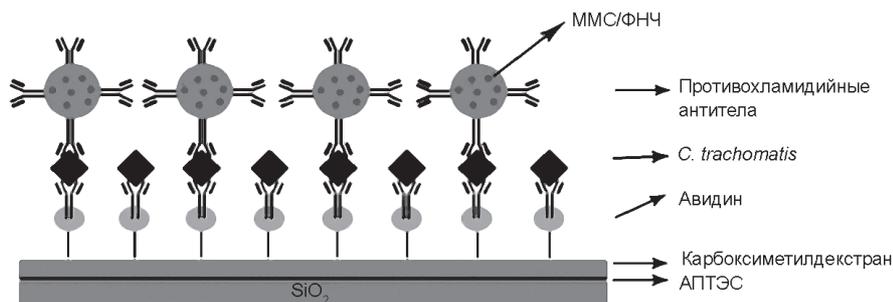


Рис. 1. Схема обнаружения *C. trachomatis* на активированных сенсорных поверхностях «микрочипа»

«микрочипа» для детекции *C. trachomatis* в пробах биологического материала, в том числе первичном соскобном материале, полученном у пациентов с урогенитальной патологией. Из 45 исследованных проб 25 (55,6%) были положительными и 20 (44,4%) — отрицательными. Трехкратное тестирование образцов показало 95,6% воспроизводимость результатов. Визуализация возбудителя с помощью люминесцентной микроскопии на разработанных сенсорных покрытиях после обработки пробы функционально активными композиционными наночастицами представлена на рис. 2.

Как видно на представленных фотографиях, в лунке «микрочипа» с пробой, содержащей *C. trachomatis*, регистрируются множественные интенсивно светящиеся ММС, располагающиеся по всему полю равномерно в виде одиночных либо небольших групп частиц.

Проведена оценка диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и точности (ДТ) разработанной методики детекции *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей и

результатов культурального исследования и разработанной методики показало, что конъюгаты магнитных частиц позволяют селективно концентрировать возбудитель на «микрочипе» только в тех биопробах (соскобный материал), в которых его наличие было подтверждено культуральным методом (таблица).

Из таблицы видно, что только 1 проба, положительная в культуре клеток, дала отрицательный результат при использовании разработанного подхода, поэтому он был интерпретирован как ложноотрицательный. Используя формулу:  $ДЧ = \frac{ИП}{ИП+ЛО} \cdot 100\%$ , был рассчитан показатель ДЧ, который составил 96,3%. В то же время при исследовании всех образцов, отрицательных в культуре клеток McCoу, получены сходные результаты при использовании композиционных наночастиц. ДС метода рассчитывалась по формуле  $ДС = \frac{ИО}{ИО+ЛП} \cdot 100\%$  и составила 100%. ДТ метода определялась, исходя из формулы  $ДТ = \frac{ИП+ИО}{ИП+ЛП+ИО+ЛО} \cdot 100\%$ , и составила 97,8%.

Таким образом, показатели информативности индикации *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей и функционально активных композиционных конъюгатов иммуномагнитных частиц, содержащих флюоресцентную метку, являются достаточно высокими.

Проводилась оценка эффективности использования иммуномагнитных частиц в качестве «носителей» для концентрирования *C. trachomatis*, определен предел обнаружения возбудителя с помощью избранного подхода. Успешное селективное связывание флюоресцентными ММС *C. trachomatis* (лабораторный

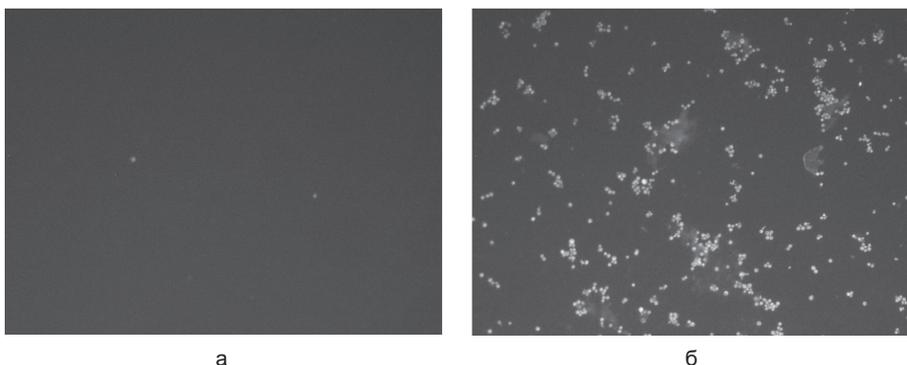


Рис. 2. Определение *C. trachomatis* в пробах биологического материала с помощью флюоресцентных иммуномагнитных микросфер: а — отрицательная проба; б — положительная проба. Ув. ×200

**Показатели информативности индикации *C. trachomatis* с использованием активированных сенсорных поверхностей «микрочипа» и функционально активных композиционных наночастиц**

Метод индикации <i>C. trachomatis</i>	Клинический материал (n=45)			
	положительная проба		отрицательная проба	
	абс.	%	абс.	%
Культуральный	26	57,8	19	42,2
С помощью «микрочипа»	25	55,6	20	44,4

штамм СТ-869) из культуральной среды продемонстрировано как при использовании цельного (неразведенного) инфекционного материала, так и при 2—16-кратном его разведении (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют, что конъюгаты ММС способны селективно связываться и концентрировать возбудитель на своей поверхности в диапазоне 5—200 частиц *C. trachomatis* на реакцию (Ме 60 частиц). Последнее указывает на возможность индикации возбудителя даже при небольшом содержании его в образце.

На основании проведенных исследований можно констатировать, что адсорбция хламидийных частиц на «микрочип» происходит лишь в том случае, когда ММС содержат на своей поверхности аффинные антитела *C. trachomatis*. В то же время отсутствие противохламидийных антител на магнитном носителе или использование неактивированных лунок микрочипа препятствует иммобилизации ММС и возбудителя на сенсорную поверхность. Следовательно, иммуномагнитные частицы осуществляют селективное концентрирование *C. trachomatis* из исследуемого материала и одновременное освобождение от неспецифически связавшихся компонентов биопробы только на тех лунках «микрочипа», которые были предварительно активированы противохламидийными антителами.

От точности результата лабораторного анализа напрямую зависит выявление этиологической причины заболевания и эффективность его лечения. Одним из тестов для верификации хламидийной инфекции, в том числе персистентной формы, является культуральный метод. Однако, как известно, он трудоемок, занимает много времени и требует высокой квалификации специалиста [14]. Кроме того, необходимо учитывать, что возбудитель может вызывать различной степени выраженности цитопатическое действие уже на первом пассаже вследствие низкой инфекционности, слабой репродуктивной активности, преобладания aberrантных ретикулярных телец. В ряде случаев только многократное пассирование в культурах клеток позволяет реверсировать

aberrантным формам микроорганизма в типичные элементарные и ретикулярные тельца.

В последнее время в медицинской практике широко используются молекулярно-биологические методы, в частности ПЦР [15, 16]. Метод является высокочувствительным и специфичным, однако получение ложноотрицательного результата возможно при малом проценте инфицированных клеток в биологическом материале, наличии в исследуемом образце ингибиторов ПЦР (слизь, кровь, гной). Очень важны и такие факторы, как потери при выделении ДНК, существование штаммов *C. trachomatis*, лишенных плазмиды, и квалификация врача, проводящего анализ. Кроме того, в 2006 г. выявлен шведский вариант *C. trachomatis*, который имеет в криптической плазмиде делецию. Коммерческие тест-системы, основной мишенью которых при выявлении *C. trachomatis*, является участок нуклеотидной последовательности видоспецифической криптической плазмиды, оказались не способны выявлять этот вариант хламидий, который, по данным шведских ученых, отмечается в 20—65% всех диагностируемых случаев хламидиоза [17, 18].

Широкое применение в практическом здравоохранении нашел и метод флуоресцирующих антител (МФА) в прямом и непрямом вариантах. Выпускается ряд коммерческих тест-систем с использованием меченных флуоресцеинизоцианатом противохламидийных антител. Метод МФА менее чувствителен, чем выделение в культуре клеток и ПЦР, но обладает достаточно высокой специфичностью (60—70%) и является экспрессным. Применение коммерческих диагностических наборов, содержащих флуоресцирующие моноклональные антитела к родоспецифическим (ЛПС) и видоспецифическим (главный наружный белок мембраны — МOMP) антигенам хламидий в сосковных препаратах урогенитального тракта значительно увеличивает чувствительность бактериоскопического метода. Недостатком метода является слабое и нестабильное свечение, невозможность хранения образцов, зависимость результата метода от качества используемых тест-систем. Меченные флуоресцеином поли- и моноклональные антитела часто дают слабый сигнал свечения. Это связано, с одной стороны, с тем, что специфические антитела нацелены на МOMP зрелых элементарных телец хламидий. Однако известно, что при персистентной форме хламидийной инфекции, как и при ряде других инфекций, репродуктивная активность возбудителя снижена, нормальный цикл формирования полноценных частиц нарушен. Устанавливается особая форма инфекции, когда от клетки к клетке передаются неполноценные частицы возбудителя (L-формы, aberrантные, презлементарные и промежуточные тельца), содержащие МOMP в относительно небольшом количестве. Кроме того, у части таких частиц отсутствует плазида и/или полноценный геном, включая низкую нагрузку ДНК и РНК, что делает невозможными или малоинформативными используемые методы молекулярной диагностики, в том числе обнаружение возбудителя по специфическому свечению.

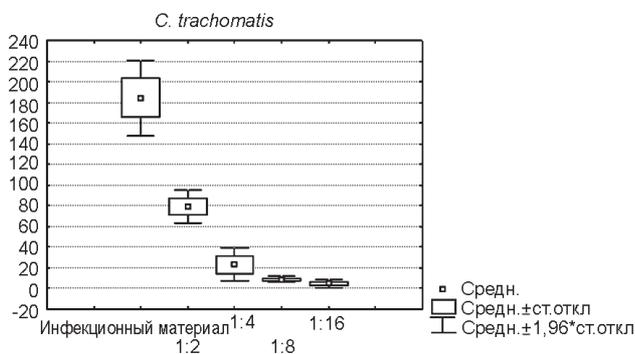


Рис. 3. Связь между разведением инфекционного материала (штамм *C. trachomatis* СТ-869) и его селективным концентрированием с использованием конъюгатов флуоресцентных иммуномагнитных частиц: ось абсцисс — разведение исходного штамма возбудителя; ось ординат — усредненное количество ММС, способное специфически связываться с *C. trachomatis* на поверхности «микрочипа»

В настоящее время во многих странах мира широко ведутся исследования по разработке нанодиагностикумов, позволяющих детектировать в тысячи раз меньшие концентрации белков, ДНК, вирусов, чем это было возможно при рутинных технологиях [9, 12, 14, 19—21]. Так, разработан биочип, позволяющий проводить экспресс-диагностику гриппа, лихорадки Денге, атипичной пневмонии в капле мокроты или крови пациента. Создан высокочувствительный биосенсорный модуль, способный выявлять *Mycobacterium tuberculosis* и его лекарственно-устойчивые формы. Завершаются работы над белковым микрочипом, с помощью которого можно выявить около 10 урогенитальных инфекций [19—23]. Однако большинство разрабатываемых и предлагаемых на рынок биочипов можно использовать только в специализированных лабораториях, требующих дорогостоящего оборудования (сканеры, анализаторы) и высококвалифицированного персонала, что затрудняет их широкое внедрение в практическое здравоохранение.

Таким образом, в представленной работе продемонстрировано, что использование сенсорных поверхностей и конъюгатов композиционных иммуномагнитных ММС позволяет селективно извлекать и концентрировать *C. trachomatis* из биологического материала даже при низких его концентрациях в пробе, а наличие интесивно светящейся метки на поверхности магнитного носителя повышает чувствительность и специфичность флюоресцентного метода исследования. Дальнейшая клиническая апробация «микрочипа» и разработанной методики детекции патогена позволит сделать заключение о его приемлемости для широкого применения в практическом здравоохранении.

## ЛИТЕРАТУРА

- Исаков В. И., Куляшова Л. Б., Березина Л. А., Сварваль А. В. // *Terra Medica*.— 2012.— № 2.— С. 8—13.
- Зигангирова Н. А., Петяев И. В., Пашко Ю. П. и др. // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*.— 2007.— Том 9, № 4.— С. 351—360.
- Козлова В. И., Пухнер А. Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий: Руководство для врачей.— М., 2003.
- Рубаник Л. В. Лабораторная диагностика хламидийно-герпетической и трихомонадной урогенитальной инфекции у людей с материалами экспериментальных исследований по разработке лечебной моновакцины на основе авторского штамма *Chlamydia trachomatis*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Минск, 2007.
- Рубаник Л. В., Асташонко А. Н., Полещук Н. Н. Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук.— 2011.— № 4.— С. 110—114.
- Хворик Д. В. Урогенитальный хламидиоз.— Минск, 2009.
- Ришук С. В. // *Terra Medica*.— 2013.— № 2.— С. 9—21.
- AbdelRahman Y. M., Belland R. J. // *FEMS Microbiol. Rev.*— 2005.— Vol. 29.— P. 949—959.
- Штыков С. Н., Русанова Т. Ю. // *Рос. хим. журн.*— 2008.— № 2.— С. 92—99.
- Олейников В. А., Суханова А. В., Набиев И. Р. // *Рос. нанотехнологии*.— 2007.— Том 2, № 1—2.— С. 160—172.
- Улащик В. С. // *Здравоохранение*.— 2009.— № 2.— С. 4—10.
- Ткачук В. А. // *Рос. нанотехнологии*.— 2009.— Том 4, № 7—8.— С. 11—13.
- Wahlstrom E., Vaananen P., Saikku P., Nurminen M. // *FEMS Microbiol. Lett.*— 1984.— Vol. 24.— P. 179—183.
- Полещук Н. Н., Асташонко А. Н., Рубаник Л. В. и др. // *Нанотехнология*.— 2012.— № 5.— С. 48—54.
- Костюк С. А., Кулага О. К., Хворик Д. Ф. *Мед. новости*.— 2006.— № 5.— С. 14—19.
- Федорова В. А., Коннова С. С., Полянина Т. И. и др. // *Изв. Саратов. гос. университета. Серия Химия. Биология. Экология*.— 2011.— Том 11, вып. 2.— С. 73—77.
- Ripa T., Nilsson P. // *Sex. Transm. Dis.*— 2007.— Vol. 34.— P. 255—256.
- Herrmann B., Torner A., Low N., et al. // *Emerg. Infect. Dis.*— 2008.— Vol. 14.— P. 1462—1465.
- Дембски С., Пробст Й., Геллерманн К. и др. // *Нанотехнология*.— 2012.— № 2.— С. 56—59.
- Чечеткин В. Р., Прокопенко Д. В., Макаров А. А., Заседа-телев А. С. // *Рос. нанотехнологии*.— 2006.— № 1.— С. 13—27.
- Разумов А. С. *Медицина в Кузбассе*.— 2009.— № 2.— С. 3—11.
- Lazcka O., Campo F. J., Munoz F. X. // *Biosens. Bioelectron.*— 2007.— Vol. 22.— С. 1205—1217.
- Zubtsova Zh. I., Zubtsov D. A., Savvatteeva E. N., et al. // *Biotechnology*.— 2009.— Vol. 144.— P. 151—159.

Поступила 08.08.14.

### CHLAMYDIA TRACHOMATIS INDICATION USING IMMUNOMAGNET FLUORESCENT NANOPARTICLES IN CASE OF INFECTION PERSISTENT FORM

L. V. Rubanik, A. N. Astashonok, G. K. Zhavnerko, N. N. Poleshchuk

**Objective.** The purpose of the study consisted in development and approbation of a technique for the *C. trachomatis* indication using activated sensor surfaces and functionally active composite conjugates in immunomagnet nanoparticles containing a fluorescent label.

**Materials and methods.** The urogenital scraping material of 45 patients was studied using the cultural method, PCR, MFA, and a microchip constructed and fluorescent immunomagnet nanoparticles. *C. trachomatis* laboratory strain CT-869 was used in the experiments as a positive control. The pathogen DNA was detected using a PCR system «AmpliSense *C. trachomatis*» — Eph. Immunofluorescence reactions were carried out using a test system «ChlamiScan». The intact two-day McCoy cell culture was used as a negative control. Standard 8-cell glass titer plates with a chemically modified surface and immobilized anti-*Chlamydia* antibodies were used as a base (matrix) for creating a microchip sensor surface. Functionally active composite fluorescent immunomagnet microspheres (MMS) were used for the pathogen indication. The results were registered at a fluorescent microscope.

**Results.** The chosen nanotechnological approach to the *C. trachomatis* detection in biological material samples including scraping material was shown to be efficient in patients suffering from urogenital pathologies. Highly informative values of the *C. trachomatis* indication were obtained when activated sensor surfaces and functionally active composite conjugates of immunomagnet particles containing a fluorescent label were used, i.e. sensitivity was 96.3%, specificity — 100%, accuracy — 97.8%. The MMS conjugates were shown to bind selectively and to concentrate pathogens on their surface within the 5—200 particles of *C. trachomatis* per reaction (Me — 60 particles) evidencing that the pathogen could be detected even when its concentration in the sample was low.

**Conclusion.** Immunomagnet separation using MMS covered with a biocompatible coating and conjugated with affine anti-*Chlamydia* antibodies was shown to detect *C. trachomatis* small amounts in a biological material. An analytical microchip was developed and MMS conjugates with fluorescent labels making possible the pathogen indication and identification during both the infection acute and the persistent forms were obtained.

**Key words:** *C. trachomatis*, persistence, indication, nanobiotechnology.

#### Адрес для корреспонденции:

Рубаник Людмила Владимировна.  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.  
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сп. тел. 267-95-92.

Е. Л. ГАСИЧ, В. Ф. ЕРЁМИН, С. В. СОСИНОВИЧ,  
М. В. ДОМНИЧ, М. А. ЧЕРНОВЕЦКИЙ,  
И. Г. ЛУКЪЯНЕНКО, Л. М. ГУЩИНА, О. Н. РОМАНОВА

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С У ДЕТЕЙ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава  
Республики Беларусь, РНПЦ детской онкологии,  
гематологии и иммунологии Минздрава Республики Беларусь

*В рамках проведенных молекулярно-генетических исследований установлена частота выявления различных генотипов вируса гепатита С (ВГС) у детей со злокачественными новообразованиями (ЗН) на территории Республики Беларусь. Показано, что наиболее распространенным среди детей данной группы являются подгенотипы 1b (88,1%), 3a (7,1%) и 1a (2,4%). Аналогичные данные получены при генотипировании вируса по участку NS5 генома вируса. Так, в 91,2% исследованных проб выявлен подгенотип 1b, в 5,9% — 3a и 2,9% — 1a. У 1 ребенка обнаружена рекомбинантная форма вируса 1d/1b. Установлено, что 1b-подгенотип ВГС, выделенный у пациентов с ЗН, образует самостоятельные филогенетические кластеры, что указывает на множественное инфицирование данным подгенотипом вируса.*

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, злокачественные новообразования, генотип, подгенотип, филогенетический анализ.

Широкое распространение, множественность путей передачи и недостаточно разработанная терапия делают проблему вирусных гепатитов одной из наиболее актуальных в здравоохранении. Это касается как острой, так и хронической форм гепатита, вызываемых вирусом гепатита С (ВГС).

По оценочным данным, в мире около 3% от всего населения инфицировано ВГС [1]. Играв незначительную роль в этиологической структуре острых вирусных гепатитов, он является ведущим в развитии хронических форм поражений печени у 70—85% пациентов. Через 15—20 лет после инфицирования почти у половины зараженных лиц ВГС вызывает развитие цирроза печени (ЦП) или гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Ежегодно в Беларуси около 3 тыс. человек заболевают ВГС, 10% из них составляют дети в возрасте до 18 лет.

Риск неблагоприятного исхода заболевания с развитием ЦП или ГЦК у хронически инфицированных пациентов значительно повышается при инфицировании ВГС в детстве. Особую актуальность эта проблема имеет для пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗН). В России общая инфицированность детей вирусами гепатитов В и С, перенесших ЗН, достигает 75%. Из них 25—30% случаев вызваны вирусом гепатита В (ВГВ), 35—45% — ВГС. Значительное количество пациентов приобретало ВГС-инфекцию в процессе лечения основного заболевания. После введения рутинного скрининга донорской крови на наличие антител к ВГС количество новых

случаев существенно уменьшилось, однако распространенность ВГС-инфекции по-прежнему составляет от 6 до 15% как у взрослых, так и у детей [2]. Это объясняется тем, что путь инфицирования пациентов ВГС через донорскую кровь или ее продукты для таких пациентов является не единственным. В настоящее время известны также случаи внутрибольничного инфицирования ВГС пациентов, находящихся на гемодиализе, через медицинское оборудование, в гематологических отделениях, при хирургических вмешательствах [3—5]. Высокий уровень инфицирования вирусами гепатитов у пациентов с ЗН обусловлен проведением частых инвазивных вмешательств и массивной трансфузионной нагрузкой, связанной с полихимиотерапией (ПХТ), иммуносупрессией и токсическим медикаментозным поражением печени. Показано, что риск инфицирования ВГС при ЗН прямо пропорционален количеству переливаний крови и ее препаратов [6].

Хронические вирусные гепатиты (ХВГ) у детей с ЗН в большинстве случаев протекают латентно, что не позволяет своевременно их диагностировать. В связи с этим необходимо применять методы, позволяющие выявлять возбудителя в ранние сроки инфицирования и, соответственно, предотвращать развитие хронической формы инфекции. У пациентов с ЗН, получающих ПХТ, диагностика ВГС имеет некоторые особенности, поскольку отмечается снижение синтеза противовирусных антител вследствие иммуносупрессивного действия данного вида терапии. В связи с этим после инфицирования сероконверсия, то есть появление антител к ВГС, на фоне такой терапии может произойти намного позже или не произойти вовсе. В настоящее время наиболее надежным и специфичным методом лабораторной диагностики для данной группы пациентов является определение РНК ВГС методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Молекулярно-генетические исследования, направленные на выявление генетических маркеров ВГС, позволяют не только определить присутствие вируса в пробе, провести идентификацию его генотипа, что важно при выборе тактики терапии, поскольку установлена связь между генотипом вируса и тяжестью течения заболевания, но и определить родственные связи между вирусами.

В настоящее время выделяют 7 генотипов и 67 подгенотипов ВГС, которые имеют различное географическое распространение [7]. Помимо генотипов/подгенотипов ВГС описана циркуляция рекомбинантных форм вируса. Процесс рекомбинации для ВГС является достаточно редким явлением и происходит как между разными генотипами, так и между подгенотипами одного генотипа. В настоящее время описаны 2k/1b, 1b/1a, 2b/1b, 2a/1a, 4a/4d и другие циркулирующие рекомбинантные формы, которые имеют не только широкое географическое распространение, но и разную чувствительность к терапии. Для выявления этих вирусов необходимо проводить исследования нуклеотидных последовательностей удаленных участков генома вируса (core/E1 и NS5) [8]. В резуль-

тате проведенных исследований, выполненных в 2006—2011 гг., установлено, что среди взрослых пациентов, инфицированных ВГС, в республике преобладают подгенотипы 1b (53,8%), 3a (38,5%), 1a (5,1%), 4a (1,3%) и 4d (1,4%), что коррелирует с данными о распространенности вируса на территории Европы и России [9].

Целью данной работы является молекулярно-генетическая характеристика ВГС у детей с ЗН, получающих массивную гемотрансфузию на фоне ПХТ, и определение возможных источников и путей его распространения. Следует отметить, что до настоящего времени в Беларуси такие исследования не проводились.

### Материал и методы

В исследование включены 46 детей с ЗН, находившихся на лечении в РНПЦ ДОГиИ в период 2001—2013 гг. Среди обследованных было 10 (21,7±6,1%) девочек в возрасте от 3 мес до 24 лет и 36 (78,3±6,1%) мальчиков в возрасте от 1 мес до 29 лет. Жителями Республики Беларусь являлись 33 пациента (71,7±6,6%), 13 (28,3±6,6%) — из стран ближнего зарубежья (из Украины — 5, Казахстана — 5, Азербайджана — 1, Таджикистана — 1). У 32 (69,6±6,8%) пациентов забор крови проводился многократно на протяжении 2001—2013 гг., у 14 (30,4±6,8%) — однократно. Критерием отбора являлся положительный тест на наличие в сыворотке/плазме крови РНК ВГС.

Серологические исследования для определения антител к ВГС методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили на тест-системах:

— HCV version 3.0 «Hepatitis C virus Encoded Antigen (Recombinant HCr43, c200, c100-3, NS5)» ИФА на микрочастицах «MEIA» с использованием анализатора AxSYM («Abbott», Германия);

— Antibody to hepatitis C virus (anti-HCV) электрохемилюминесцентный иммуноанализ «ECLIA» с использованием анализатора «Cobas 411».

ПЦР-диагностика. Выделение РНК из сыворотки/плазмы крови выполняли с использованием «Комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб», «РНК-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Все манипуляции проводили согласно инструкциям производителя наборов.

Качественную и количественную ПЦР для выявления РНК ВГС выполняли с помощью тест-системы «Cobas Amplicor HCV Test» и «Cobas Amplicor HCV Monitor Test» («Roche», США) с применением автоматического ПЦР-анализатора «Cobas Amplicor».

Постановка ПЦР и секвенирующей ПЦР выполнена на амплификаторе «BioRad CFX-96» (США) согласно методике, описанной ранее [10].

### Результаты и обсуждение

Исследовано 132 образца сыворотки/плазмы крови, полученных у 46 детей с ЗН, на наличие антител к ВГС. Результаты серологических тестов показали, что у 42 (91,3±4,2%) из 46 обследованных детей при-

существовали антитела к ВГС. Во время первичного обследования у 4 (8,7±3,6%) пациентов антитела не выявлялись при определяемой вирусной нагрузке (от  $1,6 \cdot 10^4$  до  $2,1 \cdot 10^6$  МЕ/мл). При повторном исследовании проб, взятых в более поздние сроки, антитела к ВГС обнаружены у 3 (6,5±3,6%) пациентов. У 1 ребенка антитела выявлены не были. Полученные результаты свидетельствуют о наличии периода «серонегативного окна», которое может достигать 6 мес от момента первичного инфицирования.

У пациента № 43-ОГ с диагнозом «апластическая анемия», который был установлен в 2002 г., сыворотка крови исследовалась в 2005 г. и 2011 г. На протяжении всего периода наблюдения пациент получил 37 трансфузий препаратов крови. Специфический иммунный ответ на ВГС отсутствовал в течение 7 лет наблюдения, несмотря на активную продукцию вируса, подтвержденную вирусной нагрузкой, которая сохранялась практически на одном уровне в течение этого периода времени —  $3,08 \cdot 10^4$  МЕ/мл в 2005 г. и  $6,05 \cdot 10^5$  МЕ/мл — в 2011 г.

Таким образом, у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию, может отсутствовать серологический ответ, поэтому и наиболее информативной является молекулярно-генетическая диагностика, позволяющая выявить РНК ВГС как качественным, так и количественным методами ПЦР.

Проведенные молекулярно-генетические исследования позволили установить генотип ВГС у 42 (91,3±4,2%) пациентов по участку гена структурных белков core/E1 и у 34 (73,9±6,5%) — по участку гена неструктурного белка NS5 ВГС (рис. 1). Из 42 нуклеотидных последовательностей по участку core/E1 генома ВГС 37 (88,1±5,0%) относились к подгенотипу вируса 1b, 3 (7,1±4,0%) — к 3a, по 1-му (2,4±2,4%) — к 1a и 1d. Результаты, полученные по участку NS5 генома ВГС, практически полностью совпадали с данными, полученными в результате генотипирования участка структурного гена. Так, подгенотип 1b выявлен в 31 (91,2±4,9%) образце сыворотки крови, 3a — в 2 (5,9±4,0%) и 1a — в 1 (2,9±2,9%). В то же время филогенетический анализ последовательностей ВГС, выделенных у пациента № 1—2\_ОГ в 2011 г. и 2013 г., соответственно показал, что по участку структурного гена core/E1 данные образцы кластрируются с подгенотипом 1d, а по участку неструктурного гена NS5 — с подгенотипом 1b. Таким образом, можно сделать заключение, что у данного пациента выявлена рекомбинантная форма вируса 1d/1b, которая ранее не встречалась на территории Беларуси (см. рис. 1). Среднее различие между нуклеотидными последовательностями подгенотипа 1d, выделенного из образцов плазмы крови № 1 и № 1d (образцы получены от одного пациента в 2011 г. и в 2013 г.) по наиболее консервативному участку генома core/E1, составило 12%, что свидетельствует о высокой изменчивости вируса. Однако для полной характеристики этого изолята требуется полное геномное секвенирование.

С целью установления возможной смены доминирующего генотипа/подгенотипа вируса после массо-

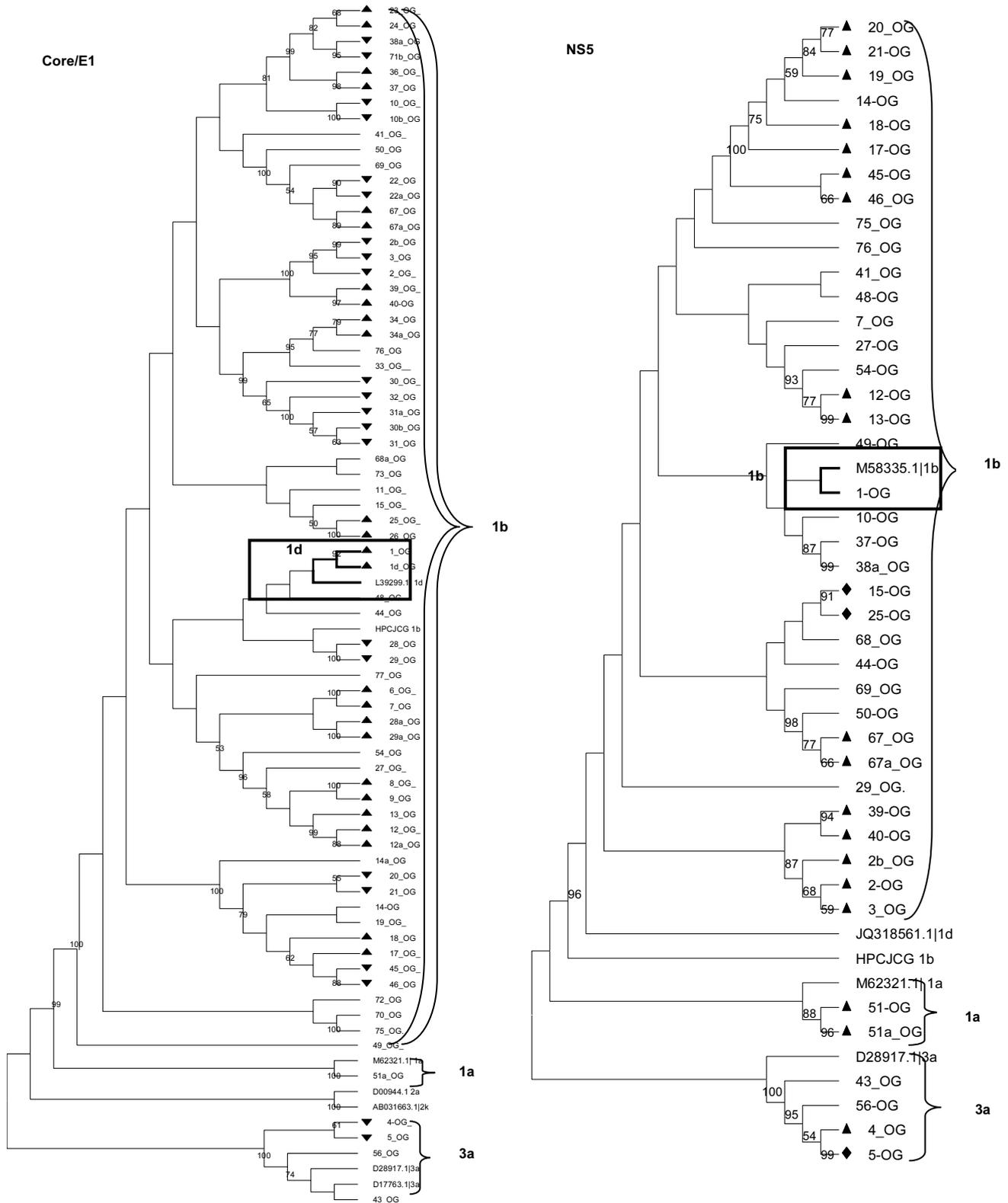


Рис. 1. Филогенетический анализ последовательностей ВГС core/E1 и NS5, выделенных у детей с ЗН. Филогенетическое дерево построено по методу neighbor-joining (объединение ближайших соседей) и Kimura 2, параметр модели ( $P < 0,05$ ). Отмечены парные образцы, полученные у одного пациента в разное время

вых переливаний препаратов крови, выполнено исследование парных образцов сыворотки/плазмы крови, полученных у 19 пациентов в различное время. Установлено, что ни у одного из пациентов за период

наблюдения смена генотипа/подгенотипа ВГС не отмечена.

Результаты исследований проб РНК, полученных от 1 пациента в 2001 г. (№ 2\_ОГ), в 2011 г. (№ 2b\_ОГ)

и 2013 г. (№ 3\_ОГ) по участкам core/E1 и NS5 генома вируса показали, что его более высокая гетерогенность наблюдалась по участку NS5, которая составила 0,6%, по участку core/E1 — 0,2%. Учитывая, что временной период между взятием крови был более 10 лет, а переливания препаратов крови были выполнены данному пациенту в 1994—1996 гг., можно сделать заключение, что такие генетические различия связаны только с более высокой вариабельностью участка NS5 генома по сравнению с консервативным core/E1.

Сравнительный анализ индивидуальной изменчивости вируса по участку генома core/E1 у пациентов, получающих гемотрансфузии в течение всего периода наблюдения, показал, что либо вирусы генетически не различались друг от друга (образцы № 8\_ОГ и 9\_ОГ), либо отличия варьировали от 0,4 до 2,4% (образцы № 4\_ОГ и 5\_ОГ, образцы № 14\_ОГ и 14а\_ОГ соответственно). Наблюдаемая гетерогенность последовательностей этих вирусов, вероятно, обусловлена заражением другими вариантами вируса, относящимися к 1b-субтипу, во время переливаний крови или ее препаратов.

Инфицирование ВГС пациентов с ЗН, получающих массовые (67 гемотрансфузий препаратов крови у пациента № 63\_ОГ) или единичные (№ 61\_ОГ) переливания, происходило либо через несколько лет, либо в течение нескольких месяцев от начала проведения данной процедуры. Так, пациенту № 10\_ОГ основной диагноз ЛГМ установлен в 1991 г., а маркеры ВГС впервые выявлены в 1999 г., пациенту № 27\_ОГ основной диагноз ОЛЛ установлен в 1997 г., ВГС определен в 1999 г., пациенту № 30\_ОГ основной диагноз МДС установлен в 1995 г., ВГС-инфекция — в 1996 г. Основной риск инфицирования в этот период времени связан, в первую очередь, с переливанием препаратов крови, которые не подлежали хранению (тромбомасса, эритроцитная масса и т. д.). В настоящее время в таких случаях исследования проводятся методом ПЦР, позволяющим в ранние сроки инфицирования выявить у донора РНК ВГС даже при отсутствии серологического ответа, то есть в период «серологического» окна. Несмотря на это, случаи инфицирования через препараты донорской крови все еще встречаются. Так, у пациента № 41\_ОГ (Беларусь), которому основной диагноз ОЛЛ был поставлен в феврале 2011 г. и который на протяжении февраля — марта 2011 г. получил 4 гемотрансфузии, в августе этого же года развился острый ВГС.

Хотя трансфузионный путь инфицирования пациентов с ОГЗ является преобладающим, существует вероятность и других путей заражения, что нашло подтверждение в повседневном исследовании. Так, пациенты № 15\_ОГ (брат) и 25\_ОГ (сестра) не получили гемотрансфузии и не имели родственников с ВГС-инфекцией, тем не менее оба оказались инфицированными ВГС. Филогенетический анализ вирусов выявил их генетическое родство («одна филогенетическая ветвь»), при этом различия между нуклеотидными последовательностями ВГС по участку core/E1 составили 2,4%, а по NS5 — 3,8%.

Сравнительный молекулярно-генетический анализ 250 образцов подгенотипа 1b ВГС, выделенных у пациентов, проживающих в Беларуси, и пациентов с ЗН, показал, что практически все нуклеотидные последовательности РНК ВГС у пациентов с ЗН образуют 8 самостоятельных филогенетических кластеров, что указывает на множественное инфицирование разными вариантами подгенотипа вируса 1b (рис. 2).

Для пациентов с ЗН ВГС является серьезной проблемой, наличие которой может оказать существенное влияние на течение основного заболевания и снизить качество их жизни. Кроме того, эти пациенты рассматриваются как группа с высоким риском гемоконтактного инфицирования, которая может инфицировать как других пациентов, так и медицинский персонал, а в период пребывания вне стационара способна распространять вирус в своем окружении. После введения скрининга донорской крови на наличие антител к ВГС количество новых случаев инфицирования уменьшилось до 6—15% [11]. В Беларуси, по данным РНПЦ ДОГиИ, в последние 5 лет наблюдается не более 5 случаев первичных гепатитов С.

Результаты проведенных исследований показали, что диагностика ВГС у пациентов с ЗН имеет свои особенности. Так, при исследовании плазмы крови 46 детей, в которой ВГС содержался в различной концентрации (определяемая вирусная нагрузка), серологический ответ установлен у 42 пациентов (91,3%). Раннее обнаружение РНК ВГС важно для иммунокомпromетированных пациентов, так как их иммунная система не способна продуцировать антитела к ВГС. Введение в протокол обследования современных генетических методов позволит в значительной степени предотвратить распространение ВГС-инфекции, что коррелирует с данными, полученными исследователями из Польши [12].

Результаты выполненных молекулярно-генетических исследований по участкам генов core/E1 и NS5 ВГС позволили установить, что удельный вес подгенотипа 1b у детей с иммуносупрессией составляет, как указано выше, почти 90%, в то время как в целом по республике он выявляется только у половины всех пациентов (53,8%) [9]. Данные различия связаны, в первую очередь, с более высокой частотой распространения подгенотипов ВГС 1a и 3a среди ВИЧ-инфицированных. Известно, что почти 80% ВИЧ-инфицированных с инъекционным путем заражения имеют ко-инфекцию ВГС.

Доминирование подгенотипа ВГС 1b среди пациентов с ЗН также отмечается в Литве [13]. В то же время в Польше у 82 из 87 обследованных детей выявлен подгенотип 1a, только у 2 — 1b, у 1 — 1a/1b и у 1 — 1a/3a [12]. Учитывая, что среди доноров крови в Польше преобладает 1b-субтип ВГС, распространение его у детей с ЗН, по мнению авторов, связано с горизонтальным путем передачи вируса. У этих пациентов ВГС выявлялся как в слюне, так и моче, хотя и в меньшей концентрации, при этом вероятность распространения ВГС-инфекции среди детей значи-

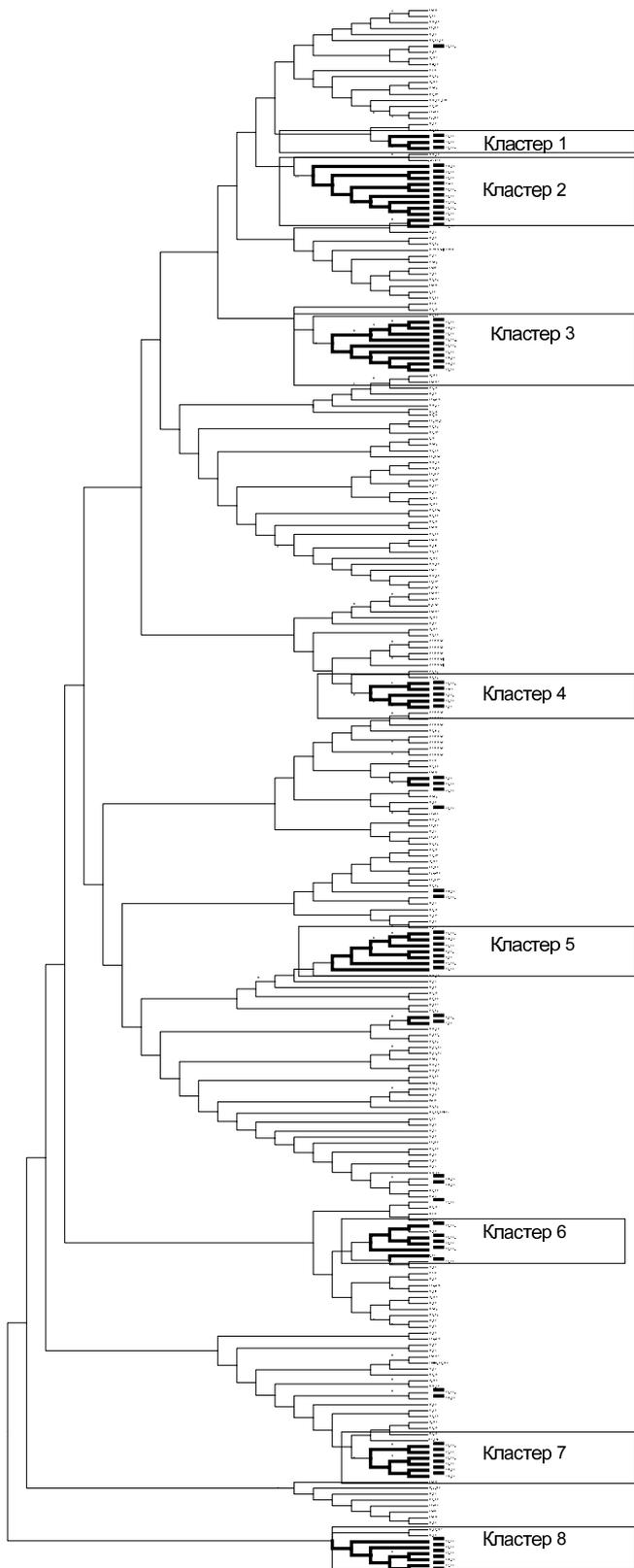


Рис. 2. Филогенетический анализ core/E1 региона 1b подгенотипа ВГС, выделенного у 250 пациентов, проживающих в Республике Беларусь. Филогенетическое дерево построено с использованием метода UPGMA Maximum Likelihood model Mega 5.1, ( $P < 0,05$ ) (выделены в отдельные кластеры пациентов с ЗН)

тельно возрастает из-за высокой частоты микротравм кожи и слизистых оболочек.

На территории нашей страны рекомбинантная форма вируса 1d/1b (№ 1-2\_ОГ) до сих пор не встречалась. Впервые подгенотип вируса 1d был описан в 1995 г. у пациента с хронической ВГС-инфекцией, проживающего в Нидерландах. В настоящее время в европейских странах время он выявляется в виде спорадических случаев [14].

Использование методов молекулярной биологии является мощным инструментом для эпидемиологического расследования передачи ВГС-инфекции в медицинских учреждениях. В частности, филогенетический анализ применяется для идентификации источника инфекции. Основным путем распространения вируса среди детей с ЗН являются массовые гемотрансфузии крови или ее компонентов (эритроцитная или тромбомаасса), которые не подлежат карантинизации. Тем не менее в литературе описаны вспышки ВГС-инфекции после перкутанных процедур, имеются четкие молекулярно-генетические доказательства горизонтальной передачи вируса 3 детям, находящимся на лечении в одной палате. Так, у 2 детей нуклеотидные последовательности ВГС были идентичными, а у 1 — отличались на 3 нуклеотида, хотя источник вируса установить не удалось [15]. Аналогичные случаи распространения инфекции в онкологических и гематологических отделениях описаны в сообщениях других авторов [16]. В то же время только в работах отдельных авторов использован метод секвенирования для расшифровки случаев инфицирования «пациент — пациент» [17].

В большинстве внутрибольничных вспышек эпидемиологическое расследование не дает возможности точно определить источник или способ передачи ВГС, что связано с бессимптомным течением инфекции. Выполненный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей по участкам core/E1 и NS5 генома ВГС у пациентов с ЗН не показал наличия общих источников инфицирования. Тем не менее формирование отдельных кластеров нуклеотидными последовательностями подгенотипа 1b ВГС, полученными у детей с ЗН, свидетельствует о возможных случаях множественного инфицирования через донорскую кровь или ее препараты.

Кроме основного парентерального пути инфицирования, существует возможность распространения инфекции горизонтальным путем или через другие медицинские манипуляции, как это показано нами для пациентов № 25\_ОГ и 15\_ОГ, которые не получали гемотрансфузии.

Таким образом, результаты проведенных молекулярно-генетических исследований показали, что у детей, находящихся на лечении в онкологических и гематологических стационарах республике, доминирующим является подгенотип 1b, на долю которого приходится почти 90% от всех случаев заражения. Учитывая, что у пациентов с иммуносупрессией снижена продукция специфических антител к ВГС, необходимо рассматривать метод ПЦР как скрининговый.

Исследования плазмы крови пациента методом ПЦР необходимо проводить как при поступлении в клинику, так и после каждой гемотрансфузии с целью усовершенствования профилактических мероприятий, направленных на сокращение случаев инфицирования ВГС при гемотрансфузиях и распространения инфекции горизонтальным путем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Alter M. J. // *J. Gastroenterol.*— 2007.— Vol. 13, № 17.— P. 2436—2441.
2. Рейзис А. Р., Нурмухамедова Е. А. // *Клиническая онкогематология.*— М., 2001.— С. 539—553.
3. Locasciulli A., Testa M., Valsecchi M. G., et al. // *Blood.*— 1997.— Vol. 90, № 9.— P. 3799—3805.
4. Allander T., Gruber A., Naghavi M., et al. // *Lancet.*— 1995.— Vol. 345, № 8950.— P. 603—607.
5. Esteban J. I., Gomez J., Martell M. // *N. Engl. J. Med.*— 1996.— Vol. 334, № 9.— P. 555—560.
6. Khalifa A. S., Mitchell B. S., Watts D. M., et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.*— 1993.— Vol. 49, № 3.— P. 316—321.
7. Smith D. B., Bukh J., Kuiken C., et al. // *Hepatology.*— 2014.— Vol. 59, № 1.— P. 318—327
8. Avo A. P., Agua-Doce I., Andrade A., Padua E. // *J. Med. Virol.*— 2013.— Vol. 85, № 5.— P. 815—822.
9. Гасич Е. Л., Еремин В. Ф., Сосинович С. В. и др. // *Материалы V Ежегодного Всерос. конгресса по инфекционным болезням.*— Москва, 2013.— С. 99.
10. Гасич Е. Л., Еремин В. Ф., Сосинович С. В., Пинчук М. Г. // *Здравоохранение.*— 2010.— № 12.— С. 27—34.
11. Katsoulidou A., Paraskevis D., Kalapothaki V., et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.*— 1999.— Vol. 14, № 5.— P. 1188—1194.
12. Januszkiewicz-Lewandowskayz D., Wysockiy J., Rembowska J., et al. // *J. Hosp. Infect.*— 2003.— Vol. 53, № 2.— P. 120—123.
13. Stikleryte A., Griskeviciene J., Magnius L. O., et al. // *J. Med. Virol.*— 2006.— Vol. 78, № 11.— P. 1411—1422.
14. Van Doorn L. J., Kleter G. E., Stuyver L., et al. // *J. Gen. Virol.*— 1995.— Vol. 76 (Pt 7).— P. 1871—1876.
15. Knoll A., Helming M., Peters O., Jilg W. // *Lab. Invest.*— 2001.— Vol. 81, № 3.— P. 251—262.
16. Visona K., Baez F., Taylor L., et al. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*— 2002.— Vol. 9, № 3.— P. 622—626.
17. Gonzalez-Candelas F., Wrobel B., Moya A. // *BMC Biol.*— 2013.— Vol. 11.— P. 76.

Поступила 08.08.14.

#### GENETIC DIVERSITY OF HEPATITIS C VIRUS CIRCULATING IN POPULATION OF CHILDREN WITH MALIGNANCIES

E. L. Gasich, V. F. Eremin, S. V. Sosinovich, M. V. Domnich, M. A. Chernovetsky, I. G. Lukiyanenko, L. M. Gushchina, O. N. Romanova

During molecular genetic investigations the frequency of different genotypes/subtypes of hepatitis C virus (HCV) in children with malignant diseases (MD) was established in the Republic in Belarus. It was shown that 1b (88.1%) genotype, followed by 3a (7.1%) and 1a (2.4%) subtypes of HCV were the most common among children with malignancies. Similar results were obtained for genotyping the virus genome NS5 region. Thus, 91.2% of the investigated samples were detected subtype 1b, 5.6% — subtype 3a, and 2.9% — subtype 1a. One child was found a recombinant form of virus 1d/1b. It was established that the HCV subtype 1b isolated from patients with MD formed distinct phylogenetic clusters. This indicates at multiple infecting with 1b subtypes of virus.

**Key words:** hepatitis C virus, malignancies, genotype, subtype, phylogenetic analysis.

#### Адрес для корреспонденции:

Гасич Елена Леонидовна.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 268-04-42.

Е. И. БОРЕКО, Н. И. ПАВЛОВА, О. В. САВИНОВА

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

**Цель исследования.** Изучение противовирусных свойств природных тритерпеновых соединений в экспериментах на культуре клеток и лабораторных животных.

**Материал и методы.** Лупеол, бетулин, бетулоновая и бетулиновая кислоты синтезированы в Институте органической химии Уфимского научного центра РАН. Их противовирусные свойства определяли в экспериментах на культурах клеток с вирусами простого герпеса 1-го типа, гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и ЕСНО 6. При выполнении экспериментов на животных использовали беспородных белых мышей, экспериментальные мази бетулина и бетулиновой кислоты, а также ацикловира и бутаминофена как препаратов сравнения.

**Результаты.** Установлено, что исследованные вещества обладают наиболее высокой ингибирующей активностью в отношении вируса герпеса, в частности бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты. В отношении вирусов гриппа А (H7N1) и ЕСНО 6 эти соединения неактивны или проявляют малозаметную активность. В экспериментах на лабораторных животных (кожный герпес белых мышей) наиболее высока эффективность мази бетулина.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о перспективности природных тритерпеновых соединений для разработки на их основе противовирусных лекарственных средств.

**Ключевые слова:** лупеол, бетулин, бетулиновая кислота, бетулоновая кислота, противовирусные свойства, экспериментальный кожный герпес.

Из индивидуальных веществ, получаемых из растительного сырья, значительное внимание уделяется тритерпеноидам. Характерными представителями природных лупановых тритерпеноидов являются лупеол, бетулин, бетулиновая и бетулоновая кислоты.

Интерес к противовирусным свойствам соединений тритерпенового ряда вызван тем, что производные бетулиновой кислоты идентифицированы как новый класс потенциально селективных ингибиторов ВИЧ-1 [1]. Считается, что производные бетулиновой кислоты блокируют начальные (слияние) и/или заключительные стадии взаимодействия вируса с клеткой. Поскольку стадия слияния является общей для всех оболочечных вирусов, рабочей гипотезой при выполнении исследования стало предположение, что противовирусные свойства производных бетулиновой кислоты, вероятно, не ограничиваются только ВИЧ [2].

Целью настоящего исследования явилось исследование противовирусных свойств природных тритерпеновых соединений в экспериментах на культуре клеток и лабораторных животных.

### Материал и методы

В работе использовали вирусы простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), гриппа A/FPV/Rostock/34 (H7N1)

и ЕСНО 6, полученные из Национальной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского РАН. Бетулин, бетулоновая и бетулиновая кислоты, а также другие тритерпеноиды синтезированы в Институте органической химии Уфимского научного центра РАН.

Противовирусные свойства определяли в экспериментах на культурах клеток методом редукции бляшек на культуре первичных фибробластов эмбрионов кур (ФЭК) с FPV и методом оценки цитопатического эффекта (ЦПЭ) на культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD) с ВПГ-1 и вирусом ЕСНО 6, как описано нами ранее [3]. Изучаемые соединения предварительно растворяли в 10% растворе этанола и затем готовили ряд последовательных разведений на среде поддержки, как правило, двукратных, до получения требуемых концентраций. Критерием противовирусного действия считали снижение титра вируса в присутствии соединений в сравнении с контролем. Вычисляли также концентрации 50% и 95% подавления размножения вируса (средне- и 95% эффективная концентрации —  $EC_{50}$  и  $EC_{95}$ ) и отношение максимальной переносимой концентрации (МПК) к  $EC_{50}$  и  $EC_{95}$ . МПК соединений для неинфицированных культур клеток определяли после 72 ч инкубации.

Вирулицидные свойства исследовали в отношении ВПГ-1. Вирусосодержащую суспензию объединяли с равным объемом разведений исследуемого вещества на среде поддержки. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 60 мин. Инфекционность остаточного вируса определяли по наличию ЦПЭ методом конечных разведений. Снижение титра вируса под влиянием исследуемого вещества за время экспозиции вычисляли как разность между значениями снижения титра вируса в точках «0» (без экспозиции) и «60» (с экспозицией).

При выполнении экспериментов на животных использовали беспородных самцов белых мышей массой 20—25 г (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), ВПГ 1-го типа (ВПГ, штамм 1 С), экспериментальные мази ацикловира (2,5%) и бутаминофена (1%), подготовленные в РУП «Белмедпрепараты». Вирус поддерживали в рабочем титре ( $6 \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл) пассированием на культуре клеток RD. Экспериментальный герпес мышей воспроизводили согласно методу, описанному М. R. Boyd и соавт. [4], с некоторыми изменениями, имеющими отношение в основном к способу наркотизации и используемому штамму вируса. Животных вводили в наркоз с помощью эфира до начала стадии засыпания. Внутреннюю поверхность правой ушной раковины каждой мыши скарифицировали инъекционной иглой, затем наносили 20 мкл вирусосодержащей жидкости (среда DMEM с 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота). Лечение животных (по 5—7 в каждой группе) начинали на следующий день после инфицирования и продолжали в течение 5 сут. Мази наносили 3 раза в сутки (9:00, 15:00 и 21:00). Об эффективности препаратов судили по степени развития признаков поражения, основными из которых являлись обратимые эри-

тема и пузырьки (корки, струпы, язвы на месте их образования), а также необратимые несращения и перфорации тканей уха в местах скарификации. Наличие эритемы в зависимости от степени выраженности и площади охвата оценивали в 0,5 балла или 1 балл; наличие везикул, корок, струпов, язв — от 1 до 2 баллов (1 — изолированные поражения, 2 — сливные). Оценки эритемы и наличия везикул суммировали. Для каждой группы животных вычисляли средний балл. Необратимые несращения мест скарификации или перфорации тканей уха оценивали отдельно как дополнительный признак, поскольку в общей сумме оценок он мешал определению сроков выздоровления.

Учитывая неодинаковую начальную реакцию на скарификацию после инфицирования, усредненные экспериментальные данные подвергали дополнительной обработке. Вычисляли общее среднее значение оценок для всех групп животных в 1-е сутки после инфицирования ( $x_{cp}$ ). Разность средних оценок в отдельных группах в 1-е сутки наблюдения с общим средним значением ( $x_{cp} - x_i$ ) суммировали со средними оценками в группах, если поражения в 1-е сутки были ниже, или вычитали, если поражения были выше среднего значения. Далее из полученных результатов вычитали среднюю оценку реакции на скарификацию в группе неинфицированных животных по суткам [5].

Статистическую обработку результатов для оценки достоверности различий между средними значениями в группах животных проводили с использова-

нием общепринятых методов вариационной статистики (t-критерий).

### Результаты и обсуждение

Исследовали противовирусные свойства лупеола, бетулина, бетулиновой и бетулоновой кислот.

В таблице приведены итоговые данные вычисления количественных показателей противовирусного действия нативных тритерпеноидов. Следует учитывать, что снижение титра вируса на 50% (имеющее место в присутствии  $EC_{50}$  веществ) соответствует  $\sim 0,3$  lg снижению титра вируса.  $EC_{50}$  является основным показателем любого фармакологического эффекта, в том числе и противовирусного действия, как наиболее точно вычисляемая величина. Значение  $EC_{50}$ , выраженное в единицах микромолей вещества и менее (микромолярные концентрации), в сочетании с низкой токсичностью косвенно свидетельствует о хорошо выраженном фармакологическом эффекте и возможном специфическом звене воздействия на патологический процесс. Однако, учитывая специфику вирусологических исследований, оценка степени противовирусного действия только на основании значения  $EC_{50}$  может быть недостаточной.

Вычисление величины более интенсивного снижения титра вируса, в частности на 1,25 lg, подвержено большей погрешности по сравнению с  $EC_{50}$ , однако оно необходимо для демонстрации наличия статистически значимого противовирусного действия вещества. Наличие снижения титра вируса на 1,25 lg и

### Противовирусные свойства нативных тритерпеноидов

Вещество (препарат)	Вирус герпеса		Вирус гриппа		Вирус ЕСНО	
	$EC_{50}$ ( $I_{95}$ ) $EC_{95}$ ( $I_{95}$ ), $\mu M$	МПК/ $EC_{50}$ МПК/ $EC_{95}$	$EC_{50}$ ( $I_{95}$ ) $EC_{95}$ ( $I_{95}$ ), $\mu M$	МПК/ $EC_{50}$ МПК/ $EC_{95}$	$EC_{50}$ ( $I_{95}$ ) $EC_{95}$ ( $I_{95}$ ), $\mu M$	МПК/ $EC_{50}$ МПК/ $EC_{95}$
Лупеол	473,0 [700,6÷319,3]	2,0	>234,4	<1	13,52 [83,01÷2,20]	8,7
	1121,4 [1661,0÷757,0]	0,8			168,1 [1032,9÷27,4]	0,7
Бетулин	1,3 [3,4÷0,5]	172,7	489,1 [14716÷16,2]	0,9	1,27 [4,64÷0,34]	357,1
	36,5 [93,9÷14,2]	6,2	1,1×10 <sup>5</sup>	0	639,8 [142335,5÷2,9]	0,7
Бетулиновая кислота	5,1 [6,3÷4,1]=	85,8	>219,0	<1	0,007 [0,07÷0,002]	4166,7
	14,1 [17,5÷11,3]	31,1			388,0 [1187÷127]	0,07
Бетулоновая кислота	0,09 [0,9÷0,009]	1222,2	5,4 [14,7÷2,0]	20,4	0,386 [0,56÷2,46]	56,8
	2,0 [19,8÷0,2]	55,0	541,2 [1474÷199]	0,2	146,0 [218,8÷97,4]	0,15
Ацикловир	0,014 [0,017÷0,012]	57 142,9				
	0,10 [0,13÷0,09]	8000	Н. и.	Н. и.	Н. и.	Н. и.

Примечание.  $I_{95}$  — доверительный интервал.

более, а также диапазон концентраций вещества, обеспечивающих такое антивирусное действие, можно видеть из значений  $EC_{95}$  и  $MPK/EC_{95}$  соответственно.

Установлено, что нативные тритерпеноиды обладают наиболее высокой ингибирующей активностью в отношении вируса герпеса, в частности бетулиновая и бетулоновая кислоты с отношениями  $MPK/EC_{95}$  31,1 и 55,0 соответственно. Бетулин, несмотря на высокую величину отношения  $MPK/EC_{50}$ , характеризуется достаточно скромным интервалом нетоксичных концентраций с 95% противовирусным эффектом. Ацикловир, как по величине среднеэффективной концентрации, так и по диапазону нетоксичных и 95% эффективных концентраций преобладает в сравнении со всеми исследованными тритерпеноидами.

По результатам, полученным в экспериментах с вирусом гриппа, точные значения  $EC_{50}$  и  $EC_{95}$  могли быть вычислены только для бетулоновой кислоты и бетулина. Однако значения отношения  $MPK/EC_{95}$  этих веществ были значительно менее 1, что не позволяет считать их активными.

Выраженное снижение титра вируса ЕСНО 6 (1,93 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл) зарегистрировано в присутствии бетулоновой кислоты в МПК (21,9 мкмоль). Однако бетулоновая кислота имеет низкое значение отношения  $MPK/EC_{50}$  (56,8;  $EC_{50} = 0,39$  мкмоль). Значительно более широкий диапазон активных концентраций имеют бетулин и бетулиновая кислота, но максимальное снижение титра вируса в их присутствии не достигает 1 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл или находится на этом уровне.  $EC_{50}$  бетулина составляет 1,27 мкмоль, отношение  $MPK/EC_{50}$  — 357. Для бетулиновой кислоты характерно очень низкое вычисленное значение  $EC_{50}$  (0,007 мкмоль) и высокое, более 4000, отношение  $MPK/EC_{50}$ . Вместе с тем, несмотря даже на эти показатели, зарегистрированная противовирусная активность нативных тритерпеноидов в отношении вирусов гриппа и ЕСНО 6 является следовой, и данная группа соединений не может быть признана эффективными ингибиторами размножения вирусов гриппа и ЕСНО 6.

Кроме вирусингибирующего действия бетулиновая кислота обладала существенной вирулицидной активностью в отношении вируса герпеса, которая возрастала с увеличением концентрации соединения в диапазоне нетоксичных концентраций от 13,7 до 437,9 мкмоль (снижение титра вируса за 60 мин от 0,88 до 2,93 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл) и была еще выше при дальнейшем увеличении концентрации ( $EC_{50} = 8,5 \cdot (10,5 \div 7,0)$  мкмоль,  $EC_{90} = 30,4 \cdot (37,7 \div 24,5)$  мкмоль).

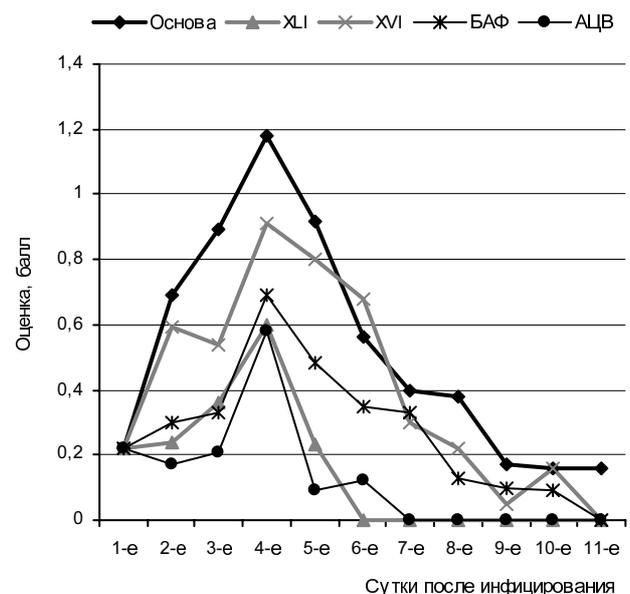
Исследование эффективности соединений тритерпенового ряда при экспериментальном кожном герпесе у лабораторных животных является логическим продолжением изучения противовирусных свойств этих веществ на культуре клеток. Выбор соединений для исследований обусловлен прежде всего наличием ингибирующей активности в отношении репродукции вируса герпеса, а также необходимого количества вещества. Из этих соображений изучили бетулин и бетулиновую кислоту. Опытные образцы мазей

для исследования подготовили с помощью растирания в ступках этих веществ и мазевой основы производства РУП «Белмедпрепараты», состав которой одинаков для всех мазевых противовирусных препаратов, изученных при выполнении настоящего исследования. Количественные соотношения навесок соединений и мазевой основы подбирали с расчетом получения 2,5% мазей, ориентируясь на процентное содержание ацикловира в мазевом препарате сравнения.

Инфекция в группе животных, леченных мазевой основой, характеризовалась увеличением выраженности регистрируемых признаков на 2—4-е сутки после инфицирования и постепенным ее снижением в последующие сутки (рисунок). У животных, получающих мази бетулина и бетулиновой кислоты, зарегистрировано статистически достоверное снижение выраженности признаков инфекции ( $P < 0,05$ ) на пике ее развития, а также на спаде, по 7-е сутки после инфицирования включительно, составляющее от 0,4 до 1 балла и более. Снижение проявлений экспериментальной герпетической инфекции было более выражено в группе животных, лечение которых проводили мазью бетулина, превосходило эффективность мази бутаминофена и приближалось к эффективности мази ацикловира.

Таким образом, выявлена более высокая эффективность мази бетулина по сравнению с мазью бетулиновой кислоты при экспериментальном кожном герпесе у лабораторных животных, в то время как противовирусная активность бетулиновой кислоты по сравнению с бетулином на культуре клеток была сравнимой или даже более высокой.

Данное явление объясняется тем, что общепринятая оценка степени выраженности противовирусных



Эффективность исследованных веществ при кожном герпесе белых мышей: БАФ — 1% мазь бутаминофена; XLI — 2,5% мазь бетулина, XVI — бетулиновая кислота; АЦВ — ацикловир; БАФ и АЦВ — референс-препараты

свойств основана на широте диапазона нетоксичных концентраций вещества с противовирусным действием, в большей степени характеризующей безопасность его применения в качестве возможного лекарственного средства, в то время как максимальное достигаемое снижение титра вируса может быть одинаковым или даже более высоким у соединения с менее широким диапазоном активных концентраций [6].

Кроме того, мази для исследования были приготовлены с одинаковым процентным содержанием действующих начал, без учета их местно-раздражающего действия и внутридермального транспорта, которые неизвестны. Литературные же данные свидетельствуют, что эффективность противогерпетических препаратов при местном применении в более значительной степени определяется способностью их проникновения в кожу, нежели выраженностью противовирусных свойств субстанции препарата [7, 8].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Soler F., Poujade C., Evers M., et al. // *Med. Chem.*— 1996.— Vol. 39, № 5.— P. 1069—1083.
2. Boreko E. I., Pavlova N. I., Savinova O. V., et al. // *N. Biomed. Sci.* (Весці НАН Беларусі. Сер. мед.-биол. навук).— 2002.— № 3.— P. 86—90.
3. Бореко Е. И., Павлова Н. И., Зайцева Г. В. и др. // *Вопр. вирусологии.*— 2001.— № 5.— С. 40—42.
4. Boyd M. R., Bacon T. N., Sutton D. // *Antimicrob. Ag. Chemother.*— 1988.— Vol. 32, № 1.— P. 358—363.
5. Бореко Е. И., Савинова О. В., Павлова Н. И. и др. // *Соврем. пробл. инф. патологии человека (эпидемиол., клиника, вирусол., микробиол. и иммунол.): Материалы НИИ эпидемиол. и микробиол. по итогам выполнен. ГНТП «Инфекции и мед. биотехнол.» 2001—2005 гг.*— Минск, 2005.— С. 417—424.

6. Вотяков В. И., Бореко Е. И., Владыко Г. В. и др. *Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений: Методич. рекомендации.*— Минск, 1986.

7. Spruance S. L., Freeman D. J., Sheth N. V. // *Antimicrob. Ag. Chemother.*— 1985.— Vol. 28, № 1.— P. 103—106.

8. Spruance S. L., McKeough M. B., Cardinal J. R. // *Antimicrob. Ag. Chemother.*— 1984.— Vol. 25, № 1.— P. 10—15.

Поступила 08.07.14.

### COMPARATIVE ANTIVIRAL ACTIVITY OF NATIVE TRITERPENOIDS

E. I. Boreko, N. I. Pavlova, O. V. Savinova

**Objective.** Studying of antiviral activity of native triterpenic compounds in the experiment using cell culture and laboratory animals was the purpose of the work.

**Materials and methods.** Lupeol, betulin, and betulinic acid were synthesized at the Institute of Organic Chemistry of the RAS Ufa Scientific Center. The antiviral characteristics were determined in the experiment using cell cultures containing simple herpes virus type 1, viruses of grippe A/FPV/Rostock/34 (H7N1) and ECHO 6. For performing experiments on animals white outbreed mice, experimental betulin and betulinic acid ointments were used acyclovir and butaminofen being reference preparations.

**Results.** The studied substances, betulin, betulonic, and betulinic acids particularly, were found to cause a higher inhibiting effect in relation to the herpes virus. Those compounds were either inactive or subactive in relation to viruses of grippe A (H7N1) and ECHO 6. The experiments on laboratory animals (white mice with dermal herpes) demonstrated the highest efficiency of betulin ointment.

**Conclusion.** The data obtained evidence that native triterpenic compounds could be successfully used for development of antiviral medicinal products.

**Key words:** lupeol, betulin, betulinic acid, betulonic acid, antiviral properties, experimental dermal herpes.

### Адрес для корреспонденции:

Бореко Евгений Иванович.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.

220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 267-32-67.

Н. П. ШМЕЛЕВА, Н. В. СИВЕЦ, Н. В. ГРИБКОВА,  
Т. П. ЛАПО, Е. В. ЧЕШЕНОК, О. Н. АНОШКО

## ЭТИОЛОГИЧЕСКИЙ СПЕКТР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОРВИ У ДЕТЕЙ БЕЛАРУСИ В 2010—2014 гг.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава Республики Беларусь

**Цель исследования.** Проведение вирусологического мониторинга возбудителей ОРВИ у детского населения Республики Беларусь с использованием методов молекулярной диагностики.

**Материал и методы.** Выявление нуклеиновых кислот респираторных вирусов проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Статистическая обработка результатов исследования выполнена на персональном компьютере с использованием коммерческого пакета программы STATISTICA 6.0. Сравнение частоты появления качественных признаков проводили с помощью критерия  $\chi^2$ .

**Результаты.** Изучение этиологического спектра возбудителей респираторных заболеваний у детей в возрасте от 0 до 17 лет методом ПЦР позволило установить, что респираторные вирусы являются причиной заболевания детей более чем в 60% случаев. Установлено преобладание в этиологической структуре ОРВИ среди детского населения риновирусов, респираторно-синцитиального и вирусов гриппа, определен спектр респираторных вирусов, способных вызывать у детей тяжелое течение заболевания.

**Заключение.** Проведенные исследования подчеркивают важную роль вирусных патогенов в формировании респираторной патологии у детей и указывают на преобладание в структуре возбудителей ОРВИ негриппозных вирусов.

**Ключевые слова:** острая респираторная вирусная инфекция, вирус гриппа, РС-вирус, полимеразная цепная реакция.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают 1-е место в структуре общей инфекционной заболеваемости, являясь главной причиной временной нетрудоспособности, и приводят к значительным экономическим потерям. У детей респираторные инфекции составляют до 90% от всей инфекционной патологии и являются одной из наиболее распространенных причин посещения педиатра и госпитализации [1]. В современных условиях наиболее распространенными респираторными заболеваниями являются хронический тонзиллит, трахеит, бронхит. Чаще всего они встречаются в детском возрасте, однако все более актуальной является ситуация, когда часто болеющий ребенок, становясь взрослым, страдает хроническими заболеваниями респираторного тракта [2].

ОРВИ характеризуются большим разнообразием возбудителей, вызывающих заболевания со схожими клиническими симптомами, которые имеют общий воздушно-капельный механизм передачи возбудителя и развиваются в основном в дыхательных путях. Известно более 200 возбудителей ОРВИ у человека, которые относятся к 6 таксономическим семействам: *Orthomyxoviridae* (вирус гриппа), *Paramyxoviridae* (вирус парагриппа, метапневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус), *Adenoviridae* (аденовирус), *Parvoviridae*

(бокавирус), *Picornaviridae* (энтеровирус, риновирус), *Coronaviridae* (коронавирусы 229E, HKU1, NL63, OC43, возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома ТОРС, возбудитель ближневосточного респираторного синдрома MERS-CoV).

Золотым стандартом диагностики ОРВИ являются выделение вируса в культуре клеток и реакция нейтрализации типоспецифическими сыворотками. Однако ввиду высокой трудоемкости и продолжительности исследования применение данных методов для диагностики ОРВИ ограничено. В настоящее время для выявления и идентификации респираторных вирусов используют молекулярно-генетические методы, основанные на уникальности нуклеотидных последовательностей вирусных геномов. В последние годы значительно расширился спектр возбудителей ОРВИ, при использовании новых технологий у больных острыми респираторными заболеваниями обнаружены несколько новых вирусов. Так, в 2001 г. в Голландии впервые обнаружен метапневмовирус [3], в 2003 г. в Китае — коронавирус — возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС или SARS) [4], в 2005 г. в Швеции — бокавирус человека [5]. В 2012 г. появились сообщения о новом коронавирусе, способном вызывать тяжелые респираторные заболевания с почечным синдромом, — возбудителе ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [6].

Ввиду большой социальной значимости заболеваемости ОРВИ у детей представляет интерес расшифровка этиологического спектра возбудителей, поскольку ранняя этиологическая диагностика ОРВИ способствует проведению рациональной этиотропной терапии, предотвращению внутрибольничного заражения и сокращению сроков госпитализации.

Целью настоящего исследования явился вирусологический мониторинг возбудителей ОРВИ у детей республики с использованием методов молекулярной диагностики.

### Материал и методы

Использовали назофарингеальные мазки, полученные у детей с симптомами ОРВИ в рамках дозорного эпидемиологического надзора за гриппом и ОРВИ в сезоны 2010—2011, 2011—2012, 2012—2013 и 2013—2014 гг.

Для выявления и дифференциации нуклеиновых кислот вирусов гриппа А и В, респираторно-синцитиального вируса (РСВ), метапневмовируса (МПВ), вируса парагриппа типа 1—4 (ПГ), коронавирусов 229E, OC43, HKU1, NL63 (КоВ), риновирусов, бокавируса (БоВ) и аденовируса (АД) образцы исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени. Использовали диагностические наборы «Амплиценс» (ФБУ НЦНИИ эпидемиологии, Роспотребнадзор, РФ). Детекцию продуктов амплификации проводили на приборе «Rotor Gene 6000» («Corbet Research», Австралия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистическая обработка результатов исследования выполнена на персональном компьютере с использова-

**70 Проблемы эпидемиологии, микробиологии и инфекционных болезней**

нием коммерческого пакета программы STATISTICA 6.0. Сравнение частоты появления качественных признаков основывалось на сравнении эмпирических распределений с помощью критерия  $\chi^2$ . Различия считали достоверными при  $P < 0,05$ , высоко достоверными — при  $P < 0,001$ , недостоверными — при  $P > 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

За период с сентября 2010 г. по апрель 2014 г. исследовано 2090 клинических образцов, полученных у детей с симптомами ОРВИ. Возраст обследованных детей колебался от 0 до 17 лет. Генетический материал респираторных вирусов выявлен в 1293 (61,9%) образцах. Частота выявления респираторных вирусов в назофарингеальных мазках у детей различных возрастных групп представлена в табл. 1. Как видно, наиболее часто возбудителей ОРВИ выявляли у детей первых 3 лет жизни (64,7% и 70,3% в возрастных группах 0—1 и 1—3 года соответственно). Этиологическая структура возбудителей ОРВИ представлена на рис. 1.

Показано, что у детей за анализируемый период преобладали риновирусы, РСВ и вирусы гриппа, удельный вес которых составил 15%, 14% и 13% соответственно ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ). Среди других возбудителей ОРВИ в 10% положительных образцов выявлен вирус ПГ, в 9% — БоВ, в 8% — АД, МПВ и КоВ — в 4% и 3% случаев соответственно, в 24% — 2 (реже 3) вируса одновременно.

В зависимости от эпидемического сезона этиологический спектр ОРВИ у детей несколько изменялся

(рис. 2). Так, риновирусы активно циркулировали на протяжении всех 4 сезонов. Среди других вирусов основными возбудителями ОРВИ в сезон 2010—2011 гг. были вирусы гриппа и ПГ (15,1% и 20,5% соответственно,  $P < 0,01$ , критерий  $\chi^2$ ), причем среди вирусов гриппа наблюдалась ко-циркуляция вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и В. Среди вирусов ПГ 70,7% находок были связаны с вирусом ПГ 2-го типа, пик активности циркуляции которого, по-видимому, пришелся на сезон 2010—2011 гг. В 2011—2012 гг. среди положительных находок преобладали БоВ и РСВ (16,6% и 16,0% соответственно,  $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ). В сезон 2012—2013 гг. наибольший вклад в формирование респираторной патологии у детей внесли вирусы гриппа (29%,  $P < 0,01$ , критерий  $\chi^2$ ), что может быть обусловлено длительностью эпидемии гриппа в данный сезон, когда на протяжении 12 нед, сменяя друг друга, циркулировали вирусы гриппа А(H1N1)pdm09, А(H3N2) и вирусы гриппа В. Сезон 2013—2014 гг. отличался преобладанием РСВ (20,9%,  $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ).

Таким образом, на основании изучения этиологического спектра ОРВИ у детей можно судить о снижении в последние годы доли вирусов гриппа и преобладании негриппозных вирусов, таких как РСВ, БоВ, риновирусы и вирусы ПГ.

Установлено, что спектр выявленных вирусных антигенов варьировал в различных возрастных группах (табл. 2). Например, у детей первого года жизни преобладали РСВ и риновирусы (21,2% и 16,0% соответственно,  $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ), заболевания, вызываемые вирусами гриппа, чаще встречались у детей старше 7 лет (33,9%). Инфекции, обусловленные РСВ и БоВ, регистрировали в большинстве случаев у детей до 7 лет, в старшей возрастной группе они встреча-

Таблица 1

**Частота выявления (%) респираторных вирусов в назофарингеальных мазках у детей разного возраста**

Возраст, лет	Численность группы, n	Положительные образцы	
		абс.	%
0—1	453	293	64,7
1—2	752	529	70,3
3—7	528	297	56,3
8—17	357	174	48,7
Всего...	2090	1293	61,9

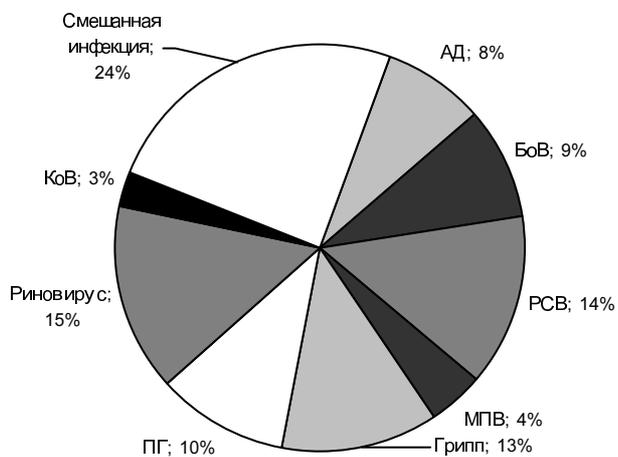


Рис. 1. Структура возбудителей ОРВИ у детей

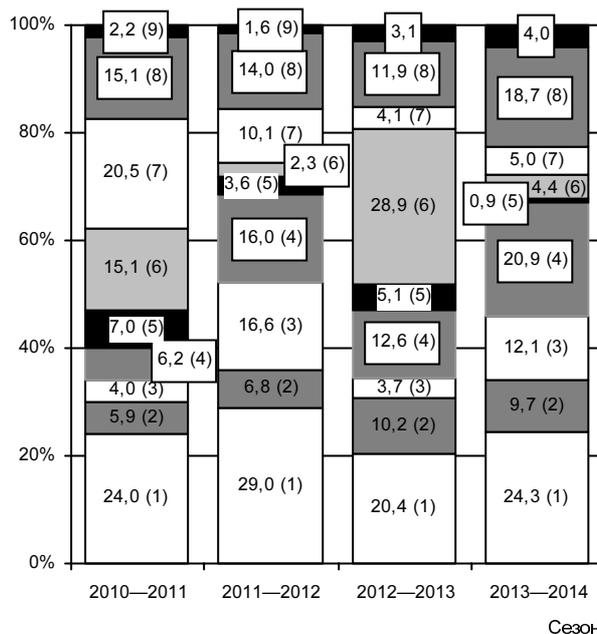


Рис. 2. Структура возбудителей ОРВИ, выявленных у детей в 2010—2014 гг. (данные ПЦР): 1 — смешанная инфекция, 2 — АД, 3 — БоВ, 4 — РС, 5 — МПВ, 6 — грипп, 7 — ПГ, 8 — риновирус, 9 — КоВ

Таблица 2

## Структура ОРВИ у детей разного возраста

Возраст, лет	Удельный вес возбудителя, %								
	грипп	ПГ	РСВ	АД	рино-вирус	МПВ	БоВ	КоВ	смешанная инфекция
0—1	8,2	9,6	21,2*	5,8	16,0	2,4	4,8*	1,7	23,2
1—2	6,2	11,7	12,7	5,7	14,6	4,3	8,7*	2,1	27,8
3—7	15,5	5,1	14,8	5,1	15,8	6,1	5,4*	1,3	15,2
8—17	33,9**	8,0	1,7	6,3	13,2	2,9	0,6	1,1	2,9

\*Достоверность различий показателей по сравнению с таковыми у детей разного возраста ( $P < 0,01$ ).

\*\*Достоверность различий показателей по сравнению с таковыми у детей одного возраста ( $P < 0,01$ ).

лись лишь в единичных случаях. У детей старшего возраста практически отсутствовали случаи одновременного инфицирования несколькими вирусами (2,9%,  $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ).

Согласно действующим в стране нормативным документам, регламентирующим эпидемиологический надзор за гриппом и ОРВИ, респираторные инфекции подразделяются на острые респираторные инфекции, гриппоподобные заболевания и тяжелые острые респираторные инфекции (ТОРИ) [5]. К категории ТОРИ относятся «заболевания, характеризующиеся сочетанием трех симптомов (температура тела более 38°C; кашель или боль в горле; одышка или затрудненное дыхание), начавшиеся и протекающие в течение предыдущих 7 сут, приводящие к госпитализации [7]. Анализ тяжести клинических проявлений ОРВИ у детей показал, что из 1293 подтвержденных респираторных заболеваний вирусной этиологии в 293 (22,7%) случаях наблюдали тяжелое клиническое течение. В большинстве случаев в направлении на исследование был выставлен клинический диагноз «пневмония». Наибольший вклад в формирование тяжелого течения заболевания у детей оказывали РСВ и риновирусы, удельный вес которых составлял 18% и 15% соответственно ( $P < 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ). Далее по степени значимости располагались вирусы гриппа и БоВ, вклад каждого в структуру возбудителей ТОРИ составил по 12% (рис. 3).

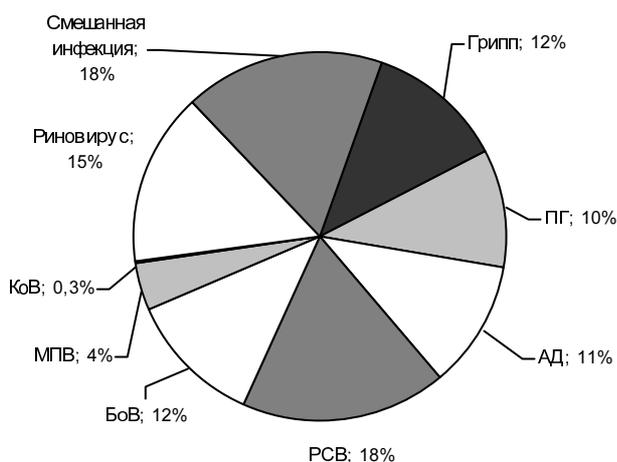


Рис. 3. Этиологический спектр возбудителей ТОРИ, выявленных у детей в 2010—2014 гг.

Таким образом, проведенные исследования по изучению этиологического спектра респираторных заболеваний у детей в возрасте от 0 до 18 лет методом ПЦР позволили установить, что респираторные

вирусы являются причиной заболевания более чем в 60% случаев. Наибольший вклад в структуру возбудителей ОРВИ среди детского населения внесли риновирусы, РСВ и вирусы гриппа. Кроме того, определен спектр респираторных вирусов, способных вызывать у детей тяжелое течение заболевания. Представленные результаты свидетельствуют об актуальности проводимого вирусологического мониторинга возбудителей ОРВИ у детей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Paulo M. C. Pitrez, Jose L. B. // *J. Pediatr. (Rio J.)*.— 2003.— Vol. 79, Suppl. 1.— P. 77—86.
2. Хорошилова Н. В. // *Детские инфекции*.— 2009.— № 4.— С. 22—26.
3. Van den Hoogen B. G., De Jong J. C., Groen J., et al. // *Nat. Med.*— 2001.— Vol. 7, № 6.— P. 719—724.
4. Peiris J., Yuen K., Osterhaus A., Stohr K. // *N. Engl. J. Med.*— 2003.— Vol. 349, № 25.— P. 2431—2441.
5. Allander T., Tammi M., Eriksson M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*— 2005.— Vol. 102, № 36.— P. 12891—12896.
6. Bermingham1 A., Chand M. A., Brown C. S., et al. // *Eurosurveillance*.— 2013.— № 6.— P. 3—8.
7. Санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы «Требования к проведению эпидемиологического надзора за острыми респираторными инфекциями в Республике Беларусь» от 12 октября 2010 г. № 132.

Поступила 08.07.14.

## ETIOLOGICAL SPECTRUM OF BELARUS CHILDISH AURI CAUSATIVE AGENTS IN 2010—2014

N. P. Shmeleva, N. V. Sivets, N. V. Gribkova, T. P. Lapo, E. V. Tcheshenok, O. N. Anoshko

**Objective.** Virusological monitoring of Belarus childish AURI causative agents using methods of molecular diagnosis was the purpose of the work.

**Materials and methods.** Respiratory virus nucleic acids were detected by the polymerase chain reaction in the real time mode. The study results were processed statistically on a personal computer using commercial software STATISTICA 6.0. The qualitative characters frequencies were compared using the  $\chi^2$  test.

**Results.** Studying of the childish respiratory diseases causative agents in children aged 0 to 17 years using the PCR method allowed determine that respiratory viruses caused childish diseases in more than 60% of cases. Rhinoviruses, respiratory cyncytial viruses, and influenza viruses were found to dominate in the AURI etiological structure, the spectrum of the respiratory viruses capable of causing the disease severe course was determined.

**Conclusion.** The studies carried out stress the viral pathogens important role for childish respiratory pathology development and show that non-influenza causing viruses dominate in the AURI etiological structure.

**Key words:** acute respiratory viral infection, influenza virus, RC-virus, polymerase chain reaction.

## Адрес для корреспонденции:

Шмелева Наталья Петровна  
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии.  
220114, г. Минск, ул. Филимонова, 23; сл. тел. (8-017) 237-62-95.



В. А. КОНДУРЦЕВ

## ИСКУССТВО КЛИНИЧЕСКОГО ОБХОДА: РАСПРОСТРАНЕННЫЕ НЕДОЧЕТЫ В ВЕДЕНИИ БОЛЬНЫХ И МЕДИЦИНСКОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ

Самарский государственный медицинский университет

Дотошный эскулап (по части знаний),  
Но как ведет историю болезни!!!  
Гроссбух, а не история! При этом  
С больными говорит, как с манекеном:  
Слова — эрзацы. Голос деревянный,  
Глаза — как Ледовитый океан.  
Анализы, анализы ... А всуе  
Он копошится в них и назначает  
Все новые... И нет тут одного лишь  
Анализа ... А н а л и з а д у ш и.

Л. Попов

Современному педагогу-клиницисту, выступающему часто в роли руководителя обхода, необходимо знать (или помнить) наиболее распространенные недочеты в клиническом ведении больных и оформлении медицинской документации, которые допускают врачи и студенты. Конечно, в различные годы, периоды развития клиники внутренних болезней требования как к знаниям, умениям и навыкам, так и к тактике обследования, оформления медицинской документации, диагностике, лечению меняются.

Однако есть некоторые общие недостатки, которые почти наверняка можно найти в работе молодых врачей-терапевтов и студентов. Их без особого труда обнаруживает опытный педагог высшего медицинского учебного заведения. Назову некоторые из них ...

Но перед этим напомним читателям тот фрагмент наставления замечательного врача и педагога-клинициста Матвея Яковлевича Мудрова, который вот уже много лет служит нам верой и правдой в воспитании молодых врачей. Конечно, иногда современные преподаватели (терапевты, хирурги и др.) говорят своим ученикам, как надо обследовать больных, на что надо обращать внимание в первую, вторую и третью очередь, как надо оформлять соответствующую документацию, но как подробно и своеобразно, педантично и скрупулезно это делал наш замечательный предшественник, мы вряд ли говорим.

Итак: «Чтобы узнать болезнь подробно, нужно врачу допросить больного: когда болезнь его посетила в первый раз; в каких частях тела показала первые ему утеснения; вдруг ли напала, как сильный неприятель, или приходила, яко тать в ночи? Где первое показала свое насилие: в крови ли, в пасоке, в чувственных жилах, в орудиях пищеварения или в оболочках, одевающих тело снаружи или внутри, и проч.? Какие с того времени ежедневно происходили перемены и какие употреблены врачевания, с пользой или со вредом?

Наконец, должно исследовать настоящее положение болезни в больном: искать, где она избрала себе ложе; и для сего нужно врачу пробежать все части тела больного, с головы до ног, а именно: первее всего надобно уловить наружный вид больного и положение его тела, а потом исследовать действия душевные, зависящие от мозга: состояние ума, тоску, сон; взглядеться в лицо его, глаза, лоб, щеки, рот и нос, на коих часто, как на картине, печатлеется и живописуется образ болезни.

Надобно смотреть и осязать язык, как вывеску желудка; спросить о позыве к пище и питию и к каким именно; внимать звуку голоса и силе ответов; видеть и слышать дыхание груди его и вычислить соразмерность биения сердца с дыханием; применить к разному звуку кашля грудного, желудочного, простудного, воспалительного, надобно уметь осязать живот, все его внутренности и сопредельные ему части; исследовать состояние рук и ног, их силу и крепость, худобу и полноту и по оным судить о силах жизненных; обратить внимание на кожу: сухость ее и влажность, теплоту и холод, цвет и сыпи; видеть и исследовать все извержения, кровь, мокроты, желчь и проч. Из всех явлений, коих сотую долю показал я здесь и кои ты увидишь, услышишь и осяжешь при постели больного, из всех сил явлений, говорю я, должен ты помощью разума извлечь заключения о вещах сокровенных, коих наружные чувства не постигают; постигнет же чувство внутреннее, т. е. разум, просвещенный наукою и опытностью».

Замечательное наставление! Я особо хочу обратить внимание на то, что М. Я. Мудров советует врачу, собирающему анамнез, «внимать звуку голоса и силе ответов ... » Если в искусство диагностики входит умение слушать голос, то владение собственным голосом также необходимо для врачевания. И в ходе беседы с больным врачу надо следить за тоном, скоростью, высотой своего голоса. Известно, что голосом можно лечить по телефону. Если же у врача неприятный голос, то ему никогда не стать не только психотерапевтом, но и врачом вообще!

За последние 30 лет клиническая медицина ознаменовалась небывалым прогрессом в связи с внедрением в нее чрезвычайно информативных методов лабораторного, инструментального исследования организма человека. Одновременно в этот период во всех странах получило развитие явление, которое вряд ли можно назвать положительным. Оно характеризуется тем, что анамнез и непосредственное клиническое обследование больных врачи все больше стали заменять именно этими исследованиями. Эта теневая сторона прогресса уже много лет волнует отечественных и иностранных врачей, ученых, клиницистов (А. Я. Билибин, Е. И. Чазов, И. А. Кассирский, В. Х. Василенко, В. А. Германов, Ю. Хегглин, Е. Браунвальд и др.).

Спорные преимущества такой тенденции в работе практических врачей, а также расширение и угрожаю-

ший рост медицинских технологий в системе клинического обследования были темой дискуссий на многих научно-практических конференциях, съездах, конгрессах.

Опыт преподавания терапии в вузе, опыт работы с больными тем не менее позволяют говорить по-прежнему, что и сегодня, в век узкой и сверхузкой специализации, большинство врачей ставят диагноз, назначают комплексное лечение, в том числе определяют показания к хирургическим вмешательствам, руководствуясь результатами своего непосредственного обследования пациентов.

Отмечу, что хорошее знание и владение этими методами обследования помогает врачам и способствует осмысленному применению дополнительных «технических» методов диагностики. В то же время эти знания и умения позволяют избавить больных от «ненужной им нагрузки», сэкономить время и финансовые средства. С этой точки зрения «возврат к истокам врачебного искусства» сбора анамнеза, осмотра, пальпации, аускультации оказывается чрезвычайно полезным. А руководителю отделения, педагогу-клиницисту, в ходе клинического обхода предоставляется великолепная возможность продемонстрировать это искусство во всей его красе.

Вот почему в соответствующих местах этой работы я специально привожу некоторые сведения, которые могут оказать существенную пользу в постановке современного медицинского, социального и психологического диагноза.

А что же мы получаем, когда сами в процессе обхода просматриваем медицинскую документацию, истории болезни и обследуем современных больных?

При расспросе пациентов врачи обычно по шаблону фиксируют в истории болезни, что поступившие к ним больные «у себя и родственников отрицают туберкулез, сифилис, психические заболевания». Не говоря о том, что число указанных заболеваний растет и у родственников, и у самих больных, в настоящее время надо бы более основательно и дотошно выявлять у родственников сосудистые, сердечные, обменно-дистрофические болезни, холодовую, лекарственную и другие формы аллергии и иммунопатологии.

Более точно надо описывать в истории болезни бытовые условия, месячный бюджет-доход семьи, состав последней, моральный климат в семье, состояние взаимоотношений в ней. Значение этих сведений в установлении отношений врача и больных, их родственников чрезвычайно велико. Студенты и врачи в историях болезни часто пишут, что «материально-бытовые условия удовлетворительные». Я считаю, что эта фраза для врача практически ничего для понимания больного и его жизни не дает. Ведь совершенно ясно, что для одного человека считаются удовлетворительными условия жизни, когда он располагается с семьей из 5 человек в однокомнатной квартире «со всеми удобствами на дворе», имеет бюджет семьи в 4000 рублей. Для другого человека «удовлетворительными материально-бытовыми условиями»

считается коттедж в два этажа, 500 кв. м на двух членов семьи при месячном доходе в 13 млн рублей.

Я никогда не заканчиваю расспроса-беседы с больным без того, чтобы выяснить хотя бы ориентировочно состояние взаимоотношений в семье. Ведь для этого достаточно задать вопрос: «У вас дружная семья?» и посмотреть в глаза, на лицо, кожу больного. Они красноречивее всех слов дадут ответ на поставленный вопрос.

Достаточно часто врачи и студенты пренебрегают методами пальпации, перкуссии. При обходах часто можно встретить больных, которых ординатор, студент не научили «дышать животом». Это почти всегда свидетельствует о том, что врач, студент сам не владеет пальпацией или не использует метод пальпации живота.

Некоторые больные, да и врачи, студенты крайне удивляются, когда руководитель обхода начинает выслушивать и органы брюшной полости, измерять артериальное давление на ногах. Практически всегда можно убедиться в том, что врачи и студенты не выслушивают почечные артерии, не прощупывают и не выслушивают сонные, бедренные артерии, артерии нижних конечностей, брюшную аорту.

По реакции больных на попытки осуществить эти исследования руководителем обхода можно практически так же безошибочно судить о профессиональной компетентности врача, студента, работающего в данной палате.

Как правило, не описывается характеристика влажных хрипов (калибр, число, локализация, звучность), чему обучаются студенты еще на третьем курсе. Молодые врачи, студенты недостаточно точно улавливают характер тонов сердца, пресистолический, протодиастолический шум, ошибаются в дифференцировании раздвоения второго тона, наличия третьего тона, не понимают значения саккадированного дыхания.

Как правило, допускается известный шаблон в аускультации сердца. В частности, в историях болезни лишь фиксируется факт наличия систолического шума, например, в области верхушки сердца, но не описывается вся палитра аускультативных симптомов со стороны сердца, точно не фиксируется максимум и минимум интенсивности того или иного шума в различных точках и зонах грудной клетки. Кстати, судить в целом о компетенции лечащего врача, студента можно с успехом именно по умению выслушивать сердце. Этот прием я считаю обязательным элементом искусства врачевания. Ведь отличная школа врача, по мнению многих опытных преподавателей медицинских вузов, сказывается в тонком мастерстве, глубококом понимании результатов аускультации сердца!

Практически никогда лечащие врачи, студенты не выслушивают мелодию сердца со стороны спины, под левой лопаткой, где нередко отчетливо выслушивается хлопающий первый тон при митральном стенозе.

Во время обхода выясняется обычно, что врачи и студенты не используют симптом пульсации гиперемированного (натертого) участка кожи лба наряду с

наблюдением за «капиллярным пульсом» ногтевого ложа, мягкого неба. Обычно не обращают внимания на набухание шейных вен при пороках сердца, наполнение шейных вен при гепатюгулярном рефлюксе (симптом Плеша).

Часто создается впечатление, что врачами и студентами напрочь забыт симптом Сиротинина-Куковерова, не всегда правильно определяется дефицит пульса при мерцательной аритмии, и он не фиксируется в «дневниках» истории болезни.

Практически всегда можно обнаружить дефект в методике измерения артериального давления, в частности, фонендоскоп ставится в область локтевого сгиба ориентировочно, до этого пальпация соответствующей артерии не проводится. Как правило, не осматривается тщательно слизистая оболочка языка, щек, губ. А эти сведения как раз очень важны для диагностики все увеличивающихся случаев синдрома гиповитаминоза (полигиповитаминоза), хронической недостаточности надпочечников, профессиональных интоксикаций.

С незапамятных времен врачи стремились определить состояние внутренних органов, состояние всего организма по внешним признакам. За тысячелетия практической работы врачи различных стран доказали, что диагностику многих заболеваний можно проводить по исследованию пульса на лучевой артерии, состоянию лица, губ, ладоней, ногтей, глаз, кожи, ушей, зубов и, конечно, языка.

Мы привыкли к знанию того, что состояние языка прежде всего свидетельствует о функциональном состоянии желудочно-кишечного тракта и системы крови. Однако в настоящее время уже известно, что по этому органу можно судить и о состоянии других внутренних органов, но при этом надо принимать во внимание размеры языка, его очертания, структуру поверхности, края, цвет и влажность (Г. Банченко и соавт., 2003).

Так, поверхность языка может свидетельствовать о нарушении пищеварения, сердечной деятельности, эндокринной и нервной систем. Наличие складки в середине языка указывает на распространенные нарушения в позвоночнике. При деформации или искривлении позвоночника эта складка также искривлена.

Авторы утверждают, что повышение чувствительности и обесцвечивание отдельных участков языка свидетельствуют о нарушении тех органов, которые «связаны» с этими участками. Сердце и печень связаны с передней третью языка. Желудок, поджелудочная железа и селезенка связаны со средней частью языка. При поражении нижних отделов кишечника изменяется корень языка. Почки и печень связаны с боковыми участками языка.

Локализация налета, покрывающего язык, указывает «на скопление токсинов» в желудке и тонкой кишке (если налет находится в середине языка), в толстой кишке (если налет обнаруживается в его дистальной части).

«Географический язык», при котором наблюдается неравномерное слущивание и регенерация эпите-

лия, появляется при нарушениях в желудочно-кишечном тракте, глистных инвазиях, токсикозах беременности (гестозах), некоторых «диатезах». Воспаление эпителия и сосочков языка (настоящий глоссит) наблюдается обычно при ряде инфекционных заболеваний. Тремор высунутого вперед языка встречается чаще всего при неврозах, тиреотоксикозе.

Цвет налета на языке и цвет самого языка могут помочь в установлении диагноза многих заболеваний. Вот некоторые примеры такой диагностики:

желтый налет — нарушение функции органов пищеварения;

налет темного или черного цвета — тяжелое поражение (чаще хроническое) органов пищеварения, сопровождающееся обезвоживанием и ацидозом;

толстый белый налет — интоксикация, запоры;

толстый белый налет, постепенно становящийся тонким — признак улучшения состояния больного;

коричневый налет — наличие заболеваний легких;

язык без налета, трещин, линий, бледно-розовый — организм здоров или болезнь только начинается; бледный язык — истощение, анемия;

красный язык — нарушение сердечной и легочной систем, заболевание крови, инфекционные заболевания;

темно-красный язык — то же самое, но в угрожающем жизни масштабе;

фиолетовый язык — заболевания крови, легких, опасные стадии болезни;

синий язык — нарушения сердечно-легочной и почечной систем, опасная стадия болезни;

резко синий язык — преагональное состояние;

искривленная линия посередине языка — искривление позвоночника, «выбитость» позвонков;

отпечатки зубов по краям — нарушения пищеварения.

Нам, терапевтам, надо иметь в виду, что на состояние языка влияет и время года, время суток, состав принимаемой пищи, очистительные для организма процедуры, физические воздействия (например, ожоги горячей пищей), состояние гиподинамии, токсико-аллергические реакции, воздействия конструкций зубных протезов и состав материалов, из которых они сделаны.

Сам по себе язык поражается при всех заболеваниях полости рта, вызываемых чаще всего смешанной инфекцией.

Микроглоссия — редкая аномалия, чаще всего является результатом ненормального развития челюстно-лицевой системы.

Макроглоссия — может быть следствием аномалии развития, нарушения формирования лица, черепа, зубов и челюстей на фоне эндокринных заболеваний (акромегалия, гигантизм), болезней пищеварительной системы, отека языка (отек Квинке, ангионевротический отек, гипотиреоз и др.).

Относительная макроглоссия может быть следствием неправильного формирования скелета в случаях кретинизма (язык имеет нормальную величину, а полость рта уменьшена в размерах).

Известный московский профессор-терапевт Г. П. Шульцев считал совершенно недопустимым для

терапевтов «пренебрежение осмотром нижних конечностей, околоанального пространства, наружных гениталий».

В современной литературе описано достаточно много примеров диагностических ошибок вследствие того, что врач-терапевт «постеснялся» провести осмотр указанных областей и не увидел, например, расширение вен семенного канатика, свидетельствующее о наличии у больного далеко зашедшего опухолевого процесса в брюшной полости.

Часто ли я сам лично осматриваю при клинических обходах больных, находящихся в терапевтическом, гематологическом отделении, эти области человеческого тела, о которых пишет профессор Г. Л. Шульцев? Сознаюсь, что в условиях университетской многопрофильной больницы для такого осмотра мы приглашаем проктолога, гинеколога. Но когда меня вызывают на консультацию к «неясным больным» в поликлинику, в стационар, этот совет мудрого терапевта и ученого Г. Л. Шульцева я стараюсь выполнить.

А осмотр нижних конечностей, аускультацию живота, пальпацию периферических артерий, которые можно прощупать своими, как говорится, руками, стараюсь делать всегда. Этому меня научил и опыт работы непосредственно в приемном отделении.

Кто станет отрицать, что обследование каждого конкретного больного по своему объему и направленности изменяется в зависимости от возникающих у врача в ходе диагностического процесса догадок и предположений. При подозрении на поражение почек, при подозрении на острую пневмонию, при подозрении на острый лейкоз, при подозрении на рак желудка, рак сигмовидной кишки главное внимание в обследовании будет уделено (как это оформляется четко в хирургических историях болезни) *status localis*, т. е. соответственно пальпации почек, мочеточников, легких, лимфатических узлов, пальпации желудка или сигмовидной кишки. Но нельзя упускать из виду и осмотреть, ощупать (где надо и можно — прослушать) голову, шею, грудную клетку, живот, конечности. Этого требует здравый смысл в нашей работе.

Вспоминаю, как однажды ночью в приемное отделение терапевтических клиник мединститута машиной «кардиологической бригады» была доставлена больная 78 лет. В направлении было указано: «Подозрение на инфаркт миокарда». Перед дежурным врачом на кушетке лежала не очень ухоженная пожилая женщина с осунувшимся лицом, с дряблой кожей серовато-цианотического цвета, нитевидным пульсом 126 в минуту. Заболела вчера вечером, когда появились боли в животе, несколько усилилась ранее наблюдавшаяся у нее одышка, почувствовала сердцебиение с периодами «замирания».

Поскольку к моменту доставки ее в приемное отделение в картине болезни доминировала не очень сильная боль в животе, дежурный терапевт вызвал на консультацию ответственного хирурга. Опытный хирург осмотрел больную, записал на бланке «кардиологической бригады», что «данных за острый живот нет»? Больную госпитализировали в терапевти-

ческую клинику, где ее наблюдал уже дежурный врач клиники. При обследовании легких, сердца, живота, повторном анализе ЭКГ ординатору не удалось обнаружить таких патологических сдвигов, которыми можно было бы объяснить тяжелое, в общем-то, состояние больной, ее заторможенность и оглушенность.

Утром с группой студентов, лечащим врачом мы приступили к обходу вновь поступивших, тяжелых и «неясных» больных. И когда мы перешли к осмотру ног, откинули одеяло, то увидели мертвенно-бледные ноги с цианозом («мраморная кожа»). Пульс не прощупывался не только на *a. dorsalis pedis* и *a. tibialis posterior*, но и на бедренных артериях. Таким образом, здесь были признаки прекращения кровообращения на уровне бифуркации аорты. Были вызваны «сосудистые хирурги», больная сразу же была взята в операционную.

Хотел бы отметить следующее очень важное для руководителя обхода обстоятельство. В настоящее время наблюдается парадоксальная ситуация с получением результатов дополнительных исследований. Сейчас лечащему врачу, студенту труднее предоставить совершающему обход руководителю рутинные, наиболее простые исследования (суточный диурез до и после назначения сердечных средств, мочегонных препаратов, суточное количество выделяемой мокроты и др.), чем результаты компьютерной томографии различных областей, ультразвукового исследования различных органов.

Врачи и студенты часто затрудняются ответить на вопрос о характере выделяемой мокроты, мочи, цвете кала, так как они не считают нужным лично осматривать их.

Как правило, недостаточно часто проводятся динамические наблюдения за «скрытой кровью в кале» у больных гастроэнтерологического профиля.

Поражает стандартное назначение биохимических исследований больным с совершенно различными по тяжести и характеру заболеваниями.

Редко используется термометрия даже стандартным термометром в различных участках тела, изучение колебаний температуры в течение суток, что имеет важное значение в расшифровке причин «длительной субфебрильной температуры», «лихорадки неясного генеза».

Что касается лечения, то в настоящее время врачи и студенты стараются назначить комплексную терапию даже до получения всех необходимых результатов обследования. В данном случае речь идет не о состояниях, требующих неотложных мероприятий, когда назначение препаратов необходимо проводить, исходя из ведущего клинического синдрома (гиперкалиемия, острая дыхательная недостаточность и др.). Назначение современных активных препаратов и физиотерапевтических средств до окончания периода обследования «плановых» больных терапевтического профиля следует считать существенным недостатком в ведении больных.

Полипрагмазия — бич современной медицины, клиники внутренних болезней. На обходах часто при-

ходится видеть, как больным назначают 13—16 препаратов, нередко с взаимоисключающими фармакологическими свойствами. Вот почему совершающему обход больных руководителю, консультанту, преподавателю-клиницисту необходимо четко ориентировать участников обхода на то, что комплексное лечение — это использование в терапии различных способов, главными из которых являются лечебное питание, лечебная физкультура, воздействие физических факторов и только в последнюю очередь — лекарственные средства. Не зря в настоящее время ответственность терапевтов приближается к таковой оперирующих хирургов, и главную роль в повышении этой ответственности врачей терапевтического профиля играют медикаментозные средства. Мы знаем, что капли Зеленина, микстура Павлова, «капли датского короля», кажется, ушли в безвозвратное прошлое... Многочисленные кровопускания по каждому поводу (одному из Людовиков, королю французскому, тогдашние врачи сделали около тридцати эксангвинаций), рвотные порошки по каждому поводу, препарат из рога носорога, из корней мандрагоры, из мумий, из помета, из опилок, из крови ящериц, из сушеных гадюк, из спермы лягушек, из глаз крабов, а при бесплодии — вытяжки из кроличьих мозгов или селезенки кошки ...

Этот далеко неполный зловещий список лекарств и методов лечения, пришедший в XX и XXI век из древних времен и находящийся до сих пор сбыт в деятельности разного рода колдунов и целителей, можно было бы и продолжить ...

Врачи научной, официальной, государственной медицины используют в своей практике чрезвычайно активные вещества. Взять хотя бы гематологов, которые применяют сарколизин, винбластин, винкристин, метотрексат и ряд других цитостатиков и антиметаболитов, способных без надлежащего клинико-лабораторного динамического контроля «смести» напроць всю систему крови и гемостаза, эпителий, иммунную систему, обеспечивающие жизнедеятельность человека. Введенный в организм любой современный активный препарат быстро не выведешь. Вот почему мы, интернисты, все более осознаем свою высокую ответственность, проводя так называемую «консервативную» терапию.

Препараты приходят и уходят, а больной человек остается. Любому врачу, а терапевту и педагогу-клиницисту в особенности, надо помнить, что наряду с лекарствами с несомненно доказанным специфическим действием на организм человека, имеются и такие, которые действуют по типу «плацебо».

И погоня за «модными» лекарствами, стремление назначить «самые-самые» современные препараты есть показатель еще недостаточной профессиональной компетентности врача, студента. Вот почему мы сейчас добром вспоминаем то время, когда имелся дефицит медикаментов. Он играл положительную роль в том отношении, что уменьшал число больных с осложнениями лекарственной терапии, уменьшал число случаев «лекарственной болезни» в ее много-

гранных проявлениях... Однако этот же дефицит лекарств приводил к тому, что ряд хронических заболеваний принимал более тяжелое течение. И это мы должны констатировать во время клинического обхода и говорить об этой проблеме молодым врачам и студентам.

Распространенным недостатком в оформлении истории болезни является то, что на лицевой стороне ее не делается отметка о непереносимости того или иного лекарства. А ведь такая запись нужна не только палатному врачу, но и дежурному персоналу. Она позволяет врачу в случае необходимости не собирать подробный «аллергологический и гемотрансфузионный анамнез» и в то же время избегать введения препаратов, которые больной не переносит.

На клинических обходах обнаруживается поразительное нежелание врачей, студентов подсчитывать общее количество лекарств, принятых тем или иным больным за время лечения в клинике, в отделении, подсчитывать курсовую дозу медикаментов.

На обходе руководитель должен обязательно дать оценку качества написания истории болезни. Надо требовать от врачей и студентов, чтобы она представляла собой высококачественный клинический документ и содержала поистине научные сведения о течении болезни у конкретного больного, ее осложнениях и динамике симптомов, синдромов. И это не просто слова. С учетом бесчисленного количества индивидуально протекающих заболеваний у каждого конкретного больного врач постоянно является свидетелем весьма своеобразных патологических процессов. Он уподобляется в данном отношении экспериментатору, описывающему в «дневниках» истории болезни ход неповторимого эксперимента, который ставит Природа над человеком. Точное протоколирование хода такого эксперимента, течения болезни на фоне проводимой терапии является одной из значительных задач истории болезни. Вот почему огромное воспитательное значение имеет отзыв руководителя обхода о хорошем качестве оформления медицинской документации.

Не менее важным разделом истории болезни является описание хода диагностического и лечебного процесса, трудностей, сомнений, перспектив на будущее. Руководитель обхода должен поблагодарить врача, студента, если в истории болезни увидит написанное их руками «дополнение к анамнезу», «обоснование диагноза», свидетельствующие о постоянном размышлении лечащего врача по поводу судьбы больного человека, стремлении его «дойти до самой сути».

Одним из распространенных недочетов в оформлении медицинской документации является запаздывание с вынесением врачебных заключений (предварительного и клинического диагноза) на лицевую сторону истории болезни, точного указания даты их установления, тщательному анализу должна быть подвергнута и формулировка врачебных заключений (диагнозов). Необходимо требовать от врачей и студентов, чтобы диагнозы были сформулированы в со-

ответствии с общепринятыми правилами оформления (основное, сопутствующее, фоновое заболевание, осложнение основного, сопутствующего заболевания), номенклатурой и классификацией той или иной болезни.

И последнее. В настоящее время все настойчивее звучит требование специалистов, прежде всего врачей общей практики и семейных врачей, диагностировать у пациентов не только синдромы, нозологическую форму (болезнь), но определять его психологический и социальный статус. Если физикальный диагноз врачи всех специальностей привыкли устанавливать и знают, как это делать, то психологический и социальный диагнозы для многих врачей остаются за пределами знаний и понимания.

Особенности врожденных, наследственно обусловленных черт характера, все то, что испытывает и переживает, ощущает больной в ходе заболевания, его представления о своей болезни, ее причинах, определяют не только психологические типы отношения к болезни (гармонический, эргопатический, анозогнозический, тревожный, ипохондрический, неврастенический, меланхолический, апатический, сенситивный, эгоцентрический, паранойяльный, дисфорический). Психологический статус, характер больного неизбежно требуют от лечащих врачей индивидуализированного стиля общения (информационного, интерпретационного, совещательного, патерналистского) с такими пациентами и разработки адекватных программ лечения и профилактики. Например, «тревожный» пациент требует «материнского» подхода. В работе с ним врач должен проявлять максимум терпения, предоставить больному и членам его семьи (в пределах разумного) информацию о болезни, предложить полноценную комплексную программу лечения и профилактики. Эти больные всегда отзывчивы к комплексным программам. Их надо периодически подбадривать и поощрять. Однако врач должен быть всегда готов к тому, что тревога будет «тлеть», и больной найдет из-за чего тревожиться. Тревога эта как конституциональная его черта обычно сопутствует такому человеку всю жизнь.

Социальный статус пациента, определяемый врачом, основывается на оценке фактического уровня доходов больного и членов его семьи, а также на возможностях и желании больного и семьи тратить часть доходов на лечение, программы профилактики болезней группы риска в семье, воспитание потребности в здоровье через правильный образ жизни (И. Н. Денисов и соавт., 2001). Хотя в диагностичес-

кую формулу социальный статус больного (бедный, средне обеспеченный, богатый) в России пока не вносится, тем не менее он является основой для выбора стоимостных характеристик программ лечения и реабилитации, семейной профилактики и воспитания.

В «постсоциалистической» России уже фактически сложились три типа медицины: для бедных, средних и богатых. Каждому из этих типов соответствуют разные рекомендации:

А) по методикам лечения: оригинальные препараты 2—3 поколения — для богатых; дженерики — для средних; препараты 60—70-х годов прошлого века российского, индийского и др. производства — для бедных;

Б) по методам реабилитационной терапии: курорты мирового уровня — для богатых; российские курорты и санатории — для средних, местные зоны отдыха или сад, дача, огород — для бедных;

В) режим двигательной активности: большой теннис, плавание в заливах Пальма-де-Мальорки — для богатых; работа на своей даче и огороде, пешие прогулки — для бедных;

Г) диета: «средиземноморская» — для богатых; продукты со своей дачи и огорода — для бедных.

Необходимо заметить, что отношение богатых россиян к услугам медицины достаточно специфичное. Некоторые врачи тешат себя надеждой-иллюзией, что богатый пациент с удовольствием воспользуется платными услугами. И. Н. Денисов и соавт. (2001) предупреждают современных российских врачей: «Помните: богатый потому и богатый, что жаден. Богатые стараются выжать из страховой российской медицины все, что можно, используя связи, «телефонное право», нажим на главных и лечащих врачей вплоть до угроз физической расправы (а подчас — и не только угрозы...). Пользуясь медицинскими услугами, «новые русские» вспоминают при всяком удобном случае и старые добрые времена, когда «медицина-то уж была бесплатной», а также неоспоримый тезис «вышли мы все из народа».

Конечно, столь одиозный портрет характерен не для всех российских нуворишей...

Как диагностировать некоторые черты характера, социальный статус пациентов на основании простого осмотра глаз, носа, ушей, рук, поведения, будет рассказано в следующих разделах статьи.

**Адрес для корреспонденции:**

Кондурцев Валерий Алексеевич.  
Самарский государственный медицинский университет.  
443099, Российская Федерация, г. Самара, ул. К. Маркса, 165 Б;  
сл. тел. (846) 264-79-72.



**«Дар воскрешать прошедшее  
столь же изумителен и драгоценен,  
как и дар предвидеть будущее».  
А. Франс**

**В. С. УЛАЩИК**

## **ДАНИИЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ МАРКОВ (1895—1976)**

Институт физиологии НАН Беларуси

Своими успехами и достижениями невропатологи Беларуси во многом обязаны академику Даниилу Александровичу Маркову и созданной им научно-практической школе.

Д. А. Марков родился 1 января 1895 г. в с. Рассказово Тамбовской губернии в крестьянской семье, воспитавшей двух академиков: по медицине и теоретической физике (М. А. Марков — академик АН СССР, Герой Социалистического Труда, брат Д. А. Маркова).

После окончания Тамбовской гимназии в 1914 г. поступил в Саратовский университет, медицинский факультет которого успешно окончил в 1919 г. С 1919 г. по 1920 г. он был ординатором военного госпиталя в Пензе, с 1920 г. по 1923 г. — младшим врачом полка в Житомире. Уже в этот период он проявил интерес к физическим методам лечения, в 1924—1925 гг. заведовал электролечебницей отдела здравоохранения Волынского окружного исполкома. С 1926 г. Д. А. Марков связал свою жизнь с Белоруссией и в его биографии, как будет видно ниже, теснейшим образом переплелось служение невропатологии и физиотерапии.

В 1926—1930 гг. Даниил Александрович последовательно работал ассистентом, доцентом и заведующим кафедрой нервных болезней Белгосуниверситета. В 1931—1934 гг. он руководил кафедрой физиотерапии и нервных болезней Белорусского (Минского) медицинского института, в 1935—1941 гг. — кафедрой нервных болезней. В 1936 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук, в 1939 г. был избран членом-корреспондентом, в 1940 г. — действительным членом (академиком) Академии наук БССР. Одновременно в эти годы (1931—1941) Д. А. Марков был директором Государственного института физиотерапии, ортопедии и неврологии (ГИФОН, впоследствии Белорусский научно-исследовательский институт неврологии, нейрохирургии и физиотерапии). Эту должность он занимал и в 1945—1948 гг., а с 1948 г. по 1954 г. работал в должности заместителя директора по научной работе (научный руководитель института).

В 1947 г. в Белорусском государственном институте усовершенствования врачей была открыта кафедра нервных болезней и физиотерапии, которой Д. А. Марков заведовал с марта 1947 г. по апрель 1973 г. В эти годы он являлся главным невропатологом Министерства здравоохранения БССР и внес заметный вклад в развитие практической невропатологии в стране.

В 1950—1976 гг. Д. А. Марков активно занимался научно-исследовательской работой, заведя лаборато-

рией патофизиологии нервной системы Института физиологии АН БССР, таким образом, в полной мере воплотил в реальность принадлежащее ему же крылатое выражение: «Нет большой теории без большой практики».

Много славных страниц вписал Д. А. Марков в развитие отечественной науки. Он являлся автором более 250 научных работ, в том числе 12 монографий, посвященных различным разделам неврологии и физиотерапии. Под его редакцией опубликовано 16 сборников научных работ. Он подготовил 10 докторов и 42 кандидата медицинских наук. Написал статьи для Большой и Малой медицинских энциклопедий, а также ряд разделов в многотомном руководстве по невропатологии (1960—1963 гг.).

За выдающиеся заслуги в научной, педагогической и общественной деятельности Д. А. Марков награжден двумя орденами Трудового Красного Знамени, несколькими медалями, удостоен звания «Заслуженный деятель науки БССР», являлся лауреатом Государственной премии БССР в области науки и техники.

Умер Д. А. Марков в 1976 г., похоронен в Минске на кладбище «Северное».

Научные интересы Д. А. Маркова весьма широки. Являясь учеником Г. И. Россоломо и М. Б. Кроля, он продолжил и развил взгляды и исследования своих знаменитых учителей-невропатологов.

В первые годы своей научной деятельности Д. А. Марков активно занимался изучением хронаксиметрии и первым в СССР применил этот метод в клинике для диагностики и контроля лечения пациентов. Полученные им данные по хронаксиметрии (нормальные «стандарты», хронаксиметрия мышечного тонуса, клинические хронаксиметрические синдромы и др.) вошли в отечественные и зарубежные учебники и руководства. По этой проблеме в 1936 г. он защитил докторскую диссертацию и написал две монографии: «Клиническая хронаксиметрия» (1935) и «Хронаксиметрия в клинике» (1956). Наряду с применением хронаксиметрии он инициировал использование в клинике плетизмографического метода.

Обобщив собственные клинические наблюдения, в 1936 г. Д. А. Марков описал голено-пальцевой симптом (феномен), вошедший под его именем во многие справочники и учебники. Также он впервые описал табетические артропатии позвоночника, «внутренние» припадки при эпилепсии в межприпадочный период, склеромный полиневрит и др.

Многие годы он занимался изучением патогенеза и лечением эпилепсии. Результаты исследований нашли отражение в ряде статей и написанной совместно с Т. М. Гельманом книге «Эпилепсии и их лечение» (1954). Много работ Д. А. Марков и его сотрудники посвятили медикаментозному лечению нервных заболеваний. Многолетний и разносторонний опыт лечения больных с неврологическими заболеваниями нашел

отражение в его «терапевтической трилогии», включающей монографии: «Основы патогенетической терапии заболеваний нервной системы» (1964), «Общая терапия и профилактика заболеваний нервной системы» (1967) и «Основы восстановительной терапии заболеваний нервной системы» (1973). В то время в отечественной и иностранной литературе не было труда, аналогичного трехтомнику Д. А. Маркова, в котором так широко были бы представлены методы рациональной (патогенетической) терапии на основе полувекового опыта автора, успешно сочетающего в своем лице клинициста и патофизиолога. В 1974 г. за комплекс работ по патогенетической и восстановительной терапии и внедрение их результатов в клинику нервных болезней академику Д. А. Маркову была присуждена Государственная премия БССР в области науки и техники.

Наиболее широкую известность Д. А. Маркову принесли его исследования по демиелинизирующим заболеваниям нервной системы. По этой проблеме он долгие годы возглавлял соответствующую Всесоюзную секцию АМН СССР. Он сформулировал положение о дисмиелиновом глиогенезе при демиелинизирующих заболеваниях нервной системы, мембранную концепцию (теория олигодендролита) и гипотезу парасинаптического проведения возбуждения во внутрицентральных демиелинизированных волокнах. Совместно с А. Л. Леонович предложил классификацию демиелинизирующих заболеваний нервной системы. Под руководством Д. А. Маркова разработана модель экспериментально-аллергического энцефаломиелита, позволившая детально изучить процессы демиелинизации и апробировать различные методы стимуляции ремиелинизации. В 1966 г. он описал основные симптомы при рассеянном склерозе, наиболее полно характеризующие это заболевание (секстеда Маркова): 1) зрительные нарушения; 2) лабильность симптомов поражения глазодвигательных нервов; 3) возбуждение преддверно-улиткового нерва; 4) нарушение чувствительности и прежде всего изолированное поражение вибрационной чувствительности; 5) поражение пирамидной системы; 6) некоторые изменения состава спинномозговой жидкости (наличие коллоидно-белковой диссоциации).

В патогенезе рассеянного склероза как хронического иммунного заболевания Д. А. Марков сделал акцент на изменении реактивных особенностей еще формирующегося макроорганизма под влиянием средовых условий и факторов, предрасполагающих (сенсбилизация нервной ткани, возможный дефицит микроэлементов, витаминов группы В), провоцирующих (отрицательные эмоции, травмы, беременность и др.), вызывающих (экзогенные аллергены, антиген—антитело с цепным ауто-

аллергическим комплексом — участием гуморальных и клеточных реакций), сопутствующих и осложняющих заболевание (специальные медиаторные сдвиги, эндокринные, обменные, сосудистые расстройства, нарушение изолированного проведения возбуждения в нервных проводниках). Изменению центральных регуляторных механизмов нейроаллергических реакций со стадией начального мембраноза, приводящих к демиелинизации, Д. А. Марков отводил главенствующую роль в патогенезе рассеянного склероза.

По проблеме демиелинизирующих заболеваний нервной системы под руководством или при консультировании Д. А. Маркова защищены 4 докторские и 12 кандидатские диссертации, изданы тематические сборники «Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания» и «Острый энцефаломиелит в клинике и эксперименте», а также методическое пособие для врачей.

Получили известность также работы Д. А. Маркова по спондилогенным миопатиям, ишемическому инсульту, реперкуссивным феноменам и проблемные статьи по развитию невропатологии в БССР.

Велики заслуги Д. А. Маркова и в области физиотерапии и курортологии. Одна из первых работ Д. А. Маркова в области физиотерапии была посвящена лекарственному электрофорезу («Электроионизация как самостоятельный метод»), которая была опубликована

в «Ученых записках Белгосуниверситета» (1927). В ней он не только обрисовал состояние проблемы, но и указал на перспективы развития метода, отметил основные направления использования его в клинической медицине.

Большое значение не только для невропатологии, но и для физиотерапии имели исследования Д. А. Маркова по хронаксиметрии. В работах Даниила Александровича убедительно продемонстрировано, что хронаксиметрия может применяться не только с диагностическими целями, но и для оценки эффективности физических методов лечения при заболеваниях центральной и периферической нервной системы, а также опорно-двигательного аппарата. Этот метод он использовал также для оценки реперкуссивных феноменов в физиотерапии. В ходе многочисленных исследований установлено, что как сегментарно, так и локально физиотерапевтическое воздействие вызывает ряд отдаленных переходящих реперкуссивных изменений общей (кожной) чувствительности. На эту тему Д. А. Марков сделал доклад на III Всесоюзном съезде физиотерапевтов (декабрь 1935 г., Харьков), который вызвал большой интерес у участников съезда.

Многие годы Д. А. Марков и его коллеги изучали роль нервной системы и ее различных отделов (особенно мозжечка) в механизмах действия лечебных физических факторов. Он неоднократно отмечал, что ответная ре-



акция на физиотерапевтическое воздействие является многозвеньевым сложным рефлекторным актом, где всегда наряду со спинальными или подкорковыми компонентами безусловного рефлекса имеют место кортикальные условно-рефлекторные процессы. Задолго до объединенной сессии АН и АМН СССР, посвященной учению И. П. Павлова (1950), Д. А. Марков подчеркивал, что в механизме действия лечебных физических факторов преувеличивается (школа А. Е. Щербака) роль вегетативной нервной системы и недооценивается значение коры головного мозга.

Под руководством Д. А. Маркова в Институте физиотерапии, ортопедии и неврологии и на руководимой им кафедре нервных болезней и физиотерапии активно изучался механизм действия, а также эффективность лечебных грязей (торф, сапропели) Белоруссии. В ряде исследований было убедительно показано, что по своей терапевтической эффективности торф при многих заболеваниях не уступает иловым грязям, процедуры с ним легче переносятся пациентами. Были определены показания и противопоказания к использованию белорусских торфов и сапропелей с лечебно-оздоровительными целями. Институт геологических наук АН БССР (Г. В. Богомолов, М. Ф. Козлов, А. В. Кудельский и др.) с 1947 г. по инициативе Д. А. Маркова начал планомерную разведку и изучение минеральных вод Белоруссии. Благодаря этому почти на всей территории республики были обнаружены минеральные воды различного химического состава и минерализации, пригодные для лечебно-профилактического использования. Эти исследования и поисковые работы, вне сомнения, послужили толчком и стали научной базой для развития санаторно-курортного строительства в БССР.

Получили признание и работы Д. А. Маркова по физиопротекции, использованию бани, климата и солнечных ванн с лечебно-профилактическими целями. В 1965 г. на Всесоюзном съезде физиотерапевтов и курортологов он совместно с профессором Г. Л. Каневским представил доклад «Клинико-физиологические механизмы действия курортных и физиотерапевтических факторов на организм», в котором сделал всесторонний анализ данного вопроса в тот период. Научно обосновал роль исходного функционального состояния больного организма, специфических и неспецифических свойств

физических воздействий и условий применения физических факторов. В докладе и опубликованной позже (1968) статье подчеркивалось, что конечной целью физиотерапевтического воздействия является нормализация нарушенных функций, стимулирование механизмов защиты, компенсация или восстановление нередко через гашение доминанты, депарабиотизирующее влияние физических факторов и другие нейродинамические сдвиги. Многие из представленных в докладе положений не устарели и сегодня.

Д. А. Марков сыграл большую роль в создании Белорусского научно-медицинского общества физиотерапевтов и курортологов, которое ученый бессменно возглавлял почти 30 лет (1948—1975 гг.). Регулярно проводимые под его председательством заседания общества не только способствовали коллективному осмыслению результатов научных исследований в республике и за ее пределами, но и содействовали продвижению их в практику и привлечению к научно-исследовательской работе практических врачей, работающих в лечебно-профилактических и санаторно-курортных учреждениях.

Д. А. Марков стоял у истоков создания системы подготовки и повышения квалификации врачей по физиотерапии. Сначала эта работа велась на возглавляемой им кафедре невропатологии Белорусского института усовершенствования врачей, затем был организован самостоятельный курс физиотерапии, который возглавила ученица Д. А. Маркова доцент Г. Е. Багель. В 1977 г. курс был преобразован в кафедру физиотерапии, ставшую одной из ведущих в СССР. Под руководством Даниила Александровича были написаны первые в Белоруссии книги по физиотерапии: «Безаппаратная физиотерапия и физиопротекция» (1952), «Развитие санаторно-курортного дела в Белорусской ССР» (1952) и др.

Академик Д. А. Марков оставил неизгладимый след в истории невропатологии и физиотерапии и по праву считается основателем научных школ невропатологов и физиотерапевтов в республике. Многие из его идей в этих областях медицины медики продолжают разрабатывать и сегодня. Успехи и достижения нынешних невропатологов, физиотерапевтов и курортологов свидетельствуют о жизненности и правильности идей и взглядов замечательного врача и ученого, каким был академик Д. А. Марков.

#### ВЫХОДНЫЕ ДАННЫЕ

© «Здравоохранение» (Минск), № 10 2014 г.

Рецензируемый научно-практический журнал

Свидетельство о государственной регистрации № 562 от 20.07.2009 г.

#### Регистрирующий орган:

Министерство информации Республики Беларусь

#### Учредитель

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

#### Главный редактор

Абаев Юрий Кафарович

#### Редакция

Вронская Т. П. (информация, реклама)

Гелжец Н. Ф. (верстка)

Здоровикова И. А., Лоскутова С. А., Чапковская У. Л. (редакторы)

Дизайн обложки: Сергей Саркисов

#### Подписные индексы:

для организаций – 749122,

для индивидуальных подписчиков – 74912,

Цена: свободная

Подписано в печать 23.09.2014.

Формат 60x84 1/8. Офсетная печать.

Физ. печ. л. 10,0+1,0 печ. л. пр. Усл. печ. л. 9,3. Уч.-изд. л. 11,8

Тираж 1858 экз. Зак. 2728

#### Адрес редакции:

220007, Минск, Фабрициуса, 28

Телефоны: +375 17 226-21-66, +375 17 226-21-48

E-mail: zdrav@tut.by

zdravmag@mailgov.by

С информацией «К сведению авторов» можно ознакомиться на сайте [www.zdrav.by](http://www.zdrav.by)

#### Типография:

Республиканское унитарное предприятие

«Издательство «Белорусский Дом печати»

ЛП №02330/106 от 30.04.2004 г.

Пр. Независимости, 79, 220013, г. Минск

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