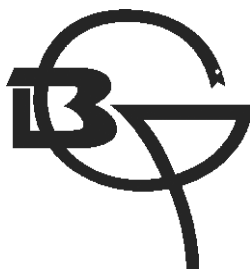


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

БЮЛЛЕТЕНЬ
ВОСТОЧНО-СИБИРСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА



№ 5 (87) Часть 1

2012

ИРКУТСК

Главный редактор

С.И. Колесников

Зам. главного редактора

В.С. Рукавишников

Ответственный секретарь

Т.Г. Карпова

Редакционная коллегия

И.В. Бычков

Е.Г. Григорьев

В.В. Долгих

Л.И. Колесникова

Д.В. Кулеш

И.В. Малов

В.В. Малышев

В.А. Сорокинов

В.В. Шпрах

Выпуск подготовили:

Л.И. Колесникова

М.Ф. Савченков

В.В. Долгих

В.Д. Кулеш

Е.Д. Савилов

В.А. Астафьев

Г.А. Данчинова

И.В. Козлова

С.М. Попкова

О.Б. Огарков

Н.Н. Чемезова

Редакционный совет

И.П. Артюхов (Красноярск), С.В. Балахонов (Иркутск), Г.И. Бишарова (Чита), А.В. Говорин (Чита), Дж. Анн Гроссман (США, Нью-Йорк), А.А. Дзизинский (Иркутск), В.В. Дворниченко (Иркутск), В.В. Захаренков (Новокузнецк), Н.Ф. Измеров (Москва), В.К. Козлов (Хабаровск), В.В. Кожеников (Улан-Удэ), М.Т. Луценко (Благовещенск), Л.М. Макаров (Москва), В.Т. Манчук (Красноярск), П. Нямдаваа (Монголия, Улан-Батор), А.З. Плюснин (Финляндия, Хельсинки), Н.В. Протопопова (Иркутск), М.Ф. Савченков (Иркутск), Р.К. Салеев (Иркутск), О. Сэргэлэн (Монголия, Улан-Батор), К. Такакура (Япония, Токио), Е.В. Уварова (Москва), Е.А. Шмелева (Москва), А.Г. Щуко (Иркутск)

Авторы опубликованных материалов несут ответственность за подбор и точность приведенных фактов, цитат, статистических данных и прочих сведений, а также за то, что в материалах не содержится данных, не подлежащих открытой публикации.

Мнение автора может не совпадать с мнением редакции.

Адрес редакции: 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16.

ВСНЦ ЭЧ СО РАМН.

Тел. (3952) 20-98-05, 20-90-48, факс. 20-98-13.

E-mail: sikol@sbamsr.irk.ru

Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство о регистрации СМИ – ПИ № ФС77-47129 от 02 ноября 2011 г.

Основан в 1993 году.

Учредитель – Учреждение Российской академии медицинских наук Восточно-Сибирский научный центр экологии человека Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16).

Бюллетень включен в Реферативный журнал и Базу данных ВИНТИ. Сведения о журнале публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям "Ulrich's Periodicals Directory".

Бюллетень ВСНЦ СО РАМН входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук».

Издание подготовлено при поддержке гранта РФФИ № 12-04-06069-г.

Подписной индекс 24347.

© Восточно-Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН, 2012 г.

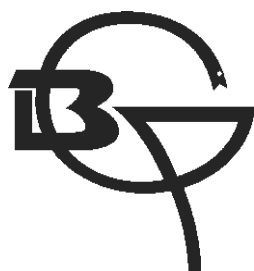
© Оригинал-макет РИО НЦРВХ СО РАМН, 2012 г., тел. (3952) 29-03-37.

Тираж – 500 экз.

Отпечатано в НЦРВХ СО РАМН, Иркутск, ул. Борцов Революции, 1.

RUSSIAN ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES
SIBERIAN BRANCH

BULLETIN
OF EASTERN-SIBERIAN SCIENTIFIC CENTER



N5 (87) Part 1

2012

IRKUTSK

Chief Editor

S.I. Kolesnikov

Deputy Chief Editor

V.S. Rukavishnikov

Executive secretary

T.G. Karpova

Editorial board

I.V. Bychkov

E.G. Grigoriev

V.V. Dolgikh

L.I. Kolesnikova

D.V. Kulesh

I.V. Malov

V.V. Malyshev

V.A. Sorokovikov

V.V. Shprakh

The issue is prepared by:

L.I. Kolesnikova

M.F. Savchenkov

V.V. Dolgikh

V.D. Kulesh

E.D. Savilov

V.A. Astafiev

G.A. Danchinova

I.V. Kozlova

S.M. Popkova

O.B. Ogarkov

N.N. Chemezova

Editorial Council

I.P. Artyukhov (*Krasnoyarsk*), S.V. Balakhonov (*Irkutsk*), G.I. Bisharova (*Chita*), A.V. Govorin (*Chita*), J. Ann Grossman (*USA, New-York*), A.A. Dzizinskiy (*Irkutsk*), V.V. Dvornichenko (*Irkutsk*), V.V. Zakharenkov (*Novokuznetsk*), N.F. Izmerov (*Moscow*), V.K. Kozlov (*Khabarovsk*), V.V. Kozhevnikov (*Ulan-Ude*), M.T. Lutsenko (*Blagoveshchensk*), L.M. Makarov (*Moscow*), V.T. Manchouk (*Krasnoyarsk*), P. Nyamdavaa (*Mongolia, Ulaanbaatar*), A.Z. Plusnin (*Finland, Helsinki*), N.V. Protopopova (*Irkutsk*), M.F. Savcheykov (*Irkutsk*), R.K. Salyajev (*Irkutsk*), O. Sergelen (*Mongolia, Ulaanbaatar*), K. Takakura (*Japan, Tokyo*), E.V. Uvarova (*Moscow*), E.A. Shmeliova (*Moscow*), A.G. Shchuko (*Irkutsk*)

The authors of the published articles account for choice and accuracy of presented facts, quotations, historical data and other information; the authors are also responsible for not presenting data which are not meant for open publication.

The opinion of the authors may not coincide with that of editorial board.

Address of editorial board: 16, Timiryaseva str., Irkutsk, Russia, 664003

Presidium of ESSC HE SB RAMS.

Tel. (3952) 20-98-05, 20-90-48, fax. 20-98-13.

E-mail: sikol@sbamsr.irk.ru

Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences is registered in Federal Service of Supervision in communication sphere, information technologies and mass media. Certificate of Mass Media Registration – ПИ № ФС77-47129 of 2 November 2011.

The Bulletin has been founded in 1993.

Founder – Eastern-Siberian Scientific Center of Human Ecology of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (16, Timiryaseva str., Irkutsk, Russia, 664003).

Bulletin is included in Abstract Journal and Data base of All-Russian Institute of Scientific and Technical Information. Information about the Bulletin is published in international question-answering system of periodicals and continued publications "Ulrich's Periodicals Directory".

Bulletin ESSC SB RAMS is included in «List of Russian reviewed scientific periodicals where main scientific results of dissertations for a degree of Candidate and Doctor of Science should be published»

The edition is prepared with support of grant of Russian Foundation for Basic Research № 12-04-06069-r.

Subscription index 24347.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Передовая статья

- Колесникова Л.И., Кулеш Д.В., Коган В.М. Институту эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН 100 лет 13

Клиническая медицина

- Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф. Бактерионосительство или латентный туберкулез? 22
- Бабанская Е.Б., Меньшикова Л.В., Дац Л.С. Эпидемиология хронической сердечной недостаточности в городе Иркутске 25
- Буйнова С.Н., Горбовской Ф.В. Частота симптомов аллергического ринита у детей в Иркутской области за десятилетний период 29
- Воробьева О.А., Семечкина В.С. Особенности биологических свойств микобактерий туберкулеза, распространенных на территории Иркутской области 32
- Дац А.В. Частота гиповолемии у пациентов отделений интенсивной терапии и ее влияние на летальность 35
- Дац Л.С., Меньшикова Л.В., Бабанская Е.Б., Меньшиков М.Л. Распространенность болезней костно-мышечной системы и переломов среди лиц молодого возраста в г. Иркутске 38
- Дешко Е.С. Некоторые аспекты иммунопатологии у ВИЧ-инфицированных больных, проживающих в условиях Крайнего Севера 41
- Долгих В.В., Кулеш Д.В., Колесникова Л.Р., Чemezova Н.Н. Выявление пародонтопатогенных микроорганизмов у пациентов с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия методом ПЦР 44
- Жданова С.Н., Огарков О.Б., Зарбуев А.Н., Унтанова Л.С., Савилов Е.Д. Исследование генетического разнообразия *Mycobacterium tuberculosis* при сочетанной патологии с ВИЧ-инфекцией в Восточно-Сибирском регионе 47
- Карпенко С.Ф., Галимзянов Х.М., Касимова Н.Б. Возрастные особенности антиоксидантной защиты при коксиеллезе 51
- Карпенко С.Ф. Гиперчувствительность замедленного типа в реакции торможения миграции лейкоцитов с легочным экстрактом у больных коксиеллезом 54
- Корецкая Н.М., Наркевич А.Н. Первичная множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза по данным стационара Красноярского краевого противотуберкулезного диспансера № 1 56

Передовая статья

- Kolesnikova L.I., Kulesh D.V., Kogan V.M. 100-years anniversary of the Institute of Epidemiology and Microbiology

Clinical medicine

- Alexeeva G.I., Kravchenko A.F. Bacterial carrier state or latent tuberculosis? 22
- Babanskaya E.B., Menshikova L.V., Dats L.S. Epidemiology of chronic heart failure in Irkutsk 25
- Buynova S.N., Gorbovskoy F.V. The dynamics of allergic diseases symptoms in children in Irkutsk city during the 10 years period 29
- Vorobiova O.A., Semechkina V.S. Peculiarities of biological features of *Mycobacterium tuberculosis* on the territory of Irkutsk region 32
- Dats A.V. The frequency of hypovolemia in the patients of intensive care units and its influence on the mortality 35
- Dats L.S., Menshikova L.V., Babanskaya E.B., Menshikov M.L. Prevalence of the diseases of osteomuscular system and fractures among the persons of young age in Irkutsk 38
- Deshko E.S. Some aspects of HIV-immunopatology in infected persons living in the Far North 41
- Dolgikh V.V., Kulesh D.V., Kolesnikova L.R., Chemezova N.N. Identification of periodontitis pathogenic microorganisms in patients with the diagnosis of essential arterial hypertension by means of PCR method 44
- Zhdanova S.N., Ogarkov O.B., Zarbuev A.N., Untanova L.S., Savilov E.D. Genetic polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in Eastern Siberia 47
- Karpenko S.F., Galimzyanov, N.B. Kasimova Aged features of antioxidant protection under coxiellosis 51
- Karpenko S.F. Hypersensitivity of the slow-type reaction of stopping migration of the leucocytes with pulmonary extract in the patients with coxiellosis 54
- Koretskaya N.M., Narkevich A.N. Primary multidrug resistance of tuberculosis mycobacterium according to data of Krasnoyarsk regional tuberculosis dispensary № 1 in-patient department 54

- Лисовская О.А.* Микологические исследования при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем 59
- Лиханская Е.И., Пожалостина Л.В., Феклисова Л.В., Боцкарева Н.М.* Выявление криптоспоридий и характеристика микрофлоры кишечника у детей с острыми кишечными инфекциями 63
- Лялина Л.В., Игнатьева М.Е., Нарвская О.В., Филиппова Ю.Н., Вязовая А.А., Касаткин Е.В., Каткявичене Е.В.* Распространенность вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в Республике Саха (Якутия), Санкт-Петербурге и Республике Карелия 68
- Муляр Н.Ф., Верещагина С.А., Фадеева Т.В., Спасов Г.П., Кая О.В.* *Clostridium difficile*-ассоциированные диареи в многопрофильном стационаре 72
- Павлова Т.П.* Распространенность грибковых заболеваний кожи в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе 76
- Пустозеров В.Г., Баженова Ю.В.* Эпидемиология остеопоротических переломов позвонков у лиц пожилого и старческого возраста 79
- Lisovskaya O.A.* Mycological studying during various diseases of gastrointestinal, respiratory and urogenital systems
- Likhanskaya E.I., Pozhalostina L.V., Feklisova L.V., Bochkareva N.M.* Detection of Cryptosporidium and characterization of the intestinal microflora in children with acute intestinal infections
- Lyalina L.V., Ignatyeva M.E., Narvskaya O.V., Filippova Yu.N., Vyazovaya A.A., Kasatkin E.V., Katkyavichene E.V.* Prevalence of high carcinogenic risk human papillomavirus in the Republic of Sakha (Yakutia), St. Petersburg and the Republic of Karelia
- Mulyar N.F., Vereschagina S.A., Fadeeva T.V., Spasov G.P., Kanya O.V.* *Clostridium difficile* associated diarrhea in multidisciplinary hospital
- Pavlova T.P.* The prevalence of fungal skin diseases in Nizhneudinsk and Nizhneudinsk district
- Pustozarov V.G., Bazhenova Y.V.* Epidemiology of osteoporotic fractures of vertebrae in elderly and senile persons

Профилактическая медицина

- Галазий О.В.* Использование методов физической культуры у детей старшего дошкольного возраста с туберкулезной интоксикацией при формировании основ здорового образа жизни в условиях детского дошкольного учреждения 84
- Зверева Т.В., Гордейко Н.С.* Возможность оценки эпидемиологической обстановки по инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами, на основании данных о численности и активности переносчика 86
- Зюбина Н.И., Бишарова Г.И.* Оценка состояния здоровья детского населения Забайкальского края 89
- Корецкая Н.М., Чушкина А.А., Наркевич А.Н.* Эпидемиологические аспекты патоморфоза туберкулеза в современных условиях 92
- Кравченко Н.А., Яковенко О.Н.* Роль заболеваний дыхательной системы в причинах смертности населения Иркутской области 95
- Лусак О.В., Козлова И.В., Сунцова О.В., Богомазова О.Л., Дорощенко Е.К., Чумаченко И.Г., Черноиванова О.О., Ревизор А.О.* Современная эпидемиологическая ситуация в отношении трансмиссивных клещевых инфекций в северных районах Иркутской области 97
- Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Сидорова Е.А., Андаев Е.И.* Особенности заболеваемости иксодовыми клещевыми боррелиозами жителей г. Иркутска в зависимости от географического места заражения 102
- Galaziy O.V.* The use of physical culture methods in preschool children with tuberculous intoxication in the process of the basis formation of healthy lifestyle in the children's pre-school establishment
- Zvereva T.V., Gordeyko N.S.* Ability to assess the epidemiological situation of infections transmitted by *Ixodes* ticks on the basis of the number and activity of the vector
- Zyubina N.I., Bisharova G.I.* Evaluation of child health in Transbaikalian region
- Koretskaya N.M., Chushkina A.A., Narkevich A.N.* Epidemiological aspects of the tuberculosis pathomorphism in modern conditions
- Kravchenko N.A., Yakovenko O.N.* The role of respiratory disease in causes of mortality in the Irkutsk region
- Lysak O.V., Kozlova I.V., Suntsova O.V., Bogomazova O.L., Doroshchenko E.K., Chumachenko I.G., Chernoiivanova O.O., Revisor A.O.* Modern epidemiology of vector-borne tick-borne infections in northern districts of the Irkutsk region
- Melnikova O.V., Vershinin E.A., Sidorova E.A., Andayev E.I.* Peculiarities of ixodid tick-borne borreliosis morbidity within Irkutsk residents depending on geographical place of infection
- Musagaliyeva R.S., Atshabar B.B., Sagymbek U.A., Zholshorinov A.Zh., Zhumadilova Z.B., Sagiyez A.A., Kasanova A.K., Ismailova A.O., Zhunusova G.S., Zholdasbekov A.S., Sailaubek R.S., Rahimov K.R.,*

Рахимов К.Р., Атовуллаева Л.М., Алиев Д.С., Мегетов Ж.Б. Эпидемиологическая обстановка по холере в республике Казахстан за 2011 г.	106	Atovulayeva L.M., Aliyev D.S., Medetov Zh.B. The epidemiological situation on cholera in the republic of Kazakhstan in 2011	
Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Ястребов В.К., Самойленко И.Е., Кумпан Л.В., Решетникова Т.А., Абрамова Н.В., Коломеец А.Н. Современное состояние проблемы риккетсиозов в России и новые подходы к классификации болезней, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки	109	Rudakov N.V., Shpynov S.N., Yastrebov V.K., Samoylenko I.E., Kumpan L.V., Reshetnikova T.A., Abramova N.V., Kolomeyetz A.N. The present state of the problem of rickettsioses in Russia and new approaches to the classification of diseases caused by spotted fever group rickettsiae	
Савилов Е.Д. Эпидемический процесс в современных условиях	114	Savilov E.D. Epidemic process in modern conditions	
Семечкина В.С., Зоркальцева Е.Ю., Воробьева О.А. Экологический прессинг как фактор риска формирования неблагоприятной эпидемиологической ситуации по туберкулезу	119	Semechkina V.S., Zorkaltsewa E.U., Vorobiova O.A. Eco-pressing as a risk factor of unwholesome tuberculosis epidemiological development	
Соболев И.А., Курская О.Г., Иванова Е.В., Дурыманов А.Г., Ильичева Т.Н., Михеев В.Н., Шестопалов А.М. Эпидемиологическая ситуация по гриппу на юге западной Сибири в 2011 – 2012 гг.	122	Sobolev I.A., Kurskaya O.G., Ivanova E.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Mickheyev V.N., Shestopalov A.M. Influenza virus epidemiological situation in the south of Western Siberia in 2011 – 2012	
Степаненко Л.А., Астафьев В.А., Самойлова И.Ю. Заболеваемость инфекциями с фекально-оральным механизмом передачи в Республике Саха (Якутия)	127	Stepanenko L.A., Astafiyev V.A., Samoylova I.Yu. Incidence of infections with the faecal and oral transmitting mechanism the Republic of Sakha (Yakutia)	
Ханхареєв С.С., Амагзаєва Г.С., Рагнаєва Л.А. Высокпатогенный грипп в Республике Бурятия и его профилактика в эпидсезон 2009 – 2010 гг.	132	Khankhareyev S.S., Amagzayeva G.S., Radnayeve L.A. The highly pathogenic influenza in the Republic of Buryatia and preventive maintenance in epidemic season 2009 – 2010	
Ханхареєв С.С., Амагзаєва Г.С., Гаврилова Н.А., Дараєва Б.Б. Заболеваемость вирусным гепатитом В в Республике Бурятия	135	Khankhareev S.S., Amagzayeva G.S., Gavrilova N.A., Darayeva B.B. The morbidity of viral hepatitis b in the republic of Buryatia	
Чекунина С.Н., Яковлев А.А., Кравцов И.А. Эпидемиологическая оценка влияния демографической структуры населения на пространственный аспект эпидемического процесса гепатита А, шигеллез Флекснера и Зонне в Приморском крае	137	Chekunina S.N., Yakovlev A.A., Kravtsov I.A. Epidemiological assessment of influence of demographic structure of the population on spatial aspect of epidemic process of hepatitis A, shigellosis Flexner and Sonne in Primorsky krai	
Чушкина А.А., Корецкая Н.М. Патоморфоз инфильтративного туберкулеза легких за 20-летний период	141	Chushkina A.A., Koretskaya N.M. Pathomorphism of infiltrative pulmonary tuberculosis for a 20-year period	
Шмелева Е.А., Попкова С.М., Фирсова Т.Н., Сердюк Л.В., Ракова Е.Б., Губин М.М. Содержание противодифтерийных антитоксических и антибактериальных антител в сыворотках здоровых взрослых людей	145	Shmeleva E.A., Popkova S.M., Firsova T.N., Rakova E.B., Serdyuk L.V., Gubin M.M. Contents diphtheria antitoxic and antibacterial antibodies in the serum of healthy adults	
Якимова Т.Н., Максимова Н.М., Маркина С.С. Эпидситуация по дифтерии в России и в субъектах Российской Федерации с 2005 – 2011 гг.	151	Yakimova T.N., Maksimova N.M., Markina S.S. Epidemiological situation of diphtheria in Russia and in the regions of the Russian Federation since 2005 to 2011	

**Экспериментальные исследования
в биологии и медицине**

Масузава Т., Охашаи Н., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Иванов Л.И., Фукуи Т., Окамото Й., Пан М.Дж., Коизуми Н. Сравнительное исследование анаплазм в Японии и других странах	155
Янагихара Р. Реконструкция эволюционной истории хантавирусов	158

**Experimental researches
in biology and medicine**

Masuzawa T., Ohashi N., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Ivanov L.I., Fukui T., Okamoto Y., Pan M.J., Koizumi N. Comparative study of anaplasma in Japan and other countries	
Yanagihara R. Reconstructing the evolutionary history of hantaviruses	

- Абдуллазянова Э.Р., Зайковская А.В., Шестопалова Л.В., Шестопалов А.М. Изучение патогенетических особенностей инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гиппа А/Н5N1 у диких уток и домашних кур 163
- Abdullazyanova E.R., Zajkovsmaya A.V., Shestopalova L.V., Shestopalov A.M. Study of pathogenetic features infectious caused by highly pathogenic influenza virus a/h5n1 in wild ducks and domestic chicken
- Абидуева Е.Ю., Козырева Л.П., Цыренова Д.Д., Намсараев Б.Б., Батоболотова Б.Б., Матюгина Е.Б. Микробиологическая оценка качества воды и донных отложений содово-соленых озер Забайкалья 166
- Abiduyeva E.Yu., Kozyreva L.P., Tsyrenova D.D., Namsarayev B.B., Batobolotova B.B., Matyugina E.B. Microbiological evaluation of water quality and sediments of soda-saline lakes of the Zabaikalye
- Абмэд Д., Батаа Ж., Ану Д., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Нимадаваа П., Нимахуу Д. Итоги исследований клещевых инфекций в Монголии 171
- Abmed D., Bataa Zh., Anu D., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Nimidavaa P., Nimahuu D. Results of investigation of tick-borne infections in Mongolia
- Агамович С.Н., Федосеев А.П., Киборт Р.В., Мирсков Р.Г., Мирскова А.Н. Перспективные стимуляторы повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (для получения протеина А) 173
- Adamovich S.N., Fedoseyev A.P., Kibort R.V., Mirskov R.G., Mirskova A.N. Prospective growth stimulators of bacterial mass of *Staphylococcus aureus* (to produce protein A)
- Алешкин В.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Мазурова И.К. Особенности генотипической изменчивости штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России 177
- Aleshkin V.A., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Mazurova I.K. Features of genotyping variability of strains of *Bordetella pertussis* allocated from patients with whooping cough in Russia
- Анганова Е.В., Савилов Е.Д., Чemezova Н.Н., Духанкина А.В. Характеристика условно-патогенных бактерий микробного сообщества реки Лены по степени доминирования и видовому разнообразию 184
- Anganova E.V., Savilov E.D., Chemezova N.N., Duhkanina A.V. Characteristics of opportunistic bacteria of microbial communities of the Lena river on the degree of dominance and diversity
- Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Каретникова Э.С., Атлас А.Г., Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Гефан Н.Г., Баранникова Н.Л. Изучение и испытание экспериментально-производственных серий поливалентной бруцеллезной сыворотки 187
- Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Karetnikova E.S., Atlas A.G., Mikhailov L.M., Kalinovskiy A.I., Gefan N.G., Barannikova N.L. Examination and testing of experimental-production series of polyvalent brucellosis serum
- Базанова Л.П., Никитин А.Я. Особенности формирования биопленки у чумного микроба в организме блохи *Citellophilus tesquorum altaicus* 190
- Bazanova L.P., Nikitin A.Ya. Features of *Yersinia pestis* biofilm formation in *Citellophilus tesquorum altaicus* flea
- Бархутова Д.Д., Дармаева Б.В., Намсараев Б.Б. Санитарно-микробиологическая оценка холодных аршанов и горячих минеральных источников Прибайкалья 193
- Barkhutova D.D., Darmayeva B.V., Namsarayev B.B. Sanitary and microbiological assessment of cold and hot mineral springs of Pribaikalye
- Генералов С.В., Киреев М.Н., Абрамова Е.Г., Лобовикова О.А. Оптимизация метода газовой хроматографии для контроля остаточного этанола в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина 197
- Generalov S.V., Kireyev M.N., Abramova E.G., Lobovikova O.A. Gas chromatography technique optimization for checking residual ethanol in the preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin
- Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Нижегородцев С.А., Корсуков В.Н. Новый способ получения комплекса ферментов холерного вибриона — протеовибрина с помощью ультрафильтрации 201
- Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Nizhegorodtsev S.A., Korsukov V.N. New way of isolation of enzyme complex of cholera vibrio — proteovibrin by means of ultrafiltration
- Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В., Шобоева Р.С., Ханхареєв С.С., Абмэд Д., Батаа Ж., Цэрэнноров Д., Отгонбаатор Д. Распространение клещевых инфекций в бассейне р. Селенга на территории республик Бурятия и Монголия 206
- Danchinova G.A., Khasnatinov M.A., Arbatskaya E.V., Shoboyeva R.S., Khankhareyev S.S., Abmed D., Bataa J., Tserennorov D., Otgonbaatar D. The spread of the tick-borne infections in the basin of Selenga river in Buryatia and Mongolia
- Джигоев Ю.П., Юринова Г.В., Сухов Б.Г., Попкова С.М., Ганенко Т.В., Погодаева Н.Н., Васильева Д.К., Ракова Е.Б., Сафронова Л.А., Подгорский В.С., Трофимов Б.А. Гемиселлюлозы
- Dzhioev Yu.P., Yurina G.V., Sukhov B.G., Popkova S.M., Ganenko T.V., Pogodaeva N.N., Vasiljeva D.K., Rakova E.B., Safronova L.A., Podgorskij V.S., Trofimov B.A. Hemitsellyuloza and their

- и их нанобиокомпозиаты — перспективные наноструктурированные синбиотики 210
Dzhioyev Yu.P., Revizor A.O., Yahnenko V.M., Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Suntsova O.V., Chernouvanova O.O., Paramonov A.I. Изоферментная структура популяций клещей *Ixodes persulcatus* Schulze (acari: Ixodidae) в рекреационных зонах г. Иркутска 213
Dolgikh V.V., Rychkova L.V., Polyakov V.M., Bugun O.V., Rodionova A.N., Davidov A.V. Некоторые аспекты состояния здоровья одаренных школьников 217
Zhulidov I.M., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shulgina I.V., Zaitseva L.V., Mironova N.P., Vakhrushina N.I., Astafieva S.V., Pavlova V.I., Bronnikova V.S., Volokh O.A., Avdeyeva N.G., Bazlov G.V., Komissarov A.V. Новая питательная среда на основе сухого гидролизата фибрина для культивирования холерных вибрионов 220
Zaykovskaya A.V., Leonov S.A., Yushkov Yu.G., Rassadkin Yu.N., Shestopalov A.M. Показатели летальности при экспериментальной и естественной инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа H5N1 224
Kireyev M.N., Gooseva N.P., Polunina T.A., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Sharapova N.A., Taranenko T.M. Влияние наночастиц коллоидного серебра на иммунобиологические свойства капсульного антигена чумного микроба 228
Kozlova I.V., Verkhovina M.M., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Borisov V.A., Tuvakov M.K., Karan L.S., Tkachev S.E., Dzhioyev Yu.P. Результаты генотипирования штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия 231
Kochkalova N.N., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireyev M.N., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Badarin S.A., Generalov S.V., Kostyleva N.I., Sharapova N.A., Ivanov Yu.V. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади 236
Kryukova N.F., Adamovich S.N., Mirskova A.N., Anganova E.V. Стимуляторы роста стафилококка для ускоренной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи 239
Kulakova N.V., Bolotova T.A., Khasnatinov M.A., Belikov S.I. Генетическая идентификация и филогенетическое положение клещей рода *Dermacentor* в Иркутской области 243
Kutyrev I.A., Biserova N.M., Sharsack J.P., Kurtz J. Простагландин E₂ как потенциальный иммуномодулятор лентеца чаечного 245
Lakhtin M.V., Bayrakova A.L., Lakhtin V.M., Aleshkin A.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. Кофункционирование лектинов мультикомпонентного пробиотика и потенциального пробиотического компартмента биотопа на примере ауторегуляторной лактобациллярной системы 250
nanobiocomposites — perspective nanostructured sinbiotics
Dzhioyev Yu.P., Revizor A.O., Yahnenko V.M., Kozlova I.V., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Suntsova O.V., Chernouvanova O.O., Paramonov A.I. Isoenzyme structure of populations of ticks *Ixodes persulcatus* Schulze (acari: Ixodidae) in recreation areas of Irkutsk city
Dolgikh V.V., Rychkova L.V., Polyakov V.M., Bugun O.V., Rodionova A.N., Davidov A.V. Some aspects of the health status of gifted school children
Zhulidov I.M., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Shulgina I.V., Zaitseva L.V., Mironova N.P., Vakhrushina N.I., Astafieva S.V., Pavlova V.I., Bronnikova V.S., Volokh O.A., Avdeyeva N.G., Bazlov G.V., Komissarov A.V. New nutrient medium on the basis of dry fibrin hydrolysate for *V. cholerae* cultivation
Zaykovskaya A.V., Leonov S.A., Yushkov Yu.G., Rassadkin Yu.N., Shestopalov A.M. Mortality in experimental and natural infection caused by highly pathogenic influenza virus H5N1
Kireyev M.N., Gooseva N.P., Polunina T.A., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Sharapova N.A., Taranenko T.M. The influence of colloid silver nano-particles upon immunobiologic properties of plague microbe capsular antigen
Kozlova I.V., Verkhovina M.M., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Borisov V.A., Tuvakov M.K., Karan L.S., Tkachev S.E., Dzhioyev Yu.P. Results of genotyping of strains and RNA isolates of tick-borne encephalitis virus isolated from sick people in Irkutsk region and Buryat Republic
Kochkalova N.N., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireyev M.N., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Badarin S.A., Generalov S.V., Kostyleva N.I., Sharapova N.A., Ivanov Yu.V. Optimization of presentation and consumer container of anti-rabies immunoglobulin obtained from horse serum
Kryukova N.F., Adamovich S.N., Mirskova A.N., Anganova E.V. Staphylococcus, stimulators of growth for rapid diagnosis of healthcare-associated infections
Kulakova N.V., Bolotova T.A., Khasnatinov M.A., Belikov S.I. Genetic identification and phylogenetic relationships of *Dermacentor sp.* ticks in Irkutsk region
Kutyrev I.A., Biserova N.M., Sharsack J.P., Kurtz J. Prostaglandin E₂ as gull tapeworm potential immunomodulator
Lakhtin M.V., Bayrakova A.L., Lakhtin V.M., Aleshkin A.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. Co-functioning of lectins of multicomponent probiotic and potential probiotic compartment of biotope on the example of autoregulator *Lactobacillus* system

- Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Лахтин В.М., Алешкин В.А. Прогнозирование выживания и гибели ассоциатов микробных патогенов в присутствии лектинов пробиотических бактерий: значение для терапии 254
- Лахтин М.В., Лахтин В.М., Алешкин А.В., Афанасьев С.С., Кулакова Ю.В., Беликова Е.В., Агапова Ю.В. Экзополимеры пробиотических лактобацилл и бифидобактерий (новые подходы и свойства) 257
- Мазур О.Е., Фомина А.С. Состав и зараженность промежуточных и дефинитивных хозяев *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1858) в бассейне озера Байкал (республика Бурятия) 262
- Мазур О.Е., Толочко Л.В. Гематологический анализ состояния здоровья байкальского омуля в нерестовый период на фоне инвазии *Diphyllbothrium dendriticum* (cestoda: Pseudophyllidae) 265
- Маркова Ю.А., Духанина А.В., Анганова Е.В., Беловежец Л.А., Савилов Е.Д. Контаминация продуктов питания растительного происхождения патогенными и условно-патогенными энтеробактериями 268
- Марченко В.Ю., Шаршов К.А., Шестопалов А.М. Экология вируса гриппа в популяциях диких птиц Центральной Азии 271
- Мирскова А.Н., Агамович С.Н., Виноградов Е.Я., Мирсков Р.Г. Стимуляторы роста менингококка для диагностики менингита на основе солей 2-гидроксикалциаминов 276
- Никитин А.Я., Зверева Т.В., Гордейко Н.С., Борисенко Е.А., Вержуцкая Ю.А., Каменева Т.А. Структура сообществ иксодовых клещей в континентальной части юга Приморского края и на острове Русский 281
- Никифоров А.К., Киреев М.Н., Громова О.В., Комиссаров А.В., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А., Гаева А.В., Захарова Т.Л., Павлова В.И. Исследование свойств протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569B Инаба, полученных на производственных и разработанном биореакторах и по усовершенствованной технологии 284
- Попкова С.М., Ракова Е.Б., Кичигина Е.Л., Немченко У.М., Джиоев Ю.П. Микроэкологический пейзаж различных биотопов у детей Иркутской области 288
- Примак Т.Д., Шевчук Е.А., Мельникова С.Л. Изменение биологических свойств условно-патогенного стафилококка под влиянием отрицательных аэроионов 293
- Пронин Н.М., Пронина С.В., Амагзаева Г.С., Бужгеева А.А., Базарова Т.Б., Молчанов А.В. Динамика зараженности селенгинской популяции омуля *Coregonus migratorius* (Coregonidae) плероцеркоидами *Diphyllbothrium dendriticum* и заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия 296
- Ракова Е.Б., Попкова С.М., Немченко, Шабанова, Бухарова Е.В. Региональные особенности антагонистической активности бифидобактерий
- Lakhtin M.V., Afanasiev S.S., Lakhtin V.M., Aleshkin V.A. Predicting survival and death of microbial pathogen associates in the presence of lectins of probiotics: Significance for therapy
- Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Aleshkin A.V., Afanasiev S.S., Kulakova Y.V., Belikova Y.V., Agapova Y.V. Exopolymers of probiotic lactobacilli and bifidobacteria (new approaches and features)
- Mazur O.E., Fomina A.S. Composition and infection of intermediate and definitive hosts of *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1858) in basin of lake Baikal (Buryatia)
- Masur O.E., Tolochko L.V. Hematological analysis of the health status of the Baikal omul in the spawning season against invasion *Diphyllbothrium dendriticum* (cestoda: Pseudophyllidae)
- Markova Yu.A., Duhanina A.V., Anganova E.V., Beloveshets L.A., Savilov E.D. Contamination of phylogenetic foods with pathogenic and opportunistic enterobacteria
- Marchenko V.Yu., Sharshov K.A., Shestopalov A.M. Ecology of influenza virus in wild bird populations in Central Asia
- Mirskova A.N., Adamovich S.N., Vinogradov E.Ya., Mirskov R.G. Meningococcus growth stimulators for meningitis diagnostics based on 2-hydroxylalkylamine salts
- Nikitin A.Ya., Zvereva T.V., Gordeiko N.S., Borisenko E.A., Verzhutskaya Yu.A., Kameneva T.A. Structure of Ixodes tick communities at the continental part of south Primorye territory and Russian Island
- Nikiforov A.K., Kireyev M.N., Gromova O.V., Komissarov A.V., Yeriomin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A., Gayeva A.V., Zakharova T.L., Pavlova V.I. Evaluation of *Vibrio cholerae* 569B Inaba protective antigens, derived on industrial and developed bioreactors as well as by improved technology
- Popkova S.M., Rakova E.B., Kichigina E.L., Nemchenko U.M., Dzhioyev Yu.P. Microecological landscape of different biotopes in children living in Irkutsk region
- Primak T.D., Shevchuk E.A., Melnikova S.L. Variance of biological properties of opportunistic staphylococcus under negative aero ions influence
- Pronin N.M., Pronina S.V., Amagzayeva G.S., Buzgeyeva A.A., Bazarova T.B., Molchanov A.D. Dynamics of *Coregonus migratorius* (Coregonidae) Selenga population contamination with *Diphyllbothrium dendriticum* and diphyllbothriosis morbidity in Buryatia Republic
- Rakova E.B., Popkova S.M., Nemchenko U.M., Shabanova N.M., Bukharova E.V. Regional features of bifidobacteria antagonistic activity

кишечной микробиоты детей, проживающих в условиях Сибири	300	in intestinal microbiota of children living in Siberia
Савченко А.П., Карпова Н.В., Савченко П.А., Андреев С.О. Иммунологический мониторинг распространения вирусов гриппа а субтипов H5 и H7 на юге центральной Сибири	304	Savchenko A.P., Karpova N.V., Savchenko P.A., Andreyev S.O. Immunological monitoring of the influenza virus a subtype H5 and H7 distribution in south of Central Siberia
Савченко А.П., Емельянов В.И., Савченко П.А., Андреев С.О., Савченко И.А., Карпова Н.В., Темерова В.Л. О циркуляции вирусов гриппа а и падеже птиц на юге центральной Сибири	310	Savchenko A.P., Emelyanov V.I., Savchenko P.A., Andreyev S.O., Savchenko I.A., Karpova N.V., Temerova V.L. About the circulation of influenza virus a and the deaths of birds in south of Central Siberia
Сайфутдинова С.Г., Шаршов К.А., Герасимов Ю.Н., Шестопалов А.М. Экология вируса гриппа у чаек Дальнего Востока России	316	Sayfutdinova S.G., Sharshov K.A., Gerasimov Yu. N., Shestopalov A.M. Ecology of influenza a viruses, isolated from gulls of the Russian Far East
Сивай М.В., Юрлов А.К., Друзяка А.В., Шаршов К.А., Шестопалов А.М. Уникальные варианты вируса гриппа у птиц юга Западной Сибири	319	Sivay M.V., Yurlov A.K., Druzyaka A.V., Sharshov K.A., Shestopalov A.M. Rare influenza virus subtypes isolated from birds of the south of Western Siberia
Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Наноструктурированные многофункциональные биополимеры и нанобиокомпозиты на их основе для диагностики и терапии	323	Sukhov B.G., Trofimov B.A. The nanostructured multipurpose biopolymers and nanobiocomposites on their basis for diagnostics and therapy
Ткачев С.Е., Ливанова Н.Н. Разработка системы молекулярного видотипирования клещей <i>Ixodes persulcatus</i> и <i>Ixodes pavlovskyi</i>	325	Tkachiov S.E., Livanova N.N. The development of molecular species typing system for <i>Ixodes persulcatus</i> and <i>Ixodes pavlovskyi</i> ticks
Фомина А.С., Мазур О.Е., Пронин Н.М. <i>Quinqueserialis quinqueserialis</i> — специфичный паразит ондатры, и его влияние на некоторые гематологические параметры хозяина	328	Fomina A.S., Mazur O.E., Pronin N.M. <i>Quinqueserialis quinqueserialis</i> — specific parasite of muskrat, and its influence on some hematologic parameters of the host
Хаснашинов М.А., Хавликова С., Таплин Э., Казимирова М., Гунавардане Н., Словак М., Клемпа Б., Джоунс И.М., Лабуда М., Гоулд Э.А., Грицун Т.С. Роль структурных белков вируса клещевого энцефалита в осуществлении неvirемической трансмиссии вируса между клещами	331	Khasnatinov M.A., Sabina Havlikova, Andrew Tuplin, Maria Kazimirova, Niluka Goonavardane, Mirco Slovak, Boris Klempa, Ian M. Jones, Milan Labuda, Ernest A. Gould, Tamara S. Gritsun. The role of the structural proteins in the non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus
Цыренова Д.Д., Бархутова Д.Д., Гаранкина В.П., Намсараев Б.Б. Микробиологическая оценка качества воды озера Котокельское и способ его очистки	335	Tsyrenova D.D., Barkhutova D.D., Garankina V.P., Namsarayev B.B. Microbiological assessment of water quality of lake Kotokelskoe and method of its purification
Чапоргина Е.А., Данчинова Г.А., Хаснашинов М.А., Ляпунов А.В., Пыжьянов С.В., Арбатская Е.В. Распространение арбовирусов и вирусов гриппа в Прибайкалье	340	Tchaporgina E.A., Danchinova G.A., Khasnatinov M.A., Liapunov A.V., Pyzhjanov S.V., Arbatskaya E.V. Circulation of arboviruses and influenza virus in Pribaikalye
Чхенкели В.А., Анисимова А.В., Горяева Н.А. Мониторинг бактериальных агентов — этиологических факторов массовых желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственной птицы	343	Chkhenkeli V.A., Anisimova A.V., Goryaeva N.A. Monitoring of bacterial agents — etiological factors of mass gastro-intestinal diseases of young poultry
Шарапова Н.А., Киреев М.Н., Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Савицкая Л.В., Гаева А.В., Никифоров А.К. Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» и конструирование на его основе диагностикума для дот-иммуноанализа	347	Sharapova N.A., Kireyev M.N., Abramova E.G., Generalov S.V., Matveyeva Zh.V., Zhulidov I.M., Tereshkina N.E., Mikheyeva E.A., Savitskaya L.V., Gayeva A.V., Nikiforov A.K. Isolation of glycoprotein from the fixed rabies virus, strain «Moscow 3253», and constructing of dot-immunoassay diagnosticum on its basis
Яшина Л.Н., Абрамов С.А., Данчинова Г.Н., Гуторов В.В., Янагихара Р. Хантавирус Seewis (SWSV) и его природные носители на территории Сибири	351	Yashina L.N., Abramov S.A., Danchinova G.A., Yanagihara R. Hantavirus Seewis and reservoir species in Siberia

Организация здравоохранения

- Амагзаева Г.С., Хахаева И.Б., Хангажеева А.А., Мункуева Д.Г. Эпидемиологический надзор за вирусным гепатитом А на территории Республики Бурятия 356
- Вишняков В.А., Носков А.К. Санитарная охрана территории субъекта Российской Федерации. Сообщение 1. Принципы дифференцированного подхода к организации мероприятий по санитарной охране территории на уровне муниципальных районов 360
- Каримова Т.В., Фомина Л.Н., Малявин В.Г., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Опочинский Э.Ф. Современные методы лабораторных исследований при проведении эпидемиологического мониторинга за иерсиниозами в Новосибирской области. Система управления качеством 363
- Корецкая Н.М., Наркевич А.Н., Носова Л.Г. Своевременность выявления туберкулеза легких и факторы, на нее влияющие 368
- Коровин С.А., Кулеш Д.В., Хаптанова В.А., Ильин В.П., Черкашина А.Г., Лебедева Л.Н. Динамика показателей заболеваемости населения г. Иркутска в период социально-экономических реформ 372
- Николаева С.В. Эффективность лечения больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий в Республике Бурятия 375

Обзоры литературы

- Охашаи Н., Йошикава Й., Масузава Т. Обзор бактерий порядка Rickettsiales, ассоциированных с иксодовыми клещами в Японии 379
- Лакхтин В.М., Алешкин А.В., Лакхтин М.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Бактериофаги и молочнокислые бактерии. Обзор 382
- Миндолина Е.В. Занос и распространение вируса гриппа птиц H5N1 в мире 386
- Шаракшанов М.Б., Бренева Н.В., Носков А.К., Киселева Е.Ю., Косилко С.А., Шкаруба Т.Т., Чеснокова М.В. Современные тенденции распространения лептоспироза за рубежом 389
- Шаршов К.А., Марченко В.Ю., Юрлов А.К., Шестопалов А.М. Экология и эволюция высокопатогенного вируса гриппа H5N1 в России (2005 – 2012 гг.) 393

Информация

- VIII Байкальская научно-практическая конференция «Психосоматические и соматоформные расстройства в клинической практике» 397
- Правила оформления статей в «Бюллетень ВСНЦ СО РАМН» 398

Organization of public health service

- Amagzayeva G.S., Khakhayeva I.B., Khangazeyeva A.A., Munkuyeva D.G. Epidemiological surveillance of viral hepatitis A on the territory of the Republic of Buryatia
- Vishnyakov V.A., Noskov A.K. Sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Report 1. The principles of differentiated approach to the organization of activities of the sanitary protection of the territory at the level of municipalities
- Karimova T.V., Fomina L.N., Malyavin V.G., Chesnokova M.V., Klimov V.T., OPOCHINSKY E.F. Modern methods of laboratory researches in epidemiological monitoring of yersiniosis in Novosibirsk region. Quality control system
- Koretskaya N.M., Narkevich A.N., Nosova L.G. Timely detection of pulmonary tuberculosis and influencing factors
- Korovin S.A., Kulesh D.V., Haptanova V.A., Ilin V.P., Cherkashina A.G., Lebedeva L.N. Dynamics of morbidity of population in Irkutsk between during socio-economic reforms
- Nikolayeva S.V. Effective management of pulmonary tuberculosis complicated with mycobacterial drug resistance in the Republic of Buryatia

Reviews of literature

- Ohashi N., Yoshikawa Y., Masuzawa T. Overview of tick-associated rickettsiales bacteria in Japan
- Lakhtin V.M., Aleshkin A.V., Lakhtin M.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. Bacteriophages and lactic acid bacteria. Literature review
- Mindolina E. Mole and spreading of avian influenza virus H5N1 in the World
- Sharakshanov M.B., Breneva N.V., Noskov A.K., Kiseliyova E.Yu., Kosilko S.A., Shkaruba T.T., Chesnokova M.V. Modern trends of the spreading leptospirosis overseas
- Sharshov K.A., Marchenko V.Yu., Yurlov A.K., Shestopalov A.M. Ecology and evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 in Russia (2005 – 2012)

Information

- VIII Baikal scientific-practical conference "Psychosomatic and somatoform disorders in clinical practice"
- Rules of publication of articles in «Bulletin ESSC SB RAMS»

ПЕРЕДОВАЯ СТАТЬЯ

УДК 616.98.92

Л.И. Колесникова, Д.В. Кулеш, В.М. Коган

ИНСТИТУТУ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН 100 ЛЕТ

Институт эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (Иркутск)

В статье излагается история создания Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, развития научных исследований и помощь практическому здравоохранению региона Восточной Сибири на протяжении 100 лет его существования.

Ключевые слова: история института, эпидемиология, микробиология

100-YEARS ANNIVERSARY OF THE INSTITUTE OF EPIDEMIOLOGY AND MICROBIOLOGY

L.I. Kolesnikova, D.V. Kulesh, V.M. Kogan

Scientific center of family health and human reproduction problems SB RAMS, Irkutsk

This paper is about 100 years history of the Institute of the epidemiology and microbiology (Irkutsk), development of scientific researches and practical help to the public health.

Key words: Institute's history, epidemiology, microbiology

НИИ эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН является старейшим научно-исследовательским учреждением Сибири и в 2012 г. отмечает свое столетие.

Институт основан на базе химико-бактериологической лаборатории, открытой в г. Иркутске в феврале 1912 г. согласно постановлению Общества врачей Восточной Сибири от 25 августа 1911 г. Необходимость создания такого учреждения в начале 20 века была обусловлена серьезными санитарными и эпидемиологическими осложнениями в регионе и отсутствием в то время в структуре медицинской службы лабораторной базы, способной решать вопросы диагностики и профилактики инфекционных заболеваний.

Первым официальным руководителем лаборатории в июле 1917 г. был назначен О.И. Бронштейн. В сферу деятельности лаборатории вошло проведение медико-диагностических исследований (физико-химических, бактериологических, патолого-гистологических), а впоследствии — санитарно-гигиенических и теххимических. Штат лаборатории увеличился и Обществом врачей был принят проект создания на ее базе Химико-бактериологического института (Химбактин) с целью расширения производства лечебных сывороток и вакцин. Уже в 1918 г. Химико-бактериологический институт начал производство оспенного детрита, тетравакцины, антитиреоидина и др. препаратов для обширных территорий Сибири и Дальнего Востока, что привело к значительному снижению

актуальных для того времени инфекционных заболеваний.

В 1918 г. в Институт влилась городская санитарная станция, а в 1919 г. со стороны губернского отдела здравоохранения (Губздрави) Обществу врачей Восточной Сибири поступило предложение передать Институт в собственность государства. Национализированный 20 февраля 1920 г. Химбактин получил в свое распоряжение просторную усадьбу с двухэтажным каменным зданием и надворными постройками, в которой Институт размещается и в настоящее время.

На базе Института с первых лет его существования было развернуто производство бактериальных препаратов для обширных территорий Сибири и Дальнего Востока, таких как оспенный детрит, тетравакцина, антитиреоидин и др.

В 1930 г. Иркутский Химбактин был переименован в Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии (ИЭМ) и передан в ведение Наркомздрава РСФСР.

В 1931 г. на базе непроизводственных отделов организован эпидемиологический сектор, задачей которого стало изучение уровня, динамики и структуры инфекционной заболеваемости, организационно-методическая и практическая помощь органам здравоохранения. В этот период Институт занимался систематическим изучением эпидемиологической ситуации в курируемом регионе, что позволило разработать карты географического распространения инфекционных заболеваний по Восточной Сибири за период 1931 — 1934 гг.,

постоянно оказывалась консультативная помощь органам здравоохранения по вопросам практической эпидемиологии, внедрению методов ранней диагностики, участию в составлении противоэпидемических планов, разработке инструкций противозэпидемического характера и т.д.

Необходимо отметить, что ИЭМ стал основой для формирования многих противозэпидемических учреждений Восточно-Сибирского региона. Так, в 1938 г. с участием сотрудников института была организована городская бактериологическая лаборатория и две лаборатории в Маратовской и детской больницах, несколько позже формируется бактериологическая лаборатория по исследованию воды при городском водопроводе. Кроме создания вышеупомянутых бактериологических лабораторий, одним из наиболее важных событий явилось выделение из состава Института в 1934 г. существовавшего в его структуре с 1923 г. противочумного отдела (заведующий — профессор А.М. Скородумов) и создание на его основе Научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. В этом же году из состава Института выделились и обрели самостоятельность краевая малярийная и бруцеллезная станции.

Содержание и объем научной деятельности Института за все годы его существования определялись запросами медицинских служб и общей социальной и эпидемиологической обстановкой. В начальном периоде становления (1912—1922 гг.) преобладали работы по вопросам лабораторной диагностики инфекционных заболеваний и технологии выпуска бактериальных препаратов. В 30-х годах возрастает количество работ по краевой эпидемиологии и паразитологии.

Важной вехой структурных и научных преобразований института были годы Великой Отечественной войны. В трудных условиях войны, при массовых передвижениях людей гражданского населения и войсковых частей надо было уберечь тыл от вспышек инфекционных заболеваний.

С первого года войны на институт были возложены огромные задачи, для разрешения которых потребовалось расширение производственных мощностей. Особенно большой реконструкции и расширению было подвергнуто сывороточное производство, выпускающее препараты, которые шли на нужды фронта.

Уже в 1942 г. производственный план по тривакцине увеличился по сравнению с довоенным годом в 4 раза, значительно возрастал из года в год план выпуска дизентерийных таблеток и бактериофага. В 1943 г. начался выпуск дизентерийной подкожной вакцины, сухого дизентерийного бактериофага и пентавакцины.

Ведущим в годы Великой Отечественной войны был анаэробный отдел, который в 1938 г. выделился из сывороточного отдела. В этом отделе производились противостолбнячная, антиперфрингенс и антиадемантис сыворотки, в последующие годы были освоены еще два вида сывороток против газовой гангрены — антивибрион-септик и анти-

гистолитикус, а также столбнячный анатоксин. В 1942 г. была освоена и широко выпускалась поливалентная гангренозная сыворотка. В этом же году с помощью областных партийных и советских организаций анаэробный отдел резко расширил производственные помещения и увеличил выпуск оборонной продукции.

В условиях военного времени актуальнейшее значение имели вопросы, связанные с раневыми инфекциями. Исходя из этого, в 1942 г. в институте была организована новая научная лаборатория раневых инфекций, руководил которой И.Н. Моргунов.

Несмотря на огромные трудности и тяжелый труд по производству и обеспечению бактериальными препаратами фронтовых и тыловых учреждений и на то, что Институт превратился в фабрику по производству бакпрепаратов, сотрудники активно выполняли научно-исследовательскую работу в области эпидемиологии и микробиологии. Всего в 1942 г. в институте выполнялось 12 научных тем, систематически проводились научные конференции, работала научная библиотека, семинары по изучению иностранных языков, выполнялись диссертационные работы. Научным консультантом работал профессор В.А. Елин, эвакуированный из г. Одессы. В 1942 г. выходит в печать сборник научных трудов института «Выпуск — 3», значительную часть работ которого составили статьи по актуальным для военного времени инфекциям. В 1943 г. состоялись первые защиты кандидатских диссертаций, выполненных на собственной базе.

В 1942 г. в связи с 30-летием создания Института Народный Комиссариат Здравоохранения СССР приказом № 134-Н от 10.12.42 г. объявил всему коллективу института благодарность и наградил 7 сотрудников знаком «Отличнику здравоохранения». Работа Института в 1942 г. была отмечена Санитарным управлением Красной Армии, которое объявило всему коллективу института благодарность. Руководство институтом в военные и ранние послевоенные годы было возложено на Б.И. Мирского (1941—1943 гг.), Р.М. Бункус (1943—1952 гг.).

За работу в период Великой Отечественной войны руководящий состав и многие рядовые сотрудники были награждены грамотами Иркутского областного совета депутатов трудящихся и благодарностями, к награде медалью «За доблестный труд» был представлен 91 работник института.

Уже с 1943 г. началось оживление научно-исследовательской работы, состоялись первые защиты кандидатских диссертаций. В 1959 г. заметно увеличилось количество научных публикаций, возобновилось издание сборников научных трудов (первый сборник вышел в свет в 1924 г.). Институт пополнился рядом высококвалифицированных научных сотрудников. Это позволило расширить тематику и, соответственно, структуру Института по наиболее приоритетным направлениям. В составе эпидемиологического отдела сформировались лаборатории кишечных инфекций, респираторных

бактериальных и вирусных инфекций, начаты работы по проблеме инфекционных гепатитов.

В эти годы значительно увеличивает свою мощность и производственный отдел, осваивается производство различных модификаций иммуноглобулина и других препаратов крови (фибринолизин, альбумин и др.), начинается выпуск инактивированной очищенной гриппозной вакцины. В 1959 г. производственный отдел выделяется в самостоятельное предприятие по производству препаратов крови, огромный вклад в развитие которого внесли и А.С. Гельфанд и С.И. Брызгалова.

В 1956 г. в связи с интенсивным освоением новых обширных территорий Сибири, в Институте создается отдел природно-очаговых инфекций. Проводятся широкомасштабные обследовательские и лабораторные работы по расшифровке заболеваемости, распространенности и структуре очагов клещевого энцефалита, клещевого сыпного тифа, Ку-лихорадки, лептоспирозов и токсоплазмоза, выполняемые под руководством таких ученых как к.м.н. А.А. Васенин и д.м.н., профессор О.З. Горин. Сотрудники Института принимали активное участие в исследованиях, направленных на предупреждение возникновения вспышек инфекций в зоне сооружения Братской ГЭС.

В 1961 г. в Институте создана лаборатория тканевых культур, применение которых позволило значительно улучшить уровень и возможности диагностических и экспериментальных вирусологических исследований.

К середине 60-х годов сформировавшиеся основные направления — природно-очаговые инфекции и некоторые актуальные для региона антропонозные инфекции становятся приоритетными.

За период с конца 60-х до середины 80-х годов проведена обширная и разнообразная работа по изучению региональных особенностей эпидемического процесса респираторных, кишечных и природно-очаговых инфекций. Изучение природно-очаговых инфекций позволило дать обстоятельную характеристику очаговости клещевого энцефалита, риккетсиозов, лептоспирозов и подготовить практические рекомендации по диагностике и профилактике этих заболеваний.

Необходимо отметить, что ученые Института внесли существенный вклад в изучение эпидемиологической обстановки и обеспечение эпидблагополучия в ходе строительства Байкало-Амурской магистрали (70—80 годы), при этом основное внимание было уделено природно-очаговым инфекциям. Основными задачами исследования по природно-очаговым инфекциям было выявление территорий риска и перспектив их эпидемиологического проявления, оценка антропогенного воздействия на биоценозы в целом и их отдельные компоненты, разработка методических принципов составления эпидемиологических прогнозов как основы обеспечения эпидемиологического благополучия в будущем.

В 1987 г. в результате создания в г. Иркутске Восточно-Сибирского филиала СО АМН СССР

Институт вошел в его состав и с этого времени начинается новая важная страница в жизни Иркутского ИЭМ. Приобретение академического статуса было воспринято коллективом не только и не столько как почетное звание, но как обязанность высоко держать марку Института, активно развивать фундаментальные исследования, работать на современном уровне. Переход в новое качество позволил сосредоточить внимание научных сотрудников на изучении наиболее важных в современных условиях проблем эпидемиологии и микробиологии.

В 1988 г. производственный отдел института выделяется в самостоятельное учреждение — предприятие по производству бактериальных препаратов, которое с 2003 г. входит в состав Научно-производственного объединения по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», являющимся крупнейшим предприятием российской медицинской промышленности и лидером в разработке и производстве медицинских иммунобиологических препаратов, диагностических и лекарственных средств.

В 1998 г. Институт вошел в состав Государственного учреждения Научный центр медицинской экологии ВСНЦ СО РАМН, необходимость создания которого была обусловлена концентрацией усилий ученых на изучении экологических особенностей нарушения здоровья населения Восточной Сибири, в том числе, вызванных инфекционной патологией.

На базе сложившихся традиций, освоения и внедрения новейших научных технологий, включая методы генетики и молекулярной биологии, молекулярной эпидемиологии, математической статистики и компьютерного анализа, в Институте сложилось два крупных раздела научных исследований, которые можно озаглавить как «Подходы к управлению инфекционной заболеваемостью в условиях техногенного загрязнения окружающей среды» и «Природно-очаговые инфекции в условиях антропогенной трансформации естественных ландшафтов Сибири», на базе которых сформировались научные школы.

Научное направление школы Заслуженного деятеля науки РФ, д.м.н., профессора Е.Д. Савилова по изучению эпидемиологических и клинических особенностей инфекционной патологии и управлению инфекционной заболеваемостью в условиях техногенного загрязнения окружающей среды стало приоритетным не только для региона Восточной Сибири, но и России в целом.

Основные достижения многолетних исследований в указанном направлении можно охарактеризовать следующим образом:

- Техногенное загрязнение окружающей среды является самостоятельным фактором риска в развитии инфекционного и эпидемического процессов.
- На организменном уровне техногенное загрязнение окружающей среды приводит к утяжелению клинического течения инфекционного процесса, большей его длительности, к более

частому развитию осложнений, хронизации процесса, увеличению сопутствующих заболеваний и удлинению сроков реконвалесценции.

- Опосредованное влияние техногенного загрязнения окружающей среды на инфекционную заболеваемость проявляется, прежде всего, в период минимального развития эпидемического процесса, т.е. в период, когда инфекционная заболеваемость наиболее стабильна.

- Наиболее «уязвимыми» в развитии эпидемического процесса являются межсезонный и межэпидемический периоды, поэтому при управлении эпидемическим процессом, в частности при планировании профилактических мероприятий, необходимо учитывать сезонные и (или) циклические проявления инфекционной заболеваемости.

- Техногенное загрязнение окружающей среды снижает иммунологическую и эпидемиологическую эффективность вакцинопрофилактики. У детей школьного возраста в экологически неблагоприятных условиях уровень коллективного иммунитета ко всем изученным управляемым инфекциям оказался достоверно ниже, чем в группе сравнения.

Практическое значение результатов этих исследований реализуется в совершенствовании системы профилактических и противоэпидемических мероприятий с учетом особенностей проявления эпидемического и инфекционных процессов на территориях экологического прессинга. Особое значение имеют результаты по изучению особенностей вакцинопрофилактики, которые могут лечь в основу изменения календаря прививок, прежде всего, детского населения.

Научная школа Молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики трансмиссивных природно-очаговых инфекций создана академиком РАМН В.И. Злобиным, возглавлявшим институт на протяжении 15 лет (1988 – 2002 гг.).

Изучение генетического разнообразия возбудителей природно-очаговых инфекций, актуальных для Восточной Сибири, является одним из важнейших научных направлений института, при этом особое внимание уделялось проблеме клещевого энцефалита. Полученные в институте результаты являются приоритетными.

В рамках выполнения данных исследований сконструированы эффективные молекулярные зонды, позволяющие изучать генетическую вариабельность вируса клещевого энцефалита по всему геному, включая гены структурных (С, М, Е) и неструктурных (NS1-NS5) белков. С помощью этих зондов получена новая информация о генетической вариабельности и географическом распространении штаммов вируса клещевого энцефалита, относящихся к разным генотипам (восточному, западному, урало-сибирскому) на территории Евразии.

Эти данные имеют большое значение для понимания эволюции и изменчивости вируса, патоморфоза заболевания, совершенствования диагностики, профилактики и лечения в условиях

существенного роста заболеваемости клещевым энцефалитом, особенно на территории Сибири.

Достижения последних лет в области медицинской биотехнологии открыли возможность для широкого применения молекулярно-генетических методов, в том числе ПЦР. С помощью ПЦР были получены достоверные данные о циркуляции на территории Иркутской области двух генотипов боррелий — *B. garinii* и *B. afzelii* и доказательства их участия в развитии иксодовых клещевых боррелиозов в Прибайкалье.

В последние годы существенно изменились представления о распространении, таксономии и экологии риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). В различных регионах мира обнаружен целый ряд новых риккетсий, в том числе с неустановленной патогенностью для человека. В связи с этим представляло интерес изучение генетического разнообразия риккетсий, циркулирующих на территории Прибайкалья.

Была исследована генетическая вариабельность риккетсий, инфицирующих популяции иксодовых клещей на территории Иркутской области. Кроме *R. sibirica*, выявлена циркуляция риккетсий новых генотипов: риккетсии групп *DnS14* и *DnS28*, *R. raoultii*, *Candidatus R. tarasevichae*.

В ходе проведения рекогносцировочных исследований впервые в Восточной Сибири было установлено существование очагов моноцитарного эрлихиоза (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), доказана циркуляция на территории Иркутской области *E. muris*, *A. phagocytophilum* *Candidatus «Neoehrlichia mikurensis»*. Обнаружена высокая степень зараженности клещей анаплазмами и эрлихиями и возможность микст-инфицирования клещей этими возбудителями. Тестирование крови на наличие антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ свидетельствует о широком контакте населения с возбудителями этих инфекций и участии анаплазм и эрлихий в формировании региональной инфекционной патологии. Ретроспективное исследование сывороток крови на наличие антител к возбудителям МЭЧ и ГАЧ позволило провести этиологическую расшифровку 3,4 % случаев лихорадок неясной этиологии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что для Восточной Сибири, наряду с существовавшими проблемами профилактики и лечения таких клещевых инфекций, как клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы и клещевой риккетсиоз, обозначились новые проблемы, связанные с диагностикой, лечением и профилактикой заболеваний эрлихиозной природы.

Результаты исследований имеют большое практическое значение для экстренной диагностики и профилактики природно-очаговых трансмиссивных инфекций, передающихся клещами и внедрены в работу Центра профилактики клещевых инфекций.

Традиционными для Института являются исследования по мониторингу и эколого-эпидемиологической характеристике природных очагов

клещевых инфекций (КЭ, КБ, КР) на территории Восточной Сибири и прилегающих территориях, проводимые под руководством заведующей лабораторией трансмиссивных инфекций, д.б.н. Г.А. Данчиновой.

В результате многолетних исследований детально изучено население иксодовых клещей на территории Иркутской области и прилегающих к ней территориях, а также Республики Монголия (в рамках договора о сотрудничестве) и их спонтанная зараженность возбудителями клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза. Определен геновидовой состав этих возбудителей, установлены южные границы распространения таежного клеща в некоторых частях Республики Монголия.

Выявлены условия существования иксодовых клещей и их прокормителей в природных очагах трансмиссивных клещевых инфекций с разной степенью антропогенной трансформации.

Изучены многолетняя и сезонная динамика показателей естественной зараженности и индивидуальной инфицированности боррелиями иксодовых клещей в различных ландшафтно-географических зонах Прибайкалья; проведено сравнение зараженности возбудителем клещевого боррелиоза клещей, снятых с «покусанных людей», и собранных в природных станциях, и дан анализ микстинфицированности клещей боррелиями и вирусом клещевого энцефалита из разных районов юга Восточной Сибири.

Впервые показана корреляционная связь между динамикой зараженности клещей возбудителем клещевого боррелиоза и заболеваемостью населения в Иркутской области, установлена степень совмещенности природных очагов клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза и частоты микстинфицирования клещей этими возбудителями.

Результатом комплексных эколого-фаунистических и медико-эпидемиологических исследований популяций иксодовых клещей стала впервые выдвинутая и научно обоснованная концепция современной эволюции природных очагов трансмиссивных клещевых инфекций в Прибайкалье, в основу которой положено представление о существенной роли различных видов антропогенных воздействий на природную среду, а также разработка алгоритма, позволяющего прогнозировать состояние, дальнейшее развитие и трансформацию очагов.

Приоритетными являются исследования, проведенные группой сотрудников лаборатории эпидемиологии антропонозных инфекций под руководством д.б.н., профессора Л.М. Мамонтовой, по изучению состояния источников водоснабжения и питьевой воды по показателям вирусного и бактериального загрязнения и разработке новых подходов к оценке качества воды по критерию биологической безопасности.

В результате многолетних и многоплановых исследований впервые дана комплексная эколого-эпидемиологическая оценка водных экосистем Восточно-Сибирского региона, в том числе микробного и вирусного загрязнения мест водопользова-

ния и питьевой воды в крупных промышленных городах Сибири, расположенных в различных климатогеографических зонах и различающихся по степени антропогенного загрязнения окружающей среды.

Показано, что загрязнение источников водоснабжения хозяйственно-бытовыми сточными водами обуславливает перестройку структуры водных микробиоценозов, проявляющуюся в снижении доли аутохтонных штаммов бактерий. Это позволило обосновать использование соотношения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в качестве показателя степени антропогенного воздействия на источники водоснабжения.

Установлено, что восточные регионы Российской Федерации являются территориями риска в отношении распространения инфекций с фекально-оральным механизмом передачи. Определены закономерности распространения острых кишечных инфекций в зависимости от условий водопользования. Показано, что заболеваемость острыми кишечными инфекциями характеризуется выраженной неравномерностью и обуславливается приуроченностью к основным поверхностным источникам водоснабжения.

В последние 20 лет в Институте выделилось и активно развивается научное направление по изучению микробной экологии человека в современных условиях, возглавляемое руководителем лаборатории микробиологии, д.б.н. С.М. Попковой. Результаты этих научных исследований можно кратко характеризовать следующим образом:

- Определены региональные особенности микробиоценозов у детей в Восточной Сибири, характеризующиеся низким содержанием бифидо- и лактобактерий (ниже общепатологических норм), широкой распространенностью гемолитических форм кишечной палочки, низкой антогонистической активностью нормальной микрофлоры кишечного биоценоза по отношению к условно-патогенным микроорганизмам.

- Описан иммунологический профиль антропогенной (популяционной) иммунореактивности к индигенной микрофлоре хозяина. Показано, что в условиях экологического прессинга количество иммунореактивных лиц с высоким содержанием антител к бифидобактериям выше, чем в более благополучных районах.

- Сформулирована концепция развития устойчивых дисбактериозов, обусловленных срывом иммунологической толерантности по отношению к симбионтной флоре (на примере взаимоотношений организма с бифидобактериями). Показано, что дефицит бифидобактерий приводит к снижению колонизационной резистентности организма, способствуя проявлению оппортунистических инфекций, проникновению условно-патогенной микрофлоры.

Практическое значение результатов этих исследований заключается в обосновании рациональной диагностики и тактики коррекции

дисбактериозов детского и взрослого населения с учетом особенности этой патологии в условиях техногенного загрязнения окружающей среды. Полученные научные данные используются в работе «Центра диагностики и профилактики дисбактериозов», функционирующего на базе Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН.

Начиная с 2005 г. в Институте активно развивается инновационная деятельность. При поддержке Администрации Иркутской области и г. Иркутска выполнен ряд инновационных проектов, таких как «Внедрение нового иммунодиагностикума для оценки антибактериального противодифтерийного иммунитета с целью предупреждения заболеваний (вспышек) дифтерии у населения Иркутской области», «Эпидемиологический мониторинг и создание математической модели прогноза ВИЧ-инфекции в городе Иркутске» и ряд других, внедрение которых способствовало предупреждению и снижению заболеваемости такими инфекциями как дифтерия, СПИД и др. на территории Иркутской области и г. Иркутска.

С 2009 г. в научной тематике Института особое место заняли исследования по изучению социально-значимых инфекций, и, прежде всего, туберкулеза и ВИЧ-инфекции.

СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫЕ ИНФЕКЦИИ

Дана оценка клинико-эпидемиологических параметров эпидемического процесса туберкулеза в Иркутской области. Установлена прямая связь между ухудшением эпидемиологической обстановки и недостатками работы по раннему выявлению туберкулеза у населения. Разработан и обоснован метод количественной оценки эпидемиологической ситуации и(или) состояния популяционного здоровья с использованием единого обобщающего статистического критерия — индекса эпидемиологической ситуации (ИЭС).

Сформирована база данных клинико-эпидемиологических и молекулярно-генетических данных (более 1000 больных легочным туберкулезом), проживающих на территории Иркутской области, Республики Бурятии и Саха (Якутия). Охарактеризована генетическая вариабельность штаммов, позволившая выявить территориальные особенности их распространения и формирования первичной лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам первого ряда.

На основании выполненных исследований предложена оригинальная научная гипотеза, связывающая миграционные процессы русскоязычного населения первой половины XX века из Китая в Советский Союз, с заносом и распространением генотипа «Пекин» *Mycobacterium tuberculosis* на территорию СССР, на основании этого разработана научная концепция, доказывающая методами математического моделирования значимую роль пандемического и высоковирулентного генотипа «Пекин» *Mycobacterium tuberculosis* в эпидемии туберкулеза на территориях стран бывшего СССР.

Проводится работа по созданию математической модели прогноза туберкулеза на основе региональных характеристик эпидемического процесса с учетом действующих программ по снижению напряженности эпидемической ситуации, позволяющие использовать их не только в качестве наиболее приближенного к реальной ситуации прогноза, но и как инструмент для оценки эффективности программ, оказывающих влияние на течение эпидемий.

Выявлены особенности длительного течения ВИЧ-инфекции в Иркутской области в основной группе риска — потребителей инъекционных наркотиков (ПИН). Охарактеризованы основные показатели средней продолжительности заболевания ВИЧ от момента заражения до смерти в группе ПИН — 7,3 лет, и средней продолжительности первой стадии ВИЧ-инфекции (с момента заражения до появления общих симптомов и сопутствующих заболеваний), когда сохраняется весь образ жизни и поведение — 4,6 года. Разработана математическая модель развития ВИЧ-инфекции в г. Иркутске до 2020 г.

ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ

- Выявлены очаги существующих и новых клещевых инфекций, ГЛПС, ЛЗН, «гриппа птиц», в том числе птичьего, свиного и других вариантов вируса гриппа в Прибайкалье, и дана оценка степени опасности наиболее значимых территорий в отношении этих инфекций.

- Впервые на территории Восточной Сибири в клещах *H. concinna* выявлена ДНК *B. miyamotoi*. Обнаружено инфицирование *B. miyamotoi* клещей *I. persulcatus* на территории Качугского района Иркутской области;

- Впервые установлено наличие очагов моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) на территории Качугского и Казачинско-Ленского районов Иркутской области.

- Получена новая информация о генетической вариабельности эрлихий, анаплазм, риккетсий, инфицирующих популяции иксодовых клещей Прибайкалья, уточнена этиологическая структура заболеваемости клещевыми инфекциями на данной территории, оценена связь генетического разнообразия клещевых патогенов с экологическими факторами.

- На основании изучения вариабельности гена 16S рРНК и *groESL*-оперона установлено 6 генетических вариантов *A. phagocytophilum*, инфицирующих популяции иксодовых клещей на территории Прибайкалья.

- На территории Восточной Сибири выявлена циркуляция нескольких субтипов вируса гриппа птиц (H0N1, Hsw1N1, H1N1, H2N2, H3N2). Ситуацию по гриппу птиц на обследованных территориях можно оценить как умеренно напряженную с высоким риском заноса опасных вирусов.

- На созданных оригинальных лабораторных моделях таежных клещей впервые установлено,

что для таежных клещей Прибайкалья наиболее эволюционно близкими являются популяции *I. persulcatus*, обитающие в горах Тянь-Шаня на территории северо-западного Китая.

- Совместно с сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН расшифрованы нуклеотидные последовательности гена белка E 48 штаммов вируса клещевого энцефалита. Впервые в Восточной Сибири в клещах *I. persulcatus* обнаружены штаммы европейского генотипа.

- Получены новые данные о штаммах, аналогичных штамму с уникальной генетической структурой — «886-84», при расшифровке полной аминокислотной последовательности которого обнаружено чередование аминокислот, характерных для двух или даже трех генотипов в пределах одного гена. В результате проведенных исследований показано, что данный вариант вируса клещевого энцефалита имеет собственный ареал, он экологически связан со всеми звеньями трансмиссивной цепи, принимает участие в инфекционной патологии человека и может претендовать на роль самостоятельного генотипа.

- Проведена оценка влияния генетического разнообразия вируса КЭ на эффективность диагностики и специфической профилактики этого заболевания. Полученные данные свидетельствуют об актуальности дальнейшего поиска оптимального штамма для приготовления современных диагностических и профилактических препаратов.

- Проведено исследование штаммов из группы «886-84» по комплексу маркеров, используемых при отборе штамма для производства вакцинных и диагностических препаратов. Установлено, что по большинству из критериев, предъявляемых для диагностических и вакцинных препаратов, в качестве кандидата могут рассматриваться 3 штамма из этой группы — 886-84, 711-84 и 740-84.

- Показано, что в качестве штамма-кандидата в диагностические и вакцинные препараты может рассматриваться штамм ВКЭ — 740-84.

- Создана методическая база для поиска связи между строением генома и биологическими свойствами вируса КЭ.

- Созданы информационно-аналитические системы «Биологические свойства штаммов вируса КЭ, изолированных на территории Восточной Сибири» и «Генетические свойства штаммов вируса КЭ, изолированных на территории Восточной Сибири», которые являются методической базой для поиска связи между строением генома и биологическими свойствами вируса.

- Методом генотипирования изолятов РНК, выделенных от больных людей, показано, что в этиологии клещевого энцефалита в Иркутской области в 2009 — 2011 гг. принимал участие вирус дальневосточного и урало-сибирского генотипов. Установлена этиологическая роль вируса КЭ дальневосточного генотипа в развитии лихорадочных, менингеальных форм, а также прогрессивной формы хронического КЭ с тяжелым органическим

поражением головного мозга. Показано, что вирус урало-сибирского генотипа являлся этиологическим агентом лихорадочных форм КЭ.

- При изучении биологических свойств вирус-химер установлено, что комплекс структурных генов вируса клещевого энцефалита (С + ргМ + Е) определяет эффективность неvirемической трансмиссии вируса между клещами, а комплекс генов неструктурных белков определяет патогенность вируса для культур клеток млекопитающих.

- Установлена постоянная, активная и широко распространенная циркуляция вирусов гриппа А (до 52 %) с различной антигенной структурой в природных биоценозах Прибайкалья на путях сезонных миграций птиц. Кроме циркуляции субтипов вируса гриппа А — Н1 и Н3, впервые у водоплавающих и синантропных видов птиц, гнездящихся в Прибайкалье, обнаружена РНК 4 новых субтипов ВГА. Это позволяет утверждать, что с настоящего времени спектр известных в Прибайкалье вирусов гриппа птиц вырос до 17.

- Получены нуклеотидные последовательности генов М, НА и NS2 для 14 изолятов вирусов гриппа А, которые депонированы в международную базу данных GenBank.

МИКРОБИОЦЕНОЗЫ

- Завершены исследования по изучению региональных ориентиров количественного содержания основных групп резидентных (базисных) микроорганизмов в кишечной микробиоте детей, проживающих в городах Иркутской области, результаты которых вошли в пособие для врачей «Региональные особенности микробной экологии у детей Иркутской области» и внедрены в практическую деятельность педиатрической службы Иркутской области.

- Создана база данных по микробиологическому пейзажу кишечного биоценоза человека у населения Иркутской области (Свидетельство Роспатента).

- Проводятся исследования по изучению особенностей кишечного микробиоценоза у населения промышленного города на фоне гигиенической характеристики атмосферного воздуха. Установлены 4 варианта топодема с тремя вариантами микробиологических ценофитов.

- Активно развиваются молекулярно-генетические исследования при изучении микробной экологии с помощью сконструированных эритроцитарных иммунодиагностикомов к наиболее представительным видам бифидобактерий для определения антител в сыворотках крови (патент) и для изучения локального иммунитета в копрологических пробах (патент).

Необходимо отметить, что в 2000-е годы в Институте значительно активизировалась патентно-информационная деятельность. В 2001 — 2012 гг. получено 5 патентов на изобретения и 17 баз данных, 4 патента находятся на стадии рассмотрения, в Государственную коллекцию вирусов при ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского депонировано

130 штаммов вируса КЭ. В международную базу данных Genbank депонированы последовательности более 100 штаммов вируса КЭ, 93 штамма боррелий, 30 штаммов эрлихий и анаплазм и 14 штаммов вируса гриппа.

Большое внимание в Институте уделяется подготовке высококвалифицированных научных кадров. За последние 15 лет подготовлено 13 докторов и более 50 кандидатов наук из числа сотрудников ИЭМ, других научных учреждений, практических врачей, иностранных граждан. В настоящее время в Институте выполняются 2 докторские и 5 кандидатских диссертаций. Работает аспирантура по эпидемиологии и микробиологии. На базе Института действует диссертационный совет ДМ 001.038.01, открытый при НЦ ПЗСРЧ СО РАМН по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям: 14.02.02 — эпидемиология, 14.02.04 — медицина труда и 03.02.03 — микробиология (председатель совета — член-корр. РАМН, профессор В.С. Рукавишников).

С 1994 г. базе Института успешно функционирует кафедра эпидемиологии и микробиологии Иркутского государственного института усовершенствования врачей, возглавляемая профессором Е.Д. Савиловым, на которой за годы существования подготовлено более 4 тысяч врачей и специалистов из различных регионов Сибири и Дальнего Востока.

По вопросам фундаментальных и научно-практических исследований инфекционной патологии Институтом проводится взаимовыгодное сотрудничество с учреждениями РАН (Лимнологический институт, Институт географии, СИФИБР, Институт географии, Институт химии им. Фаворского, Институт химической биологии и фундаментальной медицины), РАМН (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, Институт экологии человека им. Сысина, НИИ гриппа СЗО РАМН), ГОУ ВПО (Сибирский государственный университет, Иркутский государственный университет; Иркутский государственный педагогический университет; Иркутский государственный медицинский университет, Московская медицинская академия им. Сеченова и др.), Иркутский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Омский НИИПИ, ФГУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Институт дезинфектологии), ФГУ Министерства природных ресурсов и экологии РФ (Национальный парк «Тункинский», Прибайкальский национальный парк, Байкало-Ленский заповедник) и др.

Институт укрепляет творческие связи с практическим здравоохранением регионов Восточной Сибири, прежде всего, Иркутской и Читинской областей, Республики Бурятия и Саха (Якутия) и расширяет международное сотрудничество.

Традиционным для Института является сотрудничество с Монголией, которое осуществляется в рамках договоров о научно-практическом сотрудничестве с Национальным центром по

изучению природно-очаговых инфекций Министерства здоровья Монголии и Национальным центром по изучению инфекционных болезней Министерства здоровья Монголии. При поддержке гранта РФФИ изучается молекулярно-биологическое разнообразие и сходство переносчиков и возбудителей клещевого энцефалита на сопредельных территориях России и Монголии. Показано биологическое и молекулярно-генетическое сходство переносчиков клещевых инфекций, их прокормителей и возбудителей в обеих странах. За успешные работы в области научных исследований клещевых инфекций и активное участие в разработке и внедрении государственных стандартов эпидемиологического надзора, диагностики лечения клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза в Монголии Институту получен Патент Министерства образования, культуры и наук Монголии № 1038 (1337), 16 июля 2004 г., Монголия, Улан-Батор.

Международное сотрудничество осуществляется также с Институтом науки г. Чиба (Япония), Университетом г. Рэдинг (Великобритания) и Институтом Роберта Коха (Германия).

Ведутся совместные исследования с Институтом Науки Чиба (Chiba Institute of Science) (Япония) в области молекулярной биологии, экологии и эпидемиологии клещевых инфекций согласно условиям договора о научно-практическом сотрудничестве между ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН и Институтом Науки Чиба. В июле 2011 г. проведена международная российско-японская экспедиция по сбору материалов от диких мышевидных грызунов и иксодовых клещей для изучения молекулярной биологии, экологии и эпидемиологии инфекций, передающихся человеку при укусах клещей. При содействии японских коллег апробирован метод иммуноблоттинга для выявления антител к *A. phagocytophilum* в сыворотках крови людей, пострадавших от укусов клещей.

Продолжается сотрудничество с Университетом г. Рэдинг (Великобритания) в области молекулярной биологии вируса клещевого энцефалита. Проведены исследования биологических свойств вирусов-химер. Установлено, что комплекс структурных генов ВКЭ (С + ргМ + Е) определяет эффективность неvirемической трансмиссии вируса между клещами. Показано, что комплекс генов неструктурных белков определяет патогенность вируса для культур клеток млекопитающих.

По договору с Институтом Роберта Коха (Германия) стороны ведут активные переговоры о возможности проведения совместных научных исследований по изучению иммунного ответа человека на укус инфицированного вирусом клещевого энцефалита клеща. Заключен договор с LAP Lambert Publishing GmbH&Co.KG (Германия) на издание монографии «Микроэкология человека и здоровье семьи».

Важной составляющей деятельности Института является оказание медицинской помощи населению Иркутской области. В созданном специали-

зированном Центре диагностики и профилактики трансмиссивных инфекций, начиная с 1992 г., ежегодно в течение весенне-летнего сезона обследуется несколько тысяч жителей города Иркутска и области, пострадавших от укусов клещей. Благодаря использованию современных экспресс-методов, позволяющих проводить дифференциальную диагностику и этиотропную профилактику клещевых инфекций различной природы, ежегодно усилиями Центра удается предупредить от 800 до 1500 случаев клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза, и, таким образом, не только сдерживать рост заболеваемости, но и обеспечивать экономию государственных средств.

Современный Институт эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН сформировался как высокопрофессиональное научное учреждение, располагающее подготовленными кадрами для решения сложных научных проблем этиологии, эпидемиологии, диагностики и профилактики инфекционных болезней. Созданный потенциал позволяет при поддержке СО РАМН и руководства региона рассчитывать на сохранение Институтом лидирующих позиций в стране в ряде важных областей эпидемиологии, дальнейшее развитие и достижение коллективом научных сотрудников новых результатов, направленных на сохранение здоровья населения Сибири.

Сведения об авторах

Колесникова Любовь Ильинична – д.м.н., профессор, член-корр. РАМН, директор ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН

Кулеш Дмитрий Владимирович – к.м.н., директор ИЭМ ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, E-mail: d73k@mail.ru

Коган Виктория Макаровна – к.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН; E-mail: niiem.irkutsk@gmail.com

УДК 616-002.5+616-022.3

Г.И. Алексеева, А.Ф. Кравченко

БАКТЕРИОНОСИТЕЛЬСТВО ИЛИ ЛАТЕНТНЫЙ ТУБЕРКУЛЕЗ?

ГБУ «Научно-практический центр «Фтизиатрия» (Якутск)

Для определения клинического значения у больных туберкулезом легких без клинических проявлений за исключением рентгенопозитивных изменений, но не выделяющих микобактерии туберкулеза, изучены резектаты легких 677 оперированных больных. Выделены 2 группы: 1-я — 409 больных, состоящих на диспансерном учете как бактериовыделители и 2-я — 268 больных, не выделяющих МБТ, где люминесцентным методом микобактерии выявлены в 147 (54,8 %) случаях, из них в 58 (39,4 %) в большом количестве. Методом посева МБТ выявлены у 35 (13,0 %) больных, из них в 14 (40,0 %) случаях получен умеренный и обильный рост. Как оценить данный факт: бактерионосительство микобактерий туберкулеза (МБТ) или латентный туберкулез? Соответственно к пациентам без установленного лабораторными методами бактериовыделения и отсутствия манифестации процесса, но имеющим четкие морфологические туберкулезные изменения в легких, следует относиться как к эпидемиологически опасной категории и применять к ним радикальные хирургические методы лечения.

Ключевые слова: туберкулез, латентное течение, резектаты легкого

BACTERIAL CARRIER STATE OR LATENT TUBERCULOSIS?

G.I. Alexeeva, A.F. Kravchenko

State Budgetary Institution «Research-Practice Center «Phthisiatry», Yakutsk

Lung resection specimens of 677 surgical patients were studied to determine the clinical meaning of the absence of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in sputums of pulmonary tuberculosis patients, who show none of the clinical manifestations of tuberculosis, except the alterations seen on x-ray pictures. There were 2 patient groups: group 1 comprised 409 patients referred to a sputum-positive out-patient follow-up group, group 2 included 268 patients referred to a sputum-negative out-patient follow-up group, who showed the presence of mycobacteria in their lung resection specimens by luminescence microscopy in 147 (54,8 %) cases, and of them 58 (39,4 %) cases showed high counts of mycobacteria. By culture method MTB were identified in 35 (13,0 %) patients, and in 14 (40,0 %) cases growth was either medium or massive. The question was studied of how should one treat this fact: carrier state or latent tuberculosis? We conclude that patients with the absence of bacterial expectoration confirmation by laboratory methods and the absence of disease manifestations, but who have definite morphologic signs of tuberculous alterations in the lungs, should be treated like epidemiologically risky group and should be appointed to radical surgical treatment methods.

Key words: tuberculosis, latent disease progression, lung resection specimens

АКТУАЛЬНОСТЬ

В современной эпидемиологии туберкулеза туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью является мировой глобальной проблемой, которая может свести на нет все достигнутые успехи в области глобального контроля распространения заболевания [1].

Существование инфекционных заболеваний человека представляет собой результат взаимной адаптации экосистемы в процессе многовековой эволюции, одним из компонентов которой является система организм человека — микроорганизм. В связи с этим, проявления инфекции определяются взаимоотношениями указанной системы. Сегодня уже недостаточно осуществлять контроль над эпидемическим процессом на уровне регистрируемых манифестных форм заболевания. Необходимо проводить анализ биологической основы эпидемического процесса, иметь система-

тические данные об истинной циркуляции возбудителя инфекции с характеристикой изменчивости его свойств.

Современная медико-биологическая наука накопила определенные знания по проблеме бактерионосительства. И сегодня рассматривая бактерионосительство как функцию системы «паразит — хозяин», нетрудно видеть результаты этой взаимной адаптации и ее совершенствования, где в конечном итоге выигрывает популяция и паразита, и хозяина. Для паразита — это прямое сохранение вида, а для хозяина — через совершенствование механизмов защиты — сохранение вида [1]. Вместе с этим правомерен ли термин «бактерионосительство» по отношению к микобактериям туберкулеза (МБТ), т.к. до настоящего времени бактерионосительство по происхождению включает 2 группы: перенесшие болезнь (реконвалесценты) и здоровые носители. Или же это оценить как латентное течение туберкулеза?

В этой связи особенно важным является клиническое осмысление этого явления в клинике туберкулеза у человека. В одних случаях МБТ выявляются при исследовании биосубстратов (мокроты, экссудата, спинномозговой жидкости) человека, а в других — при гистологических исследованиях органов и тканей. При этом наиболее информативным и доказательным методом выявления МБТ является культуральный метод исследования.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить клиническое значение у больных туберкулезом легких, не выделяющих микобактерии туберкулеза при многократном исследовании респираторных образцов, но с подтверждением их наличия в резектатах легких, полученных при операциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные о 677 больных, прооперированных по поводу туберкулеза легких. Больные были разделены на 2 группы: 1-ю группу составили 409 больных, состоящие на диспансерном учете как бактериовыделители, и 2-ю группу — 268 больных, состоящие на диспансерном учете по туберкулезу как больные, не выделяющие МБТ. У всех пациентов резектаты легких исследовались люминесцентной бактериоскопией, культуральными исследованиями — посевом на питательные среды общеизвестным методом на предмет наличия МБТ. Определение лекарственной чувствительности проводили методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна — Йенсена, каталазный, пероксидазный тесты, согласно приказам МЗ РФ №№ 109, 558.

У больных 1 группы люминесцентной микроскопией резектатов легкого МБТ были выявлены у 251 (61,4 %) больного, из них у 97 (38,7 %) — в большом количестве. При посеве на питательные среды МБТ были выявлены у 98 (23,9 %) больных, из них в 48 (48,9 %) резектатах легкого был получен умеренный и обильный рост.

У больных 2-й группы люминесцентным методом исследования резектатов легкого МБТ были выявлены в 147 (54,8 %) случаев, из них в 58 (39,4 %) — в большом количестве. Методом посева МБТ выявлены у 35 (13,0 %) больных, из них в 14 (40,0 %) случаях получен умеренный и обильный рост. При сравнении результатов люминесцентной микроскопии и посева различия статистически недостоверны, χ^2 между 2 группами равняется 0,03 и 0,84 соответственно.

При изучении биологических свойств МБТ, выделенных из резектатов легких 35 больных, получены следующие результаты.

У 26 (74,3 %) пациентов рост МБТ регистрировался после 30 суток; у 26 (74,3 %) отмечены единичные (до 20 колоний) МБТ; каталазная и пероксидазная активность сохранены у 28 (80,0 %) выделенных культур. 29 (82,9 %) больных выделяли лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, в т.ч. 12 (34,3 %) мультирезистентные МБТ, т.е.

с множественной ЛУ. 29 (76,3 %) больных выделяли лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, в т.ч. 12 (31,6 %) с множественной лекарственной устойчивостью.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С точки зрения обсуждаемой проблемы наибольший интерес представляли пациенты 2-й группы, которым заболевание туберкулезом было установлено косвенными методами исследования и прямой визуализации. При этом в течение всего периода болезни у этих пациентов МБТ не выявлены всеми известными методами, и их самочувствие оценивалось как удовлетворительное, подтвержденное периодическими лабораторными исследованиями.

В данном случае взаимодействие МБТ, как популяции бактерий и группы макроорганизмов — пациентов 2-й группы, следует рассматривать как одну из форм симбиоза-комменсализма, т.е. для микобактерий — это выгодные условия развития, но не приводящие к гибели хозяина. Такое явление вполне можно отнести к феномену бактерионосительства. С биологической точки зрения, это прогрессивная эволюция: селекция малопатогенных (низковирулентных) видов микроорганизмов и высокоимунных видов макроорганизмов.

У пациентов указанной группы произошла взаимная адаптация и совершенствование системы паразитизма: для паразита — сохранение вида (микроорганизма), для хозяина — совершенствование собственных механизмов защиты и выживания и в конечном итоге — сохранение вида (макроорганизма).

Понятно, что при колонизации патогеном хозяина определенной среды обитания, т.е. легкого происходят многостадийные и многоуровневые взаимоотношения микро и макроорганизма с формированием микробных биоценозов и с дальнейшим переходом в персистентное бактерионосительство. Морфологически это представляет очаг казеоза с инкапсулированием, что объясняет отсутствие микобактерий туберкулеза в респираторном тракте. При этом особенностью этой микобактериальной популяции является то, что она сохраняет высокую метаболическую активность, кроме того, у персистирующих МБТ определялась лекарственная устойчивость к ПТП, в т.ч. множественная. Выявленный факт имеет первостепенное значение, т.к. при определенных условиях данная микобактериальная популяция может иметь дополнительное эпидемиологическое значение в распространении микобактерий туберкулеза вообще и мультирезистентных штаммов в частности. Это свидетельствует в пользу «латентного туберкулеза», а также свойственно «классическому пониманию» бактерионосительства.

Именно в этой стадии развития взаимоотношений паразита и хозяина мы можем визуализировать происшедшие морфологические изменения в легких с помощью методов лучевой диагностики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерионосительство микобактерий туберкулеза следует рассматривать как один из этапов развития взаимоотношений микро- и макроорганизма. Отсутствие бактериовыделения у больных туберкулезом при наличии определенных морфологических изменений в органах и тканях (в легких) следует рассматривать как одну из форм симбиоза-комменсализма. Выявление в резектатах легкого больных, оперированных по поводу различных форм легочного туберкулеза методом посева МБТ, но отсутствие микобактерий при исследовании респираторных образцов всеми доступными методами исследования, клинически

целесообразно оценивать как латентное бактерионосительство. Соответственно к пациентам без установленного лабораторными методами бактериовыделения и отсутствия манифестации процесса, но имеющим четкие морфологические туберкулезные изменения в легких следует относиться как к эпидемиологически опасной категории и применять к ним радикальные хирургические методы лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я. Бактерионосительство (медико-экологический аспект). — Екатеринбург, 1996. — 207 с.

Сведения об авторах

Алексеева Галина Ивановна – доктор медицинских наук, заведующая микробиологической лабораторией ГБУ «Научно-практический центр «Фтизиатрия» (677005, г. Якутск, ул. П. Алексеева, 93; Тел. 89246616815)

Кравченко Александр Федорович – доктор медицинских наук, главный врач ГБУ «Научно-практический центр «Фтизиатрия» (677005, г. Якутск, ул. П. Алексеева, 93; Тел. 89246609902)

Е.Б. Бабанская, Л.В. Меньшикова, Л.С. Дац

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
В ГОРОДЕ ИРКУТСКЕ****ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
(Иркутск)**

Целью исследования явилось изучение распространенности хронической сердечной недостаточности в зависимости от пола и возраста на примере репрезентативной выборки взрослого населения г. Иркутска. Распространенность хронической сердечной недостаточности составила 9,7 %.

Ключевые слова: распространенность, хроническая сердечная недостаточность, пол, возраст

EPIDEMIOLOGY OF CHRONIC HEART FAILURE IN IRKUTSK

Е.Б. Babanskaya, L.V. Menshikova, L.S. Dats

Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

The purpose of a study was the prevalence of chronic heart failure under the dependence on the sex and the age based on the example of the representative sample of adult population of Irkutsk. The prevalence of chronic heart insufficiency composed 9,7 %.

Key words: prevalence, chronic heart insufficiency, floor, age

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является одной из важных проблем современной медицины. Несмотря на определенные достижения в области изучения патогенеза, клиники и лечения, данная патология по-прежнему остается самым распространенным, тяжелым и прогностически неблагоприятным осложнением всех заболеваний сердечно-сосудистой системы [5, 12, 13].

Результаты зарубежных эпидемиологических исследований указывают на резкое увеличение встречаемости хронической сердечной недостаточности. Данные Фремингемского исследования показывают, что распространенность ХСН в течение трех декад жизни возрастает с 1 % в популяции лиц 50 – 59 лет до 10 % в группе 80 – 89-летних [14].

По данным Европейского общества кардиологов, среди проживающих 900 млн человек 10 млн страдают ХСН. Причем у многих пациентов отмечаются симптомы сердечной недостаточности при нормальной фракции выброса [5, 13, 15].

Данные эпидемиологических исследований по изучению распространенности хронической сердечной недостаточности отличаются вариабельностью полученных результатов, что во многом зависит от методов диагностики ХСН.

По результатам первого эпидемиологического исследования «ЭПОХА-ХСН» распространенность ХСН I – IV ФК в европейской части РФ составила 12,3 %, а «тяжелой» ХСН III – IV ФК – 2,3 %. При этом распространенность клинически выраженной ХСН II – IV ФК составила 5,5 %, что в два с половиной раза превысило европейские данные [10]. Согласно последним данным (ЭПОХА-ХСН, госпитальный этап) диагноз ХСН в РФ приблизительно имеет место у 7 % больных, причем ХСН II – IV ФК – у 4,5 %, ХСН III – IV ФК – 2,1 % [5].

В некоторой степени увеличение случаев развития ХСН является определенным успехом в профилактике и уменьшении смертности при острых коронарных синдромах. За последние годы значительно большее число больных стало выживать после острого инфаркта миокарда за счет достижений в интенсивной терапии и адекватной оперативной тактики лечения больных ИБС и пороков сердца. В современном обществе «эпидемия» сердечной недостаточности продолжает расти и за счет старения населения [15].

Социальная значимость сердечной недостаточности определяется большими финансовыми затратами. Данные фармако-экономических анализов показали, что на ХСН в странах Европы и США тратится от 2 до 3 % всего бюджета здравоохранения, превышая затраты на лечение инфаркта миокарда и всех онкологических заболеваний вместе взятых. Причем 70 – 80 % средств приходится на оплату стационарного лечения больных сердечной недостаточностью.

Прогноз при сердечной недостаточности остается крайне неблагоприятным. По данным Фремингемского исследования средняя 5-летняя смертность во всей популяции больных ХСН (с учетом начальных и умеренных стадий) составляет 65 % у мужчин и 47 % у женщин, а 35 – 50 % больных тяжелой ХСН умирают в течение одного года. По тяжести прогноза сердечная недостаточность III – IV ФК не уступает раку легкого IIIb стадии [12]. За один год в РФ умирает от 880 до 986 тысяч больных ХСН [5].

Согласно современному реестру нозологических форм ХСН в нашей стране не является самостоятельным заболеванием и не учитывается в статистических отчетах, а рассматривается как осложнение и исход основного сердечно-сосудистого заболевания.

Поэтому изучение распространенности, факторов прогрессирования ХСН остается актуальным, что необходимо для оценки состояния проблемы и определения четких стратегических задач для разработки профилактических мероприятий.

Отсутствие сведений по распространенности ХСН в Восточной Сибири определило цель и задачи исследования.

Цель исследования: изучить распространенность хронической сердечной недостаточности на примере репрезентативной выборки взрослого населения г. Иркутска и факторы ее прогрессирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно дизайну исследование проводилось в два этапа. На первом этапе проводился анкетный скрининг населения в возрасте старше 18 лет путем поквартирных обходов с последующим созданием репрезентативной выборки взрослого населения популяции г. Иркутска. Всего было выдано 5000 анкет, получено 4068 анкет, таким образом, отклик населения составил 81,4 %. Полученная полнота скрининга являлась достаточной и общепринятой для проведения эпидемиологических исследований неинфекционных заболеваний. Задачей первого этапа стало выявление лиц с «предполагаемой» ХСН. Для анкетного скрининга населения применялся разработанный нами вопросник, в основе которого была Форма 1, предложенная Обществом Специалистов по сердечной недостаточности (ОССН) и используемая в исследовании ЭПОХА-ХСН. На основании информации о численности населения в г. Иркутске и по возрастному распределению по данным областного Управления статистики Госкомстата РФ, была сформирована рандомизированная выборка из 3510 человек, состоящая из 1521 (43,3 %) мужчин и 1989 женщин (56,7 %) с сохранением удельного веса возрастных групп соответствующей генеральной совокупности.

На основании результатов скрининга были выделены 579 человек, имеющие характерные симптомы для «предполагаемой» сердечной недостаточности (наличие сердечно-сосудистого заболевания в сочетании с одышкой или комбинацию симптомов из одышки, утомляемости, сердцебиения и отеков). Данная группа больных была обследована на втором этапе с целью установления распространенности ХСН в популяции г. Иркутска. На каждого пациента заполнялась Форма 2, используемая в исследовании ЭПОХА-ХСН, целью которой являлось подтверждение диагноза ХСН.

Диагноз ХСН устанавливался согласно Национальным рекомендациям ВНОК (Всероссийское Научное Общество Кардиологов) и ОССН по диагностике и лечению ХСН (2003). Стадии и функциональные классы ХСН определялись в соответствии с действующей классификацией (ВНОК/ОССН, 2003). Статистическая обработка производилась с

помощью пакета программ «Statistica for Windows» (версия 6.0) и редактора электронных таблиц MS Excel 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среди 579 обследованных больных, выявленных на скринирующем этапе исследования и предположительно имеющих ХСН, диагноз подтвердился у 339 человек. Таким образом, распространенность ХСН в г. Иркутске составила 9,7 %. Полученный показатель оказался ниже, чем в целом по России на первом этапе исследования ЭПОХА-ХСН — 12,3 %, но выше госпитального этапа — 7 %.

Полученные результаты сравнивались с данными распространенности ХСН по различным регионам России. Так, частота ХСН варьировала от 6,4 % в Республике Чувашии в популяции лиц старше 10 лет [4] и 10 % в популяции неорганизованного населения старше 15 лет [1]; Рязанской области — 8,5 % [11], а по данным госпитального этапа уже 7,9 % [8]; в Нижегородской области — 7,5 % [10]; до 18,2 % в репрезентативной выборке старше 18 лет в Тюмени [3]. Причем повторные исследования в Рязанской и Нижегородской областях за 5 лет наблюдения показали, что имеется увеличение распространенности ХСН I–IV ФК с 8,5 до 11,6 % и с 7,5 до 10,5 % соответственно. В Кировской области за 5 лет количество больных, имеющих ХСН, увеличилось с 9,8 до 10,7 % [6].

Наши данные оказались сопоставимы с результатами Нижегородской области — 9,7 % [7], Республики Татарстан — 9,9 % [9], Кировской области — 9,8 % [6] и Перми — 9,9 % [2].

При анализе частоты случаев ХСН в зависимости от возраста, в группе до 20 лет не было выявлено ни одного респондента с симптомами ХСН (рис. 1). В возрастной группе 20–29 лет было выявлено 0,2 % больных от общего числа респондентов. С возрастом частота случаев ХСН увеличивалась от 0,5 % в 30–39 лет и до 52,9 % в 70–79 лет, достигнув 68,9 % в возрастной группе старше 80 лет.

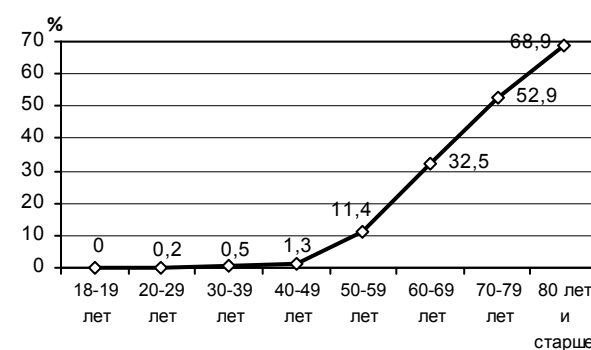


Рис. 1. Частота случаев ХСН в зависимости от возраста ($n = 3510$).

Анализ по возрастному составу среди 339 больных ХСН показал преобладание лиц в возрасте от 60 до 69 лет и от 70 до 79 лет, что составило 30,4 и 35,1 % соответственно (рис. 2).

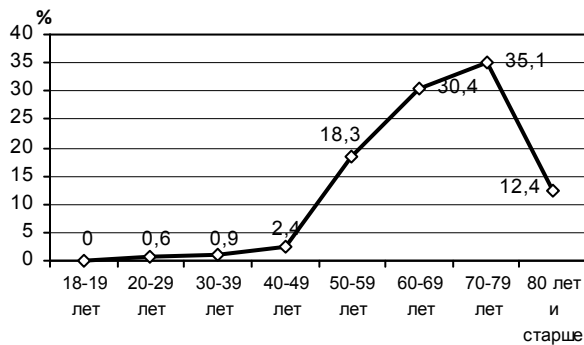


Рис. 2. Повозрастная структура в группе больных ХСН ($n = 339$).

Резкое снижение ХСН наблюдалось в возрасте старше 80 лет, в отличие от распространенности ХСН в странах Европы и США, которая становится максимальной именно в этой возрастной группе.

ХСН в 2 раза чаще встречалась среди женщин, чем среди мужчин, что определяется большей продолжительностью жизни женщин в Иркутске (и в целом по России). Так, женщин с ХСН было выявлено 12,3 % (245 чел.), а мужчин — 6,2 % (94 чел.).

Полученные данные оказались сопоставимы с результатами в других регионах, которые отличались друг от друга, но в целом указывали на преобладание женщин среди больных ХСН. Так, в Нижегородской области распространенность среди женщин была в 1,9 раз больше, чем мужчин, в Томске — в 1,7 раз, в Республике Чувашии — в 2,3 раза, в Перми — в 1,6 раз, в Республике Татарстан — в 1,3 раза, в исследовании ЭПОХА-ХСН — в 1,4 раза.

В целом Российские данные отличаются от результатов европейских исследований, где ХСН чаще встречается среди мужчин. А в США более половины пациентов с ХСН также составляют женщины в возрастной группе старше 70 лет.

При половозрастном анализе распространенности ХСН в репрезентативной выборке г. Иркутска, в возрастных группах старше 40 лет частота ХСН была выше среди женщин, но разница достигала статистической значимости только в возрастной группе от 70 до 79 лет — 60,1 против 35,8 % ($p = 0,0008$). В возрасте старше 80 лет, наблюдалось преобладание ХСН среди мужчин без статистической значимости (рис. 3).

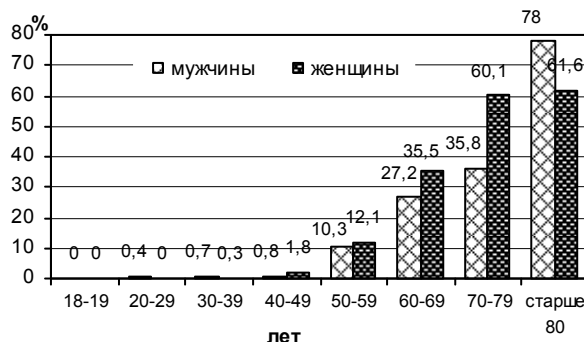


Рис. 3. Повозрастная распространенность ХСН в репрезентативной выборке в зависимости от пола ($n = 3510$); * — $p < 0,05$.

При анализе половозрастной структуры в группе больных ХСН выяснилось, что среди мужчин распространенность ХСН была выше в возрастных группах до 60 лет, чем среди женщин (рис. 4). Полученный результат подтверждает данные исследования ЭПОХА-ХСН, что вероятно ассоциируется с более ранней заболеваемостью АГ и ИБС у мужчин.

Среди больных ХСН не было выявлено женщин моложе 30 лет. В возрастной группе 30—39 лет женщины составили 0,4 %. С возрастом число женщин с ХСН увеличивалось, достигая максимальных значений в группе 70—79 лет — 38,8 %. В группе старше 80 лет количество женщин с ХСН уменьшалось до 13,1 %.

Увеличение количества мужчин с ХСН наблюдалось в старших возрастных группах, но в отличие от женщин, максимальное значение приходилось на возрастную группу 60—69 лет. У лиц старше 70 лет наблюдалось постепенное уменьшение количества мужчин с ХСН и достигало 10,6 % в возрасте старше 80 лет.

Таким образом, количество больных ХСН среди мужчин и женщин отличалось в различные возрастные периоды, причем пик встречаемости ХСН у мужчин на 10 лет раньше, чем у женщин и проходил на 60—69 лет. Обращал внимание тот факт, что частота больных мужчин была больше в группах от 20 до 29 лет и от 50 до 59 лет.

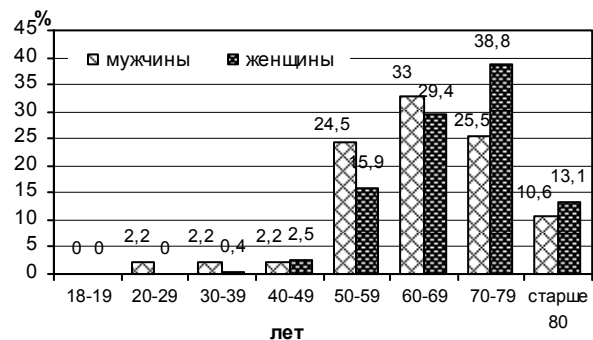


Рис. 4. Половозрастная структура в группе больных ХСН ($n = 339$); * — $p < 0,05$.

Средний возраст больных ХСН в нашем исследовании составил 69 лет (66,6—69,9), что соответствовало общероссийской тенденции, но отличало полученные результаты от европейских, где средний возраст больных составлял 75 лет [12]. Причем, средний возраст женщин был значимо больше, чем возраст мужчин — 70 лет (67,6—70,1) и 66,5 лет (62,6—67,6) соответственно ($p = 0,01$).

Согласно результатам нашего исследования среди больных преобладала ХСН I—II ФК — 8,6 %. Распространенность ХСН III—IV ФК составила 1,1 %. Сопоставимые показатели распространенности тяжелой ХСН III—IV ФК были получены в популяции Нижегородской области — 1,1 % и в Республике Чувашии — 1,6 %. В то же время более высокие значения были определены в Республике Татарстан — 2,8 % и г. Тюмени — 5,6 %.

Таким образом, впервые в Восточной Сибири, на примере популяции взрослого населения г. Иркутска, изучена распространенность хронической сердечной недостаточности в зависимости от пола и возраста. Полученные объективные данные о частоте ХСН позволят определить объемы необходимой лечебно-профилактической помощи в реальной клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богданова С.М., Макарова Н.В. Хроническая сердечная недостаточность в амбулаторной практике: вопросы этиологии // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. — 2008. — № 7 (4). — С. 7.
2. Вергазова Э.К., Козиолова Н.А. Сравнительная распространенность хронической сердечной недостаточности в зависимости от пола // От исследований к стандартам лечения: материалы Российского национального конгресса кардиологов 7–9 октября 2003 г. — М., 2003. — С. 64.
3. Зыбина Н.В., Заугольников О.Г., Клевцова Т.В. Распространенность хронической сердечной недостаточности в г. Тюмени // Тезисы докладов XV Всемирного конгресса международного кардиологического доплеровского общества совместно с Всероссийской научно-практической конференцией по сердечной ресинхронизирующей терапии и кардиоверсии — дефибриляции. — Тюмень, 2006. — С. 74.
4. Маленкова В.Ю. Эпидемиологические аспекты хронической сердечной недостаточности в Чувашской республике // Кардиология: материалы X юбилейного научно-образовательного форума. — М., 2008. — С. 70–72.
5. Национальные рекомендации ВНОК и ОССН по диагностике и лечению ХСН (третий пересмотр) // Сердечная недостаточность. — 2010. — Т. 11, № 1 (57). — С. 3–62.
6. Порошина Е.А., Тарловская Е.И. Эпидемиология артериальной гипертензии и сердечной недостаточности в Кировской области: динамика 2002–2007 // Сердечная недостаточность 2008:

тез. III конгр. Общерос. обществ. организации «Общество специалистов по сердечной недостаточности». — М., 2007. — С. 11.

7. Распространенность хронической сердечной недостаточности в Европейской части Российской Федерации — данные ЭПОХА-ХСН / И.В. Фомин [и др.] // Журнал сердечная недостаточность. — 2006. — № 7 (30). — С. 112–115.

8. Смирнова Е.А., Якушин С.С., Лиферов Р.А. Пятилетняя динамика распространенности хронической сердечной недостаточности в Рязанском регионе // Сердечная недостаточность. — 2010. — Т. 11, № 1 (57). — С. 63–68.

9. Шакирова Р.М. Клинические особенности и распространенность хронической сердечной недостаточности в республике Татарстан: автореф. ... канд. мед. наук. — Казань, 2006. — 24 с.

10. Щербинина Е.В. Распространенность сердечной недостаточности в Нижегородской области и эффективность ее терапии (2000 год): автореф. ... канд. мед. наук. — Н. Новгород, 2005. — 23 с.

11. Якушин С.С., Смирнова Е.А. Могут ли эпидемиологические исследования в России улучшить диагностику и лечение сердечно-сосудистых заболеваний // Кардиология. — 2007. — № 5. — С. 20–21.

12. ESC. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J. — 2005. — Vol. 26. — P. 1115–1140.

13. McMurray J., Stewart S. Epidemiology, aetiology and prognosis of heart failure // Heart. — 2003. — Vol. 83. — P. 596–602.

14. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects / К.К. Но [et al.] // Circulation. — Vol. 93, 88 (1). — P. 107–115.

15. The Euro Heart Failure survey programme — a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe / J.G. Cleland [et al.] // Eur. Heart J. — 2003. — Vol. 24. — P. 442–475.

Сведения об авторах

Бабанская Евгения Борисовна — ассистент кафедры семейной медицины ИГМАПО, к.м.н. (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; e-mail: hoart-forst@ya.ru)
Меньшикова Лариса Васильевна — заведующая кафедрой семейной медицины ИГМАПО, д.м.н., профессор (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования)
Дац Людмила Сергеевна — ассистент кафедры семейной медицины ИГМАПО, к.м.н. (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования)

С.Н. Буйнова, Ф.В. Горбовской

**ЧАСТОТА СИМПТОМОВ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА У ДЕТЕЙ
В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА ДЕСЯТИЛЕТНИЙ ПЕРИОД****ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
(Иркутск)**

Проведено эпидемиологическое исследование по программе ISAAC частоты симптомов аллергического ринита у детей 7–8 и 13–14 лет в г. Иркутске в 1998–1999 гг. и 2008–2009 гг. Согласно результатам исследования, среди школьников увеличилась частота риноконъюнктивальных симптомов за 10-летний период. Отмечается высокая степень сочетания симптомов ринита и астмы.

Ключевые слова: аллергический ринит, эпидемиология, дети

**THE DYNAMICS OF ALLERGIC DISEASES SYMPTOMS IN CHILDREN IN IRKUTSK CITY
DURING THE 10 YEARS PERIOD**

S.N. Buynova, F.V. Gorbovskoy

Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

Epidemiological study of allergic rhinitis symptoms frequency was undertaken on ISAAC program in children 7–8 years and 13–14 years in Irkutsk city in 1998–1999 and 2008–2009. According to the results of the study, the frequency of symptoms of rhinoconjunctivitis among schoolchildren has increased during 10 years period. The high degree of combination of asthma and rhinitis was observed.

Key words: allergic rhinitis, epidemiology, children

Аллергический ринит (АР) является одним из самых распространенных заболеваний у детей. Высокая значимость этого заболевания обусловлена высокой распространенностью, негативным влиянием на социальную активность и качество жизни, частым сочетанием с другой патологией, особенно бронхиальной астмой.

Эпидемиологическое мультицентровое исследование по программе ISAAC (International Study of Asthma and Allergy in Childhood), охватившее более 1 млн детей 6–14 лет в 98 странах показало, что частота симптомов АР варьирует от 0,8 до 39,7 % [9, 10]. Распространенность АР в различных регионах России колеблется от 12 до 24 % [2, 7]. С середины XX века уровень распространенности АР существенно повысился [11], но в последнее десятилетие в большинстве стран отмечается снижение темпов прироста частоты симптомов АР в среднем до 1 % в год (в диапазоне от 0,4 % в Западной Европе до 2,3 % в Африке) [9]. Максимальное увеличение было зафиксировано в странах с низким и средним уровнем дохода, в основном, у старших детей [8–10]. Исследователи высказывают мнение, что рост частоты симптомов АР, вероятно, достиг своего пика в большинстве регионов.

В России выполнены единичные исследования, посвященные изучению динамики частоты симптомов АР у детей. Так, в Москве у детей 13–14 лет отмечено увеличение распространенности симптомов АР с 33,1 % в 1996 г. до 39,0 % в 2006 г. ($p < 0,01$) [1]. В Новосибирске у детей 7–8 лет частота симптомов АР в 2002 г. не изменилась по сравнению с 1996 г. (21,3 и 22,6 % соответственно, $p > 0,05$), а у детей 13–14 лет отмечен небольшой, но недостоверный прирост (32,0 и 29,6 %, $p = 0,0$)

[3]. В Иркутске данные о тенденциях в распространенности АР отсутствуют. В связи с этим, целью данной работы явилось изучение динамики частоты симптомов АР у детей 7–8 и 13–14 лет за период с 1998–1999 гг. по 2008–2009 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно программе ISAAC [4, 6] проведен анкетный скрининг в случайно отобранных школах г. Иркутска. Вопросники для школьников 1–2-х классов заполняли их родители, старшеклассники на вопросы анкеты отвечали самостоятельно. В 1998–1999 гг. в исследование было включено 3037 детей 7–8 лет и 3061 – 13–14 лет, в 2008–2009 гг. – 3084 и 3010 школьников соответственно.

Статистическая обработка проводилась на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ MS Excel (Microsoft Office-2007). Статистическую значимость различия величин, полученных в разные временные интервалы, вычисляли как сравнение двух выборочных долей вариант с помощью ППП STATISTICA 6.0 [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как первичное, так и повторное анкетирование показало высокую распространенность симптомов АР (табл. 1). Так, наличие когда-либо чихания, насморка или заложенности носа без признаков простуды или гриппа в 2008 г. отметили 33,5 ± 0,9 % детей 7–8 лет и 47,4 ± 0,9 % – 13–14 лет ($p < 0,001$). В тоже время проявления со стороны носа за последний год (текущие симптомы) регистрировались несколько реже – у 28,3 ± 0,8 % детей 7–8 лет и 37,4 ± 0,9 % – 13–14 лет ($p < 0,001$). Эти данные

Таблица 1

Частота риноконъюнктивальных симптомов среди школьников 7–8 и 13–14 лет ($M \pm m$), %

Показатели	1998–1999 гг.			2008–2009 гг.		
	М	Д	Всего	М	Д	Всего
7–8 лет						
Чихание, насморк или заложенный нос когда-нибудь	31,5 ± 1,2	26,8 ± 1,1***	29,1 ± 0,8***	32,8 ± 1,2	34,2 ± 1,1	33,5 ± 0,9
То же за последние 12 месяцев	25,8 ± 1,1	20,6 ± 1,0***	23,1 ± 0,8***	27,6 ± 1,1	28,9 ± 1,2	28,3 ± 0,8
Зуд глаз и слезотечение	6,2 ± 0,6	5,6 ± 0,6	5,9 ± 0,4	8,6 ± 0,7	7,6 ± 0,7	8,1 ± 0,5
Сочетание симптомов ринита и астмы когда-нибудь	14,4 ± 0,9	13,6 ± 0,9	14,0 ± 0,6*	16,3 ± 0,9	15,5 ± 0,9	16,0 ± 0,7
То же за последние 12 месяцев	8,3 ± 0,7**	8,3 ± 0,7***	8,3 ± 0,5***	11,3 ± 0,8	12,5 ± 0,8	11,7 ± 0,6
13–14 лет						
Чихание, насморк или заложенный нос когда-нибудь	43,5 ± 1,3	42,1 ± 1,2***	42,8 ± 0,9***	45,5 ± 1,3	49,3 ± 1,3	47,4 ± 0,9
То же за последние 12 месяцев	35,9 ± 1,3	32,5 ± 1,2***	34,1 ± 0,9*	34,4 ± 1,2	40,2 ± 1,3	37,4 ± 0,9
Зуд глаз и слезотечение	10,3 ± 0,8	12,6 ± 0,8*	11,5 ± 0,6*	7,3 ± 0,7	10,6 ± 0,8	9,0 ± 0,5
Сочетание симптомов ринита и астмы когда-нибудь	24,1 ± 1,1	23,3 ± 1,1	23,7 ± 0,8	22,3 ± 1,1	26,3 ± 1,1	24,3 ± 0,8
То же за последние 12 месяцев	17,9 ± 1,0*	15,5 ± 0,9***	16,6 ± 0,7	14,7 ± 0,9	20,1 ± 1,0	17,4 ± 0,7

Примечание: М – мальчики, Д – девочки, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ между соответствующими группами.

сопоставимы с показателями текущих симптомов ряда стран Европы: Польши (27,0 % у детей 6–8 лет и 33,0 % – 13–14 лет), Литвы (22,1 и 26,0 % соответственно), Финляндии (40,1 % у детей 13–14 лет), а также Новосибирска (20,9 % у детей 7–8 лет и 32,5 % – 13–14 лет) [9, 10].

В обеих возрастных группах отмечен прирост частоты текущих АР симптомов, более выраженный у младших школьников (23,1 ± 0,8 % в 1998 г. и 28,3 ± 0,8 % в 2008 г., $p < 0,001$) по сравнению с подростками (34,1 ± 0,9 % и 37,4 ± 0,9 % соответственно, $p < 0,05$). Среднегодовой прирост составил в первой группе 0,52 %, во второй – 0,33 % в год. Следует отметить, что в обеих возрастных группах увеличение распространенности симптомов АР в большей степени отмечалось у девочек: 26,8 ± 1,1 % и 34,2 ± 1,1 % в группе младших девочек и 42,1 ± 1,2 % и 49,3 ± 1,3 % у девочек-подростков ($p < 0,001$ в обоих случаях).

В структуре тяжести симптомов АР увеличилась доля легких проявлений заболевания: у детей 7–8 лет от 56,8 % в 1998–1999 гг. до 63,6 % в 2008–2009 гг. ($p < 0,001$), у детей 13–14 лет – от 73,6 % до 81,9 % соответственно ($p < 0,001$). Вероятно, это связано с улучшением диагностики АР, а также с большей информированностью детей и родителей.

При анализе сезонности проявлений риноконъюнктивита выявлено, что среди как младших, так и старших детей отмечается снижение доли изолированных симптомов поллиноза, проявляющихся с мая по сентябрь, но эти различия не достигают достоверных значений. Так, у детей 7–8 лет в 1998–1999 гг. изолированные летние симптомы составляли 32,4 %, в 2008–2009 гг. – 26,5 %, у детей 13–14 лет – 23,9 % и 22,6 % соответственно ($p > 0,05$ в обоих случаях).

Сохраняется высокая частота сочетаний симптомов поражения верхних и нижних дыхательных путей: от 8 до 20 % анкетированных детей указали в анкетах одновременно на наличие признаков и астмы, и ринита; при этом каждый третий ребенок с назальными проявлениями имел и астмоподобные симптомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование в г. Иркутске показало, что за последнее десятилетие среди детей 7–8 и 13–14 лет по данным анкетного скрининга отмечается достоверное увеличение частоты симптомов АР, в основном, за счет легких форм. При этом сохраняется высокая частота сочетаний назальных и астмоподобных симптомов. В связи с этим необходимо совершенствование диагностики, лечения и профилактики АР как самостоятельного заболевания, так и предиктора бронхиальной астмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биличенко Т.Н., Балдуева М.Ф., Чучалин А.Г. Десятилетняя динамика респираторного здоровья подростков 13–14 лет в г. Москве // Сб. трудов XVII Национального Конгресса по болезням органов дыхания. – Казань, 2007. – С. 6.
2. Геппе Н.А. Взаимосвязь аллергического ринита и других заболеваний респираторного тракта и роль антигистаминных препаратов в их терапии у детей // Вопросы современной педиатрии. – 2002. – Т. 1, № 3. – С. 56–62.
3. Динамика аллергического марша у школьников г. Новосибирска / Е.Г. Кондюрина [и др.] // Аллергология. – 2003. – № 3. – С. 36–39.
4. Иванова О.Н., Кондюрина Е.Г. Современная методология эпидемиологических исследований

и распространенность аллергических заболеваний у детей по программе ISAAC // Российский аллергологический журнал. — 2008. — № 1, Приложение 1. — С. 112—114.

5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.

6. Стандартизированные эпидемиологические исследования аллергических заболеваний у детей. Адаптация программы «Международное исследование астмы и аллергии у детей («ISAAC»)» в России: пособие для врачей / Под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина. — М., 1998. — 30 с.

7. Черняк Б.А., Тяренкова С.В., Буйнова С.Н. Аллергические риниты в Восточной Сибири: распространенность, этиологическая характеристика и взаимосвязь с бронхиальной астмой в разных возрастных группах // Аллергология. — 2002. — № 2. — С. 3—9.

8. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 Update / J. Bousquet [et al.] // J. Allergy Clin. Immunol. — 2008. — Vol. 63 (Suppl. 86). — P. 8—160.

9. ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys / M.I. Asher [et al.] // Lancet. — 2006. — Vol. 26 (368). — P. 733—743.

10. Shah and the ISAAC Phase Three Study Group Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three / N. Ait-Khaled [et al.] // Allergy. — 2009. — Vol. 64. — P. 123—148.

11. Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood / B. Björkstén [et al.] // Pediatr. Allergy Immunol. — 2008. — Vol. 19 (2). — P. 110—124.

Сведения об авторах

Буйнова Светлана Николаевна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры клинической аллергологии и пульмонологии ГБОУ ДПО ИГМАПО (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, д. 333, кв. 33; тел. 89021700020; e-mail: 33s1@rambler.ru)
Горбовской Федор Валерьевич — аспирант кафедры клинической аллергологии и пульмонологии ГБОУ ДПО ИГМАПО (664033, Иркутск, ул. Лермонтова, д. 333, кв. 33)

О.А. Воробьева, В.С. Семечкина

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
(Иркутск)

Большое внимание в последние годы уделяется изучению устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам. Особую проблему представляет туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью. Проведен мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к основным противотуберкулезным препаратам у больных туберкулезом органов дыхания за 2008–2010 гг. Методом абсолютных концентраций изучена лекарственная чувствительность 2251 штамма микобактерий туберкулеза, выделенного от впервые выявленных и ранее получавших лечение больных туберкулезом. Наблюдается неблагоприятная тенденция возрастания суммарной частоты резистентности микобактерий туберкулеза и утяжеление ее структуры за счет нарастания частоты выявления полирезистентных и штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, противотуберкулезные препараты, эффективность лечения

PECULIARITIES OF BIOLOGICAL FEATURES OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ON THE TERRITORY OF IRKUTSK REGION

O.A. Vorobiova, V.S. Semechkina

Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk

It is paid a lot of attention to the problem of mycobacteria tuberculosis sensitivity to antituberculosis drugs. The main problem is in multidrug-resistance. Micobacteria tuberculosis sensitivity to antituberculosis drugs was monitored, tuberculosis patients were observed during 2008–2010 years. Drug sensitivity of 2251 strain of mycobacteria tuberculosis that were isolated from just evaluated and previously treated patients was studied using the method of absolute concentration. There is an upward trend in total frequency of Mycobacterium tuberculosis resistance. The reason is the increasing of the multidrug-resistant strains detection rate.

Key words: Tuberculosis mycobacteria, multi-drug resistance, antituberculosis drugs, effective treatment

Проблема устойчивости микроорганизмов к лекарственным веществам, возникающая одновременно с появлением химиотерапевтических средств, начала привлекать внимание исследователей задолго до того, как она приобрела практическое значение [5].

Начиная с конца XX века во многих регионах России стал наблюдаться неуклонный рост лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) [1, 2, 4]. С 1999 г. в официальную государственную статистику были впервые включены сведения о множественной ЛУ (МЛУ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) [7]. Данная информация является особенно ценной, поскольку регистрирует уровень ЛУ к двум наиболее активным в отношении МБТ к ПТП — изониазиду и рифампицину одновременно. ЛУ МБТ является одним из факторов, ограничивающих эффективность антибактериальной терапии. Наблюдения последних лет показывают снижение эффективности лечения вновь выявленных больных и больных с рецидивами. Особенно низкими эти показатели оказываются у больных с МЛУ возбудителя туберкулеза [6, 7]. В связи с широким распространением ЛУ штаммов встает вопрос соотношения биологических свойств возбудителя (ЛУ, жизнеспособности, вирулентности). В различных литературных источниках имеются

противоречивые сведения о соотношении степени вирулентности и ЛУ МБТ. Работы одних авторов показывают, что вирулентность полирезистентных штаммов МБТ, выделенных от длительно леченных больных даже с распространенным и прогрессирующим процессом значительно ниже, чем у больных, выделяющих чувствительные штаммы возбудителя [6]. Другие авторы отмечают, что развитие устойчивости к ПТП не сопровождается снижением вирулентности МБТ [3, 6]. В соответствии с современными тенденциями развития эпидемического процесса можно предположить, что в ближайшее время основным источником инфекции будут больные туберкулезом легких, выделяющих ЛУ, в том числе МЛУ штаммы МБТ, а у большей части вновь выявленных больных заболевание будет вызвано ЛУ возбудителем. В связи с этим, встает закономерный вопрос о необходимости проведения мониторинга ЛУ, с целью установления контроля над звеньями эпидемического процесса.

Цель работы: анализ частоты, структуры, тенденций развития ЛУ МБТ, определение взаимосвязей между биологическими свойствами возбудителя (ЛУ и жизнеспособностью) у вновь выявленных и ранее леченных больных туберкулезом органов дыхания (ТОД) жителей Иркутской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологические свойства (ЛУ, скорость роста) МБТ изучены у 746 вновь выявленных (группа 1) и 1505 ранее леченных больных (группа 2) туберкулезом органов дыхания, жителей Иркутской области, проходивших курс лечения в ОПТД г. Иркутска в 2008–2010 гг.

ЛУ МБТ, выделенных из респираторного материала (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, биопсийный материал и операционный материал) определялась стандартным непрямой методом абсолютных концентраций. За критерий ЛУ МБТ принимали критическую концентрацию к стрептомицину — 10 мкг/мл, канамицину и этионамиду — 30 мкг/мл, изониазиду — 1 мкг/мл, рифампицину — 40 мкг/мл, этамбутолу — 2 мкг/мл. В структуре ЛУ учитывали монорезистентность (устойчивость по крайней мере к 1 ПТП); полирезистентность (устойчивость к 2 и более препаратам за исключением одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину); МЛУ (устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину независимо от наличия устойчивости к другим препаратам).

Жизнеспособность штаммов МБТ при выделении их из патологического материала больных ТОД оценивали как низкую, если массивность роста на плотных питательных средах была менее 20 колоний в срок более 30 дней; как высокую, если массивность роста МБТ была более 100 колоний в срок 30 и менее дней. Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета Statistica 6.0 и BIOSTAT. Данные были оценены параметрическими и непараметрическими критериями: t критерий Стьюдента, хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В таблицах 1 и 2 представлены данные о частоте и структуре ЛУ МБТ вновь выявленных и ранее леченных больных ТОД за 2008–2010 гг.

Как видно из данных таблиц с 2008 г. наблюдается тенденция утяжеления структуры ЛУ. В обеих группах произошло значительное снижение доли монорезистентных штаммов МБТ: в группе вновь выявленных больных в 1,5 раза, ранее получавших лечение — почти в 2 раза. Одновременно в структуре устойчивости обеих групп отмечено увеличение доли полирезистентных и МЛУ штаммов: в группе больных с вновь зарегистрированным заболеванием в 1,2 раза, у контингентов — в 1,4 раза. Помимо изменений, произошедших внутри самой структуры ЛУ за прошедшие 3 года, среди вновь выявленных больных и ранее получавших лечение, отмечена тенденция роста частоты суммарной резистентности МБТ, в 1,0 и 1,2 раза соответственно. Структура суммарной резистентности у вновь выявленных больных в 2008 и 2009 гг. была почти в равной степени представлена моно-, поли- и мультирезистентными штаммами МБТ. Их соотношение в 2008 г. 1 : 1,2 : 1,3, в 2009 — 1 : 1,3 : 1,2. В 2010 г. в структуре суммарной резистентности произошли существенные изменения соотношения составляющих долей: снизился вклад монорезистентных с одновременным увели-

чением доли полирезистентных и МЛУ штаммов (1 : 2,1 : 2,1). Соотношение моно-, поли- и мультирезистентных штаммов МБТ в группе контингентов было представлено несколько иным образом: 2008 г. — 1 : 1,3 : 2,1; 2009 г. — 1 : 1,7 : 2,1; 2010 г. — 1 : 3,3 : 5,0, что свидетельствует о большом вкладе в структуру суммарной резистентности данной группы больных во все годы — МЛУ и в 2010 г. — полирезистентных штаммов МБТ.

Таблица 1
Частота и структура ЛУ МБТ у впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания в 2008–2010 гг.

Устойчивость	2008 г.		2009 г.		2010 г.	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
	(n = 172)		(n = 334)		(n = 240)	
Монорезистентность	31	18	64	19	29	12
Полирезистентность	36	21	80	24	60	25
МЛУ	39	22	78	23	62	26
Суммарная резистентность	106	61	222	66	151	63
Чувствительность	66	39	112	34	89	37

Таблица 2
Частота и структура ЛУ МБТ у ранее леченных больных туберкулезом органов дыхания в 2008–2010 гг.

Устойчивость	2008 г.		2009 г.		2010 г.	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
	(n = 419)		(n = 665)		(n = 421)	
Монорезистентность	63	15	91	14	36	8
Полирезистентность	80	20	159	24	118	28
МЛУ	132	31	280	42	179	43
Суммарная резистентность	275	66	530	80	333	79
Чувствительность	144	34	135	20	88	21

Сравнительный анализ двух групп показал (табл. 3), что среди вновь выявленных больных доля монорезистентных штаммов оказалась значимо выше, чем в группе контингентов ($t = 6,93$; $p = 0,02$), в то время как в группе ранее получавших лечение значимо преобладали штаммы МБТ с МЛУ ($t = 4,90$; $p = 0,04$).

Таблица 3
Сводные данные по частоте и структуре ЛУ МБТ у больных туберкулезом в 2008–2010 гг.

Устойчивость	Впервые выявленные, %	Контингенты, %	p
	$M \pm m$	$M \pm m$	
Монорезистентность	16,33 ± 2,20	12,33 ± 2,18	0,02
Полирезистентность	23,33 ± 1,20	24,00 ± 2,31	—
МЛУ	23,66 ± 1,20	38,66 ± 3,84	0,04
Суммарная резистентность	63,33 ± 1,45	75,00 ± 4,51	—
Чувствительность	36,66 ± 1,45	25,00 ± 4,51	—

Проведен анализ резистентности к отдельным противотуберкулезным препаратам в группе вновь выявленных больных и среди контингентов за 2008–2010 годы. В течение трехлетнего периода в обеих группах наиболее часто встречалась ЛУ к такому препарату как стрептомицин, несколько реже к таким препаратам как изониазид и рифампицин. Проведенный анализ показал, что в структуре МЛУ практически не встречается резистентность только к изониазиду и рифампицину. В большинстве случаев (до 90 %) МЛУ к изониазиду и рифампицину сочеталась с устойчивостью к стрептомицину. Устойчивость одновременно ко всем препаратам за 2008–2010 гг. была выявлена только у 16 вновь выявленных (2 %) и 51 ранее леченного больного (3 %), причем в 2010 г. было выявлено максимальное количество таких больных (10 вновь выявленных и 26 контингентов). Обращает на себя внимание увеличение частоты встречаемости ЛУ к такому препарату как этамбутол, который до недавнего времени считался наиболее надежным препаратом, уровень устойчивости к которому был относительно невысок. Самый низкий уровень ЛУ отмечен к этионамиду: резистентность к этому препарату встречается реже, чем к стрептомицину и изониазиду среди вновь выявленных больных – в 7,3 и 5,8 раз, среди контингентов – в 6,2 и 5,4 раза соответственно. При сравнительном анализе двух, в группе ранее леченных больных устойчивость к рифампицину ($t = 6,71$; $p = 0,02$) и этамбутолу ($t = 7,50$; $p = 0,02$) встречалась значимо чаще, чем в группе вновь выявленных больных.

По скорости роста ЛУ и штаммы МБТ, сохранившие чувствительность к ПТП не имели отличий (табл. 4). В обеих группах значимо преобладала низкая скорость роста ($\chi^2 = 5,576$; $df = 1$; $p = 0,02$).

Таблица 4
Скорость роста ЛУ и сохранивших чувствительность штаммов МБТ за 2008–2010 гг.

Жизнеспособность МБТ	Лекарственно-устойчивые штаммы МБТ ($n = 1617$)		Лекарственно-чувствительные штаммы МБТ ($n = 634$)	
	абс.	%	абс.	%
Высокая скорость роста	650	40	220	35
Низкая скорость роста	967	60	414	65

Сведения об авторах

Воробьева Ольга Александровна – доцент, к.м.н. ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664025, г. Иркутск, ул. Сурикова, 20–21; e-mail: doctorvorobeva@yandex.ru)

Семечкина Вера Сергеевна – ассистент ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664049, г. Иркутск, м/р Юбилейный, 100)

Таким образом, особенностью ТОД за период 2008–2010 гг., среди вновь выявленных и ранее получавших лечение жителей Иркутской области, является снижение монорезистентных и увеличение МЛУ штаммов МБТ в структуре суммарной ЛУ. Развитие ЛУ возбудителя туберкулеза к ПТП не оказывает существенного влияния на жизнеспособность МБТ. Преобладание низкой скорости роста МБТ среди устойчивых (60 %) и чувствительных (65 %) штаммов по всей видимости является особенностью современного патоморфоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеева Г.И., Кравченко А.Ф., Савилов Е.Д. Основные тенденции распространения туберкулезной инфекции на территории Республики Саха (Якутия) // Якутский медицинский журнал. – 2009. – № 3 (27). – С. 104–106.
2. Вишневский Б.И., Стеклова Л.Н. Частота и структура лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при различных локализациях // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 12. – С. 5–8.
3. Лекарственная чувствительность *Mycobacterium tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания / О.А. Маничева [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 12. – С. 18–22.
4. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных с впервые выявленным деструктивным туберкулезом легких / И.П. Зиновьев [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 4. – С. 37–39.
5. Томан К. Туберкулез: выявление и химиотерапия. Вопросы и ответы. – Женева, 2004. – 387 с.
6. Туберкулез легких с лекарственной устойчивостью возбудителя: учебное пособие / В.Ю. Мишин [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 208 с.
7. Шилова М.В. Туберкулез в России в 2008 г. – М., 2009. – 143 с.

А.В. Дац

ЧАСТОТА ГИПОВОЛЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЙ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ЛЕТАЛЬНОСТЬ**ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
(Иркутск)**

Проведен ретроспективный анализ 890 историй болезни пациентов в возрасте от 1 дня до 90 лет, из них детей 225, взрослых 665, поступивших в отделения интенсивной терапии городских и районных больниц Иркутской области. Гиповолемия диагностирована у 75 % (496/665) взрослых пациентов и у 81 % (183/225) детей в отделениях интенсивной терапии и реанимации. Установлено, что летальность у взрослых пациентов зависит не только от степени тяжести, но и продолжительности гиповолемии.

Ключевые слова: частота гиповолемии, летальность

THE FREQUENCY OF HYPOVOLEMIA IN THE PATIENTS OF INTENSIVE CARE UNITS AND ITS INFLUENCE ON THE MORTALITY

A.V. Dats

Irkutsk state academia of extension course, Irkutsk

We retrospectively analyzed 890 medical histories of patients age from 1 days to 90 years. 225 of them were children and 665 were adult. All of patients were admitted to ICU of different hospitals in Irkutsk region. Hypovolemia was diagnosed in 75 % (496/665) of adult patients and in 81 % (183/225) of children. We found that the mortality of the adult patients depends on not only degree of hypovolemia but also on its duration.

Key words: hypovolemia, mortality

АКТУАЛЬНОСТЬ

Гиповолемия — снижение объема циркулирующей крови, развивается вследствие патологических потерь жидкости через кожу, желудочно-кишечный тракт, почки; при перемещении жидкости в третье пространство при непроходимости кишечника, ожогах, перитоните, панкреатите, травмах, операциях; при кровотечении и снижении поступления жидкости. Возможно развитие относительной гиповолемии за счет вазодилатации при сепсисе и перераспределительном шоке. Гиповолемия является одним из самых распространенных неотложных состояний в медицине.

При гиповолемии отмечается несоответствие объема циркулирующей крови емкости сосудистого русла, что может привести к расстройствам сердечно-сосудистой и нервной систем, а также печеночной и почечной дисфункции. Ошибки в инфузионной терапии могут привести к тяжелым осложнениям и летальным исходам [1, 2]. Необходимо начать лечение как можно раньше, всякое промедление повышает риск смерти, которая, даже если не наступает немедленно, может последовать спустя некоторое время вследствие развившейся полиорганной недостаточности [3, 5].

Одной из наиболее трудных проблем является клиническая диагностика гиповолемии. Диагностика гиповолемии должна основываться на оценке ряда клинических и лабораторных методов. Наличие гиповолемии может привести к ятрогенным осложнениям при назначении медицинских препаратов гемодинамического действия.

Своевременная коррекция гиповолемии, как известно, достоверно улучшает исходы лечения в отделениях интенсивной терапии, но редко используется как предиктор выживаемости больных.

Цель исследования — определить частоту развития гиповолемии у пациентов «ОРИТ» (отделения реанимации и интенсивной терапии) и изучить ее влияние на летальность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения частоты гиповолемии у пациентов в критическом состоянии и летальности проведен ретроспективный анализ 890 историй болезни пациентов в возрасте от 1 дня до 90 лет, из них детей 225, взрослых 665, поступивших в ОРИТ городских и районных больниц Иркутской области с 2001 по 2010 гг.

Для определения внутрисосудистой волемии использовали: анамнез, физикальный осмотр, оценку показателей центральной гемодинамики. Среди всех физикальных данных по выявлению гиповолемии наибольшей специфичностью обладает ортостатическое увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС) более чем на 30 уд./мин. Наличие гиповолемии предполагали при центральном венозном давлении (ЦВД) < 70 мм вод. ст. [4, 6]. Учитывали, что ЦВД может повышаться при сердечной недостаточности, легочной гипертензии, тампонаде сердца, повышении внутригрудного давления при ИВЛ и пневмотораксе, при этом, на фоне сниженного объема, ЦВД будет нормальным

Таблица 1

Стратификация пациентов в зависимости от степени тяжести гиповолемии

Группы (уровень волемии)	Взрослые	Клинические проявления нарушения волемического статуса
Первая (умеренная гиповолемиа)	266	Жажда Ортостатические изменения ЧСС и АД Снижение ЦВД
Вторая (среднетяжелая гиповолемиа)	146	Бледные кожные покровы Холодные кисти и стопы Липкий пот Время заполнения капилляров > 2 с Олигурия (диурез < 0,5 мл/кг/час)
Третья (тяжелая гиповолемиа)	84	Артериальная гипотония Анурия Угнетение сознания

или повышенным. Артериальная гипотензия и снижение диуреза являются поздними признаками гиповолемии. Артериальную гипотонию диагностировали при следующих значениях систолического АД:

- у новорожденных < 55 – 60 мм рт. ст.;
- у грудных детей < 70 мм рт. ст.;
- у детей младшего возраста < 70 мм рт. ст. + 2 × возраст в годах;
- у детей школьного возраста и взрослых пациентов < 90 мм рт. ст.
- у взрослых пациентов с артериальной гипертензией снижение систолического АД на 30 мм рт. ст.

Диагностическая ценность суточного диуреза уменьшается при назначении фуросемида и мексикорона, вызывающих осмотический диурез (например, глюкозы и маннита).

Взрослые пациенты в зависимости от степени тяжести гиповолемии разделены на три группы: первая группа — умеренная гиповолемиа, вторая — среднетяжелая, третья — тяжелая гиповолемиа (табл. 1).

Статистический анализ проведен с использованием программы «Statistica» 6.0.

Сравнение групп по бинарному признаку проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия хи-квадрат Пирсона χ^2 . Критерий Пирсона χ^2 для упорядоченных градаций (тренда) применяли для исследования соотношения качественных данных, когда один признак имел две категории (бинарный), а второй более двух.

За уровень статистической значимости принято $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота развития гиповолемии у пациентов ОРИТ, стратифицированных по возрасту показана на рисунке 1.

Кривая распределения частоты гиповолемии в ОРИТ имеет бимодальный характер с пиками в младенческом и пожилом возрасте. Ранний пик частоты гиповолемии сформирован в основном за счет детей до 1 года, а поздний пик — за счет пациентов старше 65 лет.

Гиповолемиа диагностирована у 75 % (496/665) взрослых пациентов и у 81 % (183/225) детей отделений интенсивной терапии.

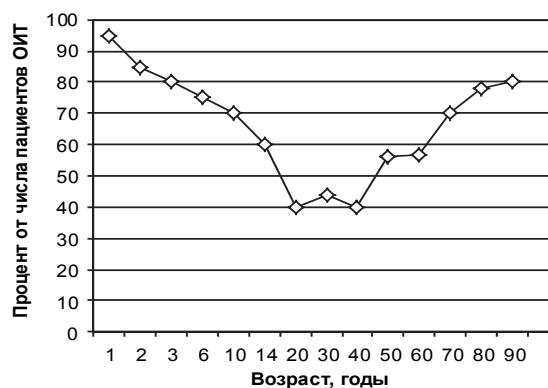


Рис. 1. Частота гиповолемии у пациентов ОРИТ в зависимости от возраста.

В дальнейшем мы провели сравнительный анализ влияния степени тяжести и продолжительности гиповолемии у взрослых пациентов ОРИТ на 10-дневную летальность, для этого из исследования исключили всех детей и взрослых пациентов с нормоволемией и повышенным внутрисосудистым объемом.

На рисунке 2 отражена летальность пациентов ОРИТ, стратифицированных по степени тяжести гиповолемии.

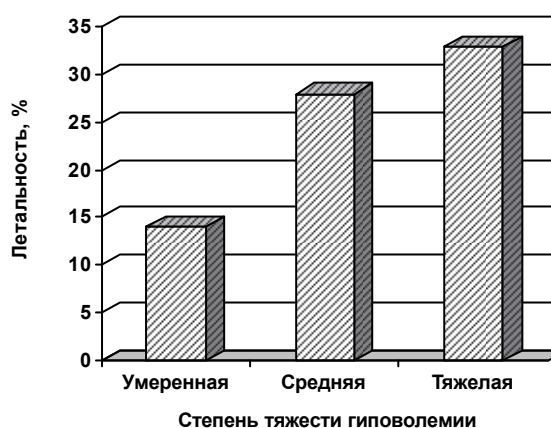


Рис. 2. Влияние степени тяжести гиповолемии на летальность.

Согласно рисунку 2 10-дневная летальность увеличивается с увеличением степени тяжести гиповолемии: при легкой гиповолемии летальность

14 %, средней — 28 %, тяжелой — 33 %. Получено значение вероятности для линейной тенденции $p < 0,005$, что позволяет утверждать о наличии линейной связи между степенью тяжести гиповолемии и летальностью. Определение линейной связи между степенью тяжести гиповолемии и летальностью проведено с использованием критерия хи-квадрат Пирсона для упорядоченных категорий.

На рисунке 3 показано влияние продолжительности гиповолемии на летальность.

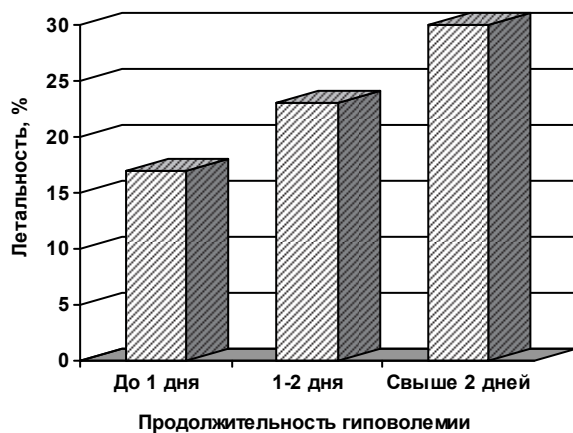


Рис. 3. Влияние продолжительности гиповолемии на летальность.

Было отмечено пошаговое повышение летальности по мере увеличения продолжительности гиповолемии: до одного дня (летальность 17 %), 1 — 2 дня (летальность 23 %) и свыше двух дней (летальность 30 %). При этом значение вероятности для линейной тенденции $p \leq 0,05$ позволяет утверждать наличие линейной связи между степенью тяжести гиповолемии и летальностью.

Таким образом, результаты исследования показали, что не только степень тяжести гиповолемии,

но и продолжительность гиповолемии оказывает влияние на летальность. Было установлено, что пациенты с гиповолемией, устраненной в течение суток, имели более низкую летальность, в отличие от летальности пациентов, у которых для устранения гиповолемии потребовалось больше времени.

ВЫВОДЫ

1. Выявлен бимодальный характер распределения частоты гиповолемии в ОРИТ с пиками у детей до 1 года и лиц пожилого возраста. Частота гиповолемии в ОРИТ у взрослых пациентов составила 75 % (496/665), у детей — 81 % (183/225).

2. Летальность в ОРИТ у взрослых пациентов зависит от степени тяжести и продолжительности гиповолемии. При легкой гиповолемии летальность составила 14 %, средней степени тяжести — 28 %, тяжелой степени — 33 %. При устранении гиповолемии в течение суток летальность составила 17 %, в течение 2 дней — 23 % и свыше двух дней — 30 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морган Д.Э., Мэгиус М. Клиническая анестезиология. — М. : Бином, 2000. — Книга 2. — 364 с.
2. Морей Д.П. Интенсивная терапия в педиатрии. — М. : Медицина, 1995. — Т. 1. — 464 с.
3. Парк Г., Роу П. Инфузионная терапия : пер. с англ. — М. : ООО «БИНОМ Пресс», 2005. — 136 с.
4. Сью Д.И., Винч Д. Интенсивная терапия: современные аспекты : пер. с англ. — М. : МЕДпресс-информ, 2008. — 335 с.
5. Франке Р. Восполнение объема циркулирующей крови с использованием коллоидных растворов // Анестезиология и реаниматология. — 1999. — № 3. — С. 70 — 76.
6. McGee D.C. Preventing complications of central venous catheterization // N. Engl. J. Med. — 2003. — Vol. 348. — P. 1123.

Сведения об авторах

Дац Андрей Владимирович — кандидат медицинских наук, доцент кафедры скорой медицинской помощи и медицины катастроф, ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100; E-mail: avdats@rambler.ru)

Л.С. Дац, Л.В. Меньшикова, Е.Б. Бабанская, М.Л. Меньшиков

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БОЛЕЗНЕЙ КОСТНО-МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ И ПЕРЕЛОМОВ СРЕДИ ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА В г. ИРКУТСКЕ

ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»
(Иркутск)

Целью исследования явилось изучение частоты артралгий, распространенности заболеваний костно-мышечной системы и переломов среди лиц от 14 до 24 лет в г. Иркутске. Частота артралгий составила 22,4 %. Распространенность заболеваний костно-мышечной системы составила 36561 на 100000. Переломы имели место у 23,8 % человек в возрасте до 24 лет.

Ключевые слова: распространенность, заболевания костно-мышечной системы, переломы, подростки, лица молодого возраста

PREVALENCE OF THE DISEASES OF OSTEOMUSCULAR SYSTEM AND FRACTURES AMONG THE PERSONS OF YOUNG AGE IN IRKUTSK

L.S. Dats, L.V. Menshikova, E.B. Babanskaya, M.L. Menshikov

Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

The purpose of a research was the study of the frequency of arthralgia, prevalence of the diseases of osteomuscular system and fractures among the persons from 14 to 24 years in Irkutsk. The frequency of arthralgia composed 22,4 %. The prevalence of the diseases of osteomuscular system composed 36561 to 100000. Fractures occurred in 23,8 % people at the age of up to 24 years.

Key words: prevalence, the disease of osteomuscular system, fractures, adolescents, persons

Заболевания костно-мышечной системы относятся к числу наиболее распространенных патологий в развитых странах. Рост БКМС в России совпадает с мировыми тенденциями: отмечается увеличение первичной заболеваемости и распространенности этой патологии, в том числе и в г. Иркутске. Распространенность болезней костно-мышечной системы имеет закономерную возрастную динамику, начинает формироваться в наиболее молодой возрастной группе до 24 лет и постепенно увеличивается с возрастом. Показатели заболеваемости болезнями костно-мышечной системы за последние 5 лет увеличились более быстрыми темпами среди подростков (на 35 %) по сравнению со взрослыми (на 14,5 %) [4].

К заболеваниям подросткового возраста относят сколиоз, болезнь Пертеса, болезнь Осгуд-Шлаттера и очень часты переломы [2]. Однако истинная распространенность этих заболеваний, которая определяется при проведении эпидемиологических исследований, неизвестна. Данные официальной статистики дают представление о первичной заболеваемости и распространенности только воспалительных заболеваний костно-мышечной системы у подростков.

Цель исследования: изучить распространенность заболеваний костно-мышечной системы и переломов среди подростков и лиц молодого возраста от 14 до 24 лет в г. Иркутске.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено скринирующее обследование жителей г. Иркутска в возрасте от 14 до 24 лет методом формирования репрезентативной выборки

с помощью простой рандомизации из населения города соответствующей возрастной категории, достоверно не различавшейся по полу и возрасту популяции г. Иркутска.

Для обследования применялась скринирующая анкета, в основу которой была положена карта Института Ревматологии РАМН, включающая вопросы, направленные на выявление лиц с артралгиями, переломами костей, болезнями костно-мышечной системы. Скринирующая анкета раздавалась и заполнялась медицинскими работниками на каждого жителя обслуживаемых районов в возрасте от 14 до 24 лет включительно. Всего выдано 1800 анкет, собрано с учетом отказов 1518 заполненных анкет. Отклик населения составил 84,3 %.

После проведения анализа анкетных данных 1518 человек (выявление наличия артралгий, болей в спине, переломов), было выделено 687 подростков и лиц молодого возраста для проведения анализа амбулаторных карт и углубленного обследования с заполнением специально разработанной диагностической анкеты.

Изучение распространенности артралгий, переломов и болезней костно-мышечной системы проводилось методом эпидемиологического одномоментного исследования. Статистическая обработка результатов исследования проведена с использованием программы «Statistica 6,0 for Windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая, что большинство заболеваний костно-мышечной системы сопровождается болевым синдромом, и первым признаком различных за-

болеваний костно-мышечной системы может быть поражение суставов, исследование было начато с изучения артралгий.

Частота артралгий среди подростков и лиц молодого возраста г. Иркутска составила 22,4 %, увеличиваясь с возрастом от 13,7 % среди подростков, до 25,7 % лиц молодого возраста. Частота артралгий у юношей была статистически значимо выше, чем у девушек и составила 25,8 % против 18,9 %, причем это различие произошло за счет лиц молодого возраста, у которых частота артралгий у молодых мужчин и женщин составила 29,6 и 21,5 % соответственно. У подростков частота артралгий между юношами (12,4 %) и девушками (14,9 %) была сопоставима (рис. 1). В изученной литературе данных о частоте артралгий среди подростков мы не обнаружили.

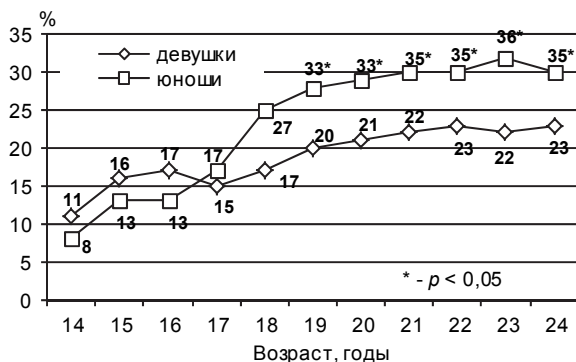


Рис. 1. Частота артралгий в разных возрастных группах среди девушек и юношей.

Распространенность заболеваний костно-мышечной системы среди подростков и лиц молодого возраста составила 36561 на 100 000 населения, увеличиваясь с возрастом: у лиц молодого возраста была в 1,4 раза выше по сравнению с подростками (рис. 2). У девушек была в 1,2 раза выше, чем у юношей.



Рис. 2. Распространенность болезней костно-мышечной системы у подростков и лиц молодого возраста в г. Иркутске.

Полученные данные (29 870,5 на 100 000) среди лиц 15–17 лет достоверно превышают показатели заболеваемости по г. Иркутску в 1,5 раза и по Иркутской области в 2,2 раза [3].

Изучена структура болезней костно-мышечной системы среди подростков и лиц молодого возраста, представленная на рисунке 3.

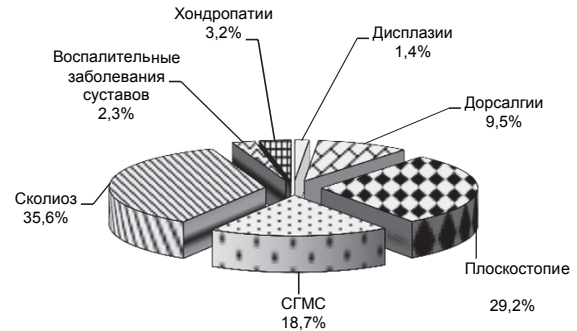


Рис. 3. Структура болезней костно-мышечной системы.

Сколиоз выявлен у 13 % обследованных лиц, что составило 13043 на 100 000 населения. Второе место по распространенности занимает плоскостопие, которое было выявлено у 10,7 % человек или 10672 на 100 000; на третьем месте — синдром гипермобильности суставов (6,8 % или 6785 на 100 000). Хондропатии, объединившие остеохондроз, болезнь Осгуд — Шляттера, болезнь Пертеса, болезнь Шейерман — Мау и другие выявлены у 1,2 % человек. Дисплазии тазобедренного сустава выявлены у 0,5 % обследованных лиц.

Структура общей заболеваемости воспалительными заболеваниями среди подростков была представлена реактивными артропатиями (1,6 %), ювенильным ревматоидным артритом (0,4 %), анкилозирующим спондилитом (0,2 %), что сопоставимо с данными официальной статистики.

Частота синдрома гипермобильности суставов трудно поддается оценке, сложность заключается в том, что лица с синдромом гипермобильности суставов обращаются за медицинской помощью при наличии осложнений (вывихи, подвывихи, растяжения, ранний остеоартроз), которые выступают как основной диагноз, а синдром гипермобильности суставов не диагностируется. Кроме того, типодиагностика синдрома гипермобильности суставов обусловлена недостаточными знаниями врачей первичного звена (терапевтов, врачей общей практики или семейных врачей, педиатров) данной патологии.

Учитывая высокую частоту жалоб на боли в суставах, возможность осложнений и раннего развития остеоартроза, нами проведено изучение частоты синдрома гипермобильности суставов и факторов риска развития его осложнений. Синдром гипермобильности суставов выявлен у 6,8 % подростков и молодых людей, и среди девушек встречался в 3 раза чаще, чем среди юношей, составив 10,5 % против 3,1 % у юношей. Кроме того, у подростков синдром гипермобильности суставов выявлялся в 2,2 раза чаще, чем среди лиц молодого возраста (рис. 3). По литературным данным распространенность генерализованной гипермо-

бильности значительно варьирует в различных этнических группах и составляет от 4 до 20 % в общей популяции при относительном преобладании синдрома у молодых девушек [1, 6, 7].

Переломы костей являются частой патологией у детей, подростков и лиц молодого возраста. Данные официальной статистики о переломах этого контингента отсутствуют. По данным Д.Е. Шилина общая частота случаев переломов, накопленных в детской популяции в Центральном Федеральном округе России к 14 годам оказалась на уровне 12 %, в большей степени у мальчиков (9 %, у девочек — 5 %) и у городских жителей (10 % против 4 % у сельских). К 15 годам каждый 8-й перенес хотя бы один перелом [5]. Н.Ж. Kalkwarf приводит высокие показатели частоты переломов среди подростков в США (к 18 годам 51 % юношей и 40 % девушек имеют один и более переломов) [8].

Переломы костей явились распространенной патологией у подростков и лиц молодого возраста в г. Иркутске. Переломы имели место у 23,8 % человек в возрасте до 24 лет. Установлено, что частота переломов зависела от половой принадлежности: чаще были выявлены переломы у юношей по сравнению с девушками (28,1 % против 21,8 %). Кроме того, риск переломов у юношей на 25 % выше, чем у девушек.

Таким образом, среди подростков и лиц молодого возраста г. Иркутска выявлены высокая частота жалоб на артралгии, которая составила 22,4 % и высокая распространенность заболеваний костно-мышечной системы — 36561 на 100 000. По нозологическим формам отмечалась высокая распространенность сколиоза — 13043 на 100 000,

плоскостопия — 10672 на 100 000, синдрома гипермобильности суставов — 6785 на 100 000. Переломы имели место у 23,8 % человек в возрасте до 24 лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький А.Г. Синдром гипермобильности суставов: номенклатура, клинические проявления и лечение // *Consilium medicum*. — 2001. — Т. 3, № 6. — С. 8—9.
2. Внутренние болезни по Тинсли Р. Харрисону : пер. с англ. под ред. Н.Н. Алипова. — М. : Практика, 2005. — Кн. 1. — С. 34—41.
3. Основные показатели работы лечебно-профилактических учреждений Иркутской области за 2006 год / Департамент здравоохранения Иркутской обл. — Иркутск, 2007. — С. 50—52.
4. Фоломеева О.М., Эрдес Ш.Ф., Насонова В.А. Ревматические заболевания у населения Российской Федерации в начале XXI века // *Терапевт. архив*. — 2007. — № 12. — С. 5—12.
5. Шилин Д.Е. Эпидемиология переломов в детском возрасте: обоснование фармакологической коррекции дефицита кальция и витамина D // *Педиатрия*. — 2007. — № 3. — С. 70—79.
6. Beighton P., Solomon L., Soscolne C.L. Articular mobility in an African population // *Ann. Rheum. Dis.* — 1973. — Vol. 32. — P. 413—418.
7. Everman D.V., Robin N.H. Hypermobility syndrome // *Pediatrics in Review*. — 1998. — Vol. 19, N 4. — P. 111—117.
8. Kalkwarf H.J., Khoury J.C., Lanphear B.P. Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2003. — Vol. 77. — P. 257—265.

Сведения об авторах

Дац Людмила Сергеевна — к.м.н., ассистент кафедры семейной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100; E-mail: lsdata@rambler.ru)
Меньшикова Лариса Васильевна — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой семейной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100)
Бабанская Евгения Борисовна — к.м.н., ассистент кафедры семейной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100)
Меньшиков Михаил Львович — к.м.н., ассистент кафедры семейной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100)

Е.С. Дешко

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ИММУНОПАТОЛОГИИ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ КРАЙНЕГО СЕВЕРА**ГБУЗ ЯНАО «НЦГБ» (Новый Уренгой)
ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» (Омск)**

Изучены особенности иммунной дисфункции у ВИЧ-инфицированных лиц с учетом стадии заболевания, пути передачи инфекции и климатических условий проживания. Обследовано 322 ВИЧ-инфицированных больных в возрасте от 17 до 57 лет. Из них с половым путем передачи инфекции — 185 человек (II группа), с парентеральным путем передачи — 137 человек (I группа). Полученные данные свидетельствуют о выраженных и достоверных изменениях клеточного и гуморального иммунитета: снижении уровня CD4-лимфоцитов, иммунорегуляторного индекса (ИРИ), B-лимфоцитов и увеличении содержания CD3, CD8-лимфоцитов, увеличении концентрации IgG, IgM, IgE, усилении образования ЦИК. Указанные изменения наблюдаются у всех обследуемых, но наиболее выражены в группе с парентеральным путем передачи, а также в стадии 4 А-В ВИЧ-инфекции. Степень поражения иммунной системы более выражена в сравнении с данными, полученными на других территориях.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, иммунный статус

SOME ASPECTS OF HIV-IMMUNOPATOLOGY IN INFECTED PERSONS LIVING IN THE FAR NORTH

E.S. Deshko

**New Urengoy central city hospital, New Urengoy
Omsk State Medical Academy, Omsk**

The specific features of immune dysfunction in HIV-infected persons were studied, taking into account the stage of disease, the route of infection and climatic conditions of residence. Three hundred and twenty-two HIV-infected patients aged from 17 to 57 years were examined. Of those with sexual transmission were 185 (Group II), with the parenteral route of transmission — 137 (Group I). The findings suggest that there are pronounced and significant cellular and humoral changes: decreases in the level of CD4-lymphocytes, in the immunoregulatory index (IRI), B-lymphocytes and increased the content of CD3, CD8-lymphocytes, a rise in the concentration of IgG, IgM, IgE, and increased formation of circulating immune complexes (CIC). These changes were observed in all subjects, but most pronounced in the group with the parenteral route of transmission, as well as in stage 4 A-B HIV infection. The degree of damage the immune system is more pronounced in comparison with the data obtained in other territories.

Key words: HIV-infection, immune status

На сегодняшний день накоплено значительное число данных, касающихся патогенеза ВИЧ-инфекции, особенностей развития иммунной дисфункции в зависимости от различных факторов, таких как стадия заболевания, путь передачи инфекции и наличие сопутствующих заболеваний [5, 7]. Несмотря на стремительное развитие подобных исследований, данных о влиянии природно-климатических факторов на иммунологические показатели ВИЧ-инфицированных недостаточно [1]. В тоже время накоплено достаточное количество доказательств, что проживание в климатических условиях Крайнего Севера является одним из основных факторов, определяющих развитие патологии различных систем организма, прежде всего иммунной [3, 4]. В настоящее время необходимо получение данных о влиянии природно-климатических факторов Ямало-Ненецкого автономного округа на иммунологические параметры ВИЧ-инфицированных лиц является актуальной проблемой. Цель настоящего исследования — изучить физиологические параметры иммунного статуса ВИЧ-инфицированных лиц из числа пришлового населения ЯНАО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 322 ВИЧ-инфицированных больных. Все пациенты находились под диспансерным наблюдением консультативно-диагностического кабинета ГБУЗ ЯНАО «НЦГБ», г. Новый Уренгой и были обследованы на базе лаборатории диагностики СПИД. Среди них были 192 мужчины (59,6 %) и 130 (40,4 %) женщин в возрасте от 17 до 57 лет, средний возраст пациентов составил $33,38 \pm 0,47$ года.

Диагноз ВИЧ-инфекция установлен на основании комплекса эпидемиологических, анамнестических, клинико-лабораторных данных и во всех случаях подтвержден с помощью метода ИФА, а также метода иммунного блоттинга. Уровень вирусной нагрузки (ВН) определялся методом ПЦР.

Среди наблюдаемых преобладали ВИЧ-инфицированные с половым путем передачи инфекции — 185 человек (II группа), число ВИЧ-инфицированных с парентеральным путем передачи составило 137 человек (I группа). Контрольную группу (III группа) составили 150 практически здоровых лиц. Все обследованные относятся к пришлому населению Крайнего Севера.

Средний возраст в контрольной группе составил $36,42 \pm 0,44$ года.

В качестве материала для лабораторных исследований были использованы кровь и сыворотка крови. При оценке состояния иммунной системы ВИЧ-инфицированных лиц (I и II группы) иммунологические показатели сравнивались с аналогичными показателями контрольной группы (III группа). Статистическая значимость различий между количественными показателями в аналогичных группах определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Для обнаружения корреляционных связей между клиническими и иммунологическими признаками применялся коэффициент корреляции Спирмена [2]. Различия по исследуемым показателям считались значимыми при $p \leq 0,05$.

Количественный состав субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD19^+$) определялся методом проточной лазерной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител [6, 8]. Оценка гуморального звена иммунитета (IgA, IgM, IgG, IgE) проводилась методом ИФА (ЗАО «Вектор Бест» г. Новосибирск); циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) определяли методом преципитации в 3,5, 5,0 и 7,0 % растворах полиэтиленгликоля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения в иммунной системе ВИЧ-инфицированных оценивались по сравнению с контролем, между группами исследуемых, а также внутри I и II групп, которые были поделены по стадиям заболевания (3 и 4А-В стадии ВИЧ-инфекции).

В периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов с парентеральным путем передачи (I группа) наблюдалось достоверное увеличение процентного уровня $CD3$ -лимфоцитов как в стадии 3, так и в стадии 4 А-В. Относительное

содержание $CD8$ -лимфоцитов в I группе превышает контрольные значения более чем в 2 раза. Содержание $CD4$ -лимфоцитов достоверно снижено у всех пациентов I группы по сравнению с контролем: в стадии 3 — более чем в 2 раза, в стадии 4 А-В — более чем в 3 раза. На этом фоне закономерно снижение ИРИ, наиболее низкое значение этого показателя по отношению к контролю, более чем в 5 раз, наблюдается в стадии 4 А-В. Дисбаланс гуморального иммунитета пациентов I группы определяется значительным снижением как абсолютного числа В-лимфоцитов, так и относительного их уровня на фоне достоверного увеличения концентрации IgM, IgG, IgE и усиления образования низко-, средне- и крупномолекулярных ЦИК по сравнению с контролем.

При оценке дисфункции иммунной системы ВИЧ-инфицированных пациентов с половым путем передачи (II группа) было установлено достоверное снижение содержания $CD4$ -лимфоцитов в периферической крови обследуемых. Так, относительный уровень $CD4$ -лимфоцитов у пациентов в стадии 3 ВИЧ-инфекции был ниже по отношению к контролю более чем в 2 раза, в стадии 4 А-В — в 3,5 раза. В то же время, в обеих стадиях наблюдается закономерное повышение содержания $CD8$ -лимфоцитов по отношению к контролю. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) достоверно снижен по отношению к контролю более чем в 3 раза. Достоверное снижение содержания В-лимфоцитов в сравнении с контрольной группой сопровождалось увеличением концентрации IgM, IgG, IgE а также средномолекулярных ЦИК.

При сравнительной оценке иммунного статуса ВИЧ-инфицированных больных с половым и парентеральным путями передачи выявлены достоверно более низкие значения содержания

Таблица 1

Показатели клеточного и гуморального иммунитета у ВИЧ-инфицированных лиц

Показатели	Парентеральный путь передачи		Половой путь передачи		Практически здоровые люди (n = 150)
	Стадия 3 (n = 119)	Стадия 4 А-В (n = 18)	Стадия 3 (n = 164)	Стадия 4 А-В (n = 21)	
CD3, %	$81,53 \pm 0,79^*$	$81,82 \pm 2,18^{**}$	$80,93 \pm 0,63^*$	$72,67 \pm 2,95$	$76,19 \pm 0,59$
CD4, %	$22,53 \pm 0,88^{***}$	$15,12 \pm 2,56^*$	$25,87 \pm 0,75^*$	$15,00 \pm 2,06^*$	$52,94 \pm 4,83$
CD8, %	$55,87 \pm 1,07^*$	$61,72 \pm 3,06^{**}$	$54,19 \pm 1,88^*$	$55,06 \pm 2,88^*$	$27,82 \pm 0,54$
CD16, %	$10,97 \pm 0,70$	$11,20 \pm 1,80$	$10,82 \pm 0,60$	$17,88 \pm 3,20^*$	$10,25 \pm 0,56$
CD19, %	$6,24 \pm 0,45^*$	$5,81 \pm 1,31^*$	$7,59 \pm 0,41^*$	$8,26 \pm 1,45$	$10,46 \pm 0,29$
ИРИ	$0,47 \pm 0,03^{***}$	$0,33 \pm 0,07^*$	$0,55 \pm 0,02^*$	$0,30 \pm 0,05^*$	$1,80 \pm 0,06$
IgA, г/л	$1,9 \pm 0,12$	$2,28 \pm 0,39$	$1,78 \pm 0,09$	$2,09 \pm 0,30$	$3,08 \pm 1,32$
IgG, г/л	$20,57 \pm 0,56^*$	$20,40 \pm 1,17^*$	$19,11 \pm 0,53^*$	$18,76 \pm 1,57^*$	$14,11 \pm 0,45$
IgM, г/л	$2,33 \pm 0,10^*$	$2,18 \pm 0,28$	$1,95 \pm 0,08^*$	$1,97 \pm 0,22$	$1,73 \pm 0,07$
IgE, МЕ/мл	$116,1 \pm 23,0^*$	$190,5 \pm 78,0^*$	$53,5 \pm 7,7$	$140,4 \pm 68,7^*$	$51,6 \pm 7,9$
ЦИК 3,5%, ед. опт. пл.	$6,70 \pm 0,87^*$	$7,38 \pm 3,29$	$6,28 \pm 0,98^*$	$5,14 \pm 2,57$	$3,39 \pm 0,28$
ЦИК 5%, ед. опт. пл.	$45,91 \pm 2,75^*$	$44,62 \pm 8,01$	$44,88 \pm 3,93^*$	$57,93 \pm 9,33^*$	$34,15 \pm 1,31$
ЦИК 7%, ед. опт. пл.	$303,5 \pm 9,6^*$	$309,3 \pm 29,7$	$301,3 \pm 10,53$	$313,4 \pm 38,44$	$277,2 \pm 6,9$

Примечание: * — достоверность различий по отношению к контролю, ** — по сравнению с половым путем передачи.

CD4-лимфоцитов и ИРИ в группе с парентеральным путем передачи, при этом число лимфоцитов с фенотипом CD3 и CD8 в этой группе достоверно выше. Общее для обеих групп снижение числа В-лимфоцитов, и повышение IgG, IgM, IgE достоверно более выражено в группе с парентеральным путем передачи инфекции. Достоверных различий в образовании ЦИК между I и II группами выявлено не было (табл. 1).

При оценке обратной корреляционной зависимости между уровнем CD4-лимфоцитов и уровнем вирусной нагрузки наблюдается умеренная обратная корреляция между высоким (более 500 кл./мкл) уровнем CD4-лимфоцитов и низкой (до 10 тыс. копий РНК/мл) вирусной нагрузкой. Обратная корреляция между уровнем CD4-лимфоцитов 500 – 350 кл./мкл и уровнем вирусной нагрузки от 10 до 30 тыс. РНК/мл также была умеренной. Слабая обратная корреляция отмечается между уровнем CD4-лимфоцитов 350 – 200 кл./мкл и уровнем вирусной нагрузки 30 – 100 тыс. РНК/мл. Обратной корреляции между низким содержанием CD4-лимфоцитов (менее 200 кл./мкл) и высокой вирусной нагрузкой (более 100 тыс. РНК/мл) выявлено не было.

В отечественной и зарубежной литературе описаны противоречивые данные о наличии или отсутствии обратной корреляционной зависимости между уровнем CD4-лимфоцитов и уровнем вирусной нагрузки [5, 8]. В данном исследовании такая зависимость прослеживается, исключение составляет отсутствие обратной корреляции между низким содержанием CD4-лимфоцитов (менее 200 кл./мкл) и высокой вирусной нагрузкой (более 100 тыс. РНК/мл).

Полученные данные подтверждают формирование дисбаланса иммунной системы при ВИЧ-инфекции, которое проявляется снижением CD4-лимфоцитов, ИРИ, В-лимфоцитов и увеличением содержания CD3, CD8-лимфоцитов, увеличением концентрации IgG, IgM, IgE, усилением образования ЦИК. Указанные изменения происходят в обеих исследуемых группах, как в стадии 3, так и в стадии 4 А-В ВИЧ-инфекции. Однако степень поражения иммунной системы варьирует в зависимости от стадии заболевания и от пути передачи инфекции, что подтверждается достоверными различиями в показателях клеточного и гуморального иммунитета в сравнении с контрольной группой, между группами I и II, а также внутри групп (в зависимости от стадии заболевания).

Таким образом, степень иммунопатологии, развивающейся при ВИЧ-инфекции, зависит не только от стадии ВИЧ-инфекции, но и от пути

передачи инфекции, что подтверждается другими исследованиями [5, 7]. Однако степень поражения иммунной системы у ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в г. Новый Уренгой, особенно ее клеточного звена, отличается от данных, полученных на других территориях РФ [1, 5]. Результаты, полученные в ходе данного исследования, указывают на более выраженную степень иммунной дисфункции. Изменения в иммунной системе, описанные в различных исследованиях, посвященных проблеме влияния климата районов Крайнего Севера на здоровье пришлого населения [1, 3, 4], выражаются в формировании иммунодефицита, с характерным снижением числа CD4-лимфоцитов и ИРИ, повышением уровня CD8-лимфоцитов. Это дает основание сделать вывод о том, что степень иммунопатологии у ВИЧ-инфицированных лиц определяют не только такие общеизвестные факторы как стадия ВИЧ-инфекции, путь передачи инфекции, но и климатические условия проживания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буторов Е.В. Особенности иммунофизиологического статуса ВИЧ-инфицированных лиц в связи с климатозоологической характеристикой территории проживания : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Тюмень, 2006.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. — М. : Практика, 1998. — 459 с.
3. Голубева Н.В. Физиологическая оценка иммунной системы у пришлого населения Крайнего Севера : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2007.
4. Мурузюк Н.Н. Физиологические параметры иммунного статуса пришлого населения трудоспособного возраста г. Надыма Ямало-Ненецкого автономного округа : автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Тюмень, 2005.
5. Назарова О.И. Оппортунистические инфекции у ВИЧ-инфицированных и наркозависимых лиц (эпидемиологические и иммунологические аспекты) : дис. ... канд. мед. наук. — Омск, 2005.
6. Хайдуков С.В. Современные подходы к оценке фенотипа различных субпопуляций лимфоцитов // Справочник заведующего КДЛ. — 2011. — № 11 — С. 10 — 25.
7. Langford S. E., Ananworanich J., Cooper D. A. Predictors of disease progression in HIV-infection: a review // AIDS Research and Therapy. — 2007. — P. 4 — 11.
8. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1 / J.L. Fahey [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1990. — Vol. 322, N 3. — P. 166 — 172.

Сведения об авторах

Дешко Елена Сергеевна — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории диагностики СПИД ГБУЗ ЯНАО «НЦГБ», тел. (3494) 944278; E-mail: elenadeshko@yandex.ru

В.В. Долгих, Д.В. Кулеш, Л.Р. Колесникова, Н.Н. Чemezova

ВЫЯВЛЕНИЕ ПАРОДОНТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ЭССЕНЦИАЛЬНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ МЕТОДОМ ПЦР

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Пародонт наравне с мозгом, сердцем, почками является органом-мишенью для артериальной гипертензии. При этом развиваются нарушения в системе микроциркуляторного русла, влияющие на трофику тканей зубочелюстной системы, что способствует более активному протеканию патологических процессов в пародонте. В этой связи представляется актуальным выявление пародонтопатогенных микроорганизмов у больных с эссенциальной артериальной гипертензией. Нами проведена детекция пяти пародонтопатогенов, наиболее часто вызывающих развитие заболеваний, у подростков с эссенциальной гипертензией с помощью отечественной тест-системы «Мультидент-5» (ООО НПФ «Генлаб», Москва).

Ключевые слова: артериальная гипертензия, пародонтопатогенные микроорганизмы, заболевания тканей пародонта

IDENTIFICATION OF PERIODONTITIS PATHOGENIC MICROORGANISMS IN PATIENTS WITH THE DIAGNOSIS OF ESSENTIAL ARTERIAL HYPERTENSION BY MEANS OF PCR METHOD

V.V. Dolgikh, D.V. Kulesh, L.R. Kolesnikova, N.N. Chemezova

Scientific center of family health and human reproduction problems SB RAMS, Irkutsk

Periodontitis the same as brain, heart, kidneys is an organ-target for an arterial hypertension. Disturbances in system of the microcirculatory bed, influencing a trophism of tissues of dentoalveolar system that promotes more active course of pathological processes in periodontitis thus develop. Actual revealing periodontitis pathogenic microorganisms in patients with an essential arterial hypertension thereupon is represented. By us it is spent indication of five periodontitis pathogenic microorganisms, which most often causing development of diseases, in teenagers with an essential hypertension by means of test system «Multident-5» («Genlab», Moscow).

Key words: an arterial hypertension, periodontitis pathogenic microorganisms, diseases of tissues of periodontitis

АКТУАЛЬНОСТЬ

Артериальная гипертензия, распространенная у взрослых, долгое время считалась редкой патологией детского возраста. Однако исследования, проведенные как зарубежными, так и российскими специалистами выявили, что повышенное артериальное давление нередко регистрируется и в детском возрасте [2, 4].

Пародонт как и мозг, сердце, почки является органом-мишенью для артериальной гипертензии. Патологические изменения в нем и слизистой оболочке отмечаются при многих заболеваниях, сопровождающихся изменениями со стороны иммунной, сердечно-сосудистой, нервной и эндокринной системы. У больных хроническим генерализованным пародонтитом и артериальной гипертензией отмечено значительное снижение показателей минерального обмена ротовой жидкости [3].

В полости рта содержится более 1000 видов микробных сообществ, связанных с эпителием слизистой оболочки или находящихся на поверхности зуба. Анаэробные бактерии способствуют развитию синусита и других воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. Грамотрицательные анаэробные бактерии вызывают деструкцию пародонта — *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros* [1, 7].

У здоровых детей *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* встречается в 4 %, а при заболеваниях тканей пародонта они встречаются более часто (до 58 %) [6]. При обследовании 263 жителей Финляндии в возрасте от 5 до 80 лет, ДНК *P. gingivalis* выявлена в слюне у 5 % детей в возрасте 5 – 10 лет, у 14 % в группе от 11 до 20 лет и в 63 % случаев у лиц старше 30 лет, когда возрастает частота и интенсивность заболеваний тканей пародонта [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

При помощи отечественной тест-системы «Мультидент-5» (ООО НПФ «Генлаб», Москва) провести выявление пародонтопатогенных микроорганизмов у подростков с эссенциальной гипертензией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Набор реагентов «Мультидент-5» предназначен для определения ДНК пародонтопатогенных микробов *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции. Предложенный набор включает комплект реагентов для пробоподготовки; комплект для амплификации, содержащий буфер, 5 прямых и 2 обратных праймера, дезоксинуклеозидтрифосфаты, ДНК-полимеразу, положитель-

ный и отрицательный контрольные образцы, и комплект для анализа продуктов ПЦР. Принцип действия набора основан на выделении ДНК пародонтопатогенов с помощью комплекта I, амплификации фрагментов хромосомной ДНК (комплект II) и детекции продуктов ПЦР методом электрофореза в агарозном геле (комплект III). Положительный контрольный образец ДНК состоит из ДНК рекомбинантной плазмиды с клонированным фрагментом размером 1000 п. н. генома *P. intermedia*, ДНК рекомбинантной плазмиды с клонированным фрагментом размером 745 п. н. генома *B. forsythus*, ДНК рекомбинантной плазмиды с клонированным фрагментом размером 512 п. н. генома *T. denticola*, ДНК рекомбинантной плазмиды с клонированным фрагментом размером 360 п. н. генома *A. actinomycetemcomitans*, ДНК рекомбинантной плазмиды с клонированным фрагментом размером 197 п. н. генома *Porphyromonas gingivalis*.

Чувствительность набора составляет не более 10^4 копий/мл для каждого возбудителя, что обеспечивает возможность выявления бактерий в количествах, характерных для участков с риском развития или прогрессирования пародонтита и снижение расхода реагентов для амплификации. Специфичность набора была доказана экспериментально и проверена на клинических образцах. Предложенный набор реактивов позволяет одновременно, быстро, просто и точно идентифицировать в одной пробе 5 видов пародонтопатогенов, в том числе трудно культивируемые, с помощью одноступенчатой мультиплексной ПЦР.

Проведено обследование 36 пациентов с диагнозом «эссенциальная артериальная гипертензия», находившихся на лечении в клинике ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН в возрасте от 13 до 17 лет. Материал для исследования — отделяемое пародонтального кармана и слюна. Перед взятием материала из пародонтального кармана всем пациентам проведено удаление наддесневых зубных отложений. Место отбора просушивали с помощью стерильного ватного шарика. Вводили одноразовый стерильный зонд в десневой желобок так, чтобы исключить контакт со слизистой, поверхностью эмали или коронкой зуба. Оставляли зонд в этом положении на 10 секунд. Затем переносили зонд в пробирку типа Eppendorf, содержащую 500 мкл физиологического раствора и перемешивали.

Забор слюны проводили после полоскания полости рта дезинфицирующим раствором. В пробирку типа Eppendorf собирали не менее 500 мкл слюны. Материал передавали в лабораторию для исследования.

Стоматологическое обследование включало:

1. Осмотр слизистой оболочки полости рта.
2. Осмотр зубного ряда, запись зубной формулы и определение индекса интенсивности кариеса.
3. Определение индекса гигиены полости рта по Федорову — Володкиной в модификации Пахомова.

4. Определение индекса гингивита (РМА) и пародонтального индекса (КПИ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Со стороны слизистой оболочки полости рта каких-либо изменений не отмечалось: слизистая оболочка полости рта бледно-розового цвета, влажная, без патологических изменений. При определении индекса интенсивности кариеса у 9 % подростков отмечается интактный зубной ряд. У 90 % обследуемых отмечается поражение кариозным процессом первых нижних моляров (из них у 18 % отмечают удаление постоянных моляров по поводу осложненного кариеса в анамнезе). В 46 % случаях отмечается поражение кариозным процессом вторых моляров верхней и нижней челюсти. У 25 % пациентов отмечается кариес первых и вторых постоянных моляров верхней и нижней челюсти (индекс интенсивности кариеса превышает 9).

Индекс гигиены полости рта соответствовал значениям «хорошо» и «удовлетворительно» во всей группе обследованных.

Изменения со стороны тканей пародонта отмечены в виде наддесневых зубных отложений у 15 % пациентов, из них 9 % имели интактный зубной ряд. Индекс гингивита (РМА) в пределах легкой степени воспаления зарегистрирован у 12 % обследованных.

С помощью системы «Мультидент-5» из отделяемого пародонтального кармана у 12 % обследованных с явлениями гингивита и наддесневыми зубными отложениями обнаружены *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*, которые являются факторами риска хронического генерализованного пародонтита.

В исследуемом материале — слюне, у пациентов со здоровым пародонтом в 12 % случаях были выявлены ДНК *P. gingivalis*, у 6 % пациентов ДНК *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У подростков с диагнозом эссенциальная артериальная гипертензия в отделяемом пародонтальных карманов в 12 % случаев обнаружены *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*, которые являются факторами риска хронического генерализованного пародонтита. Отметим, что у этих пациентов наблюдались также явления гингивита и наддесневые зубные отложения. Пародонтопатогены у пациентов с артериальной гипертензией выявлялись в 3 раза чаще, чем у здоровых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грудянов А.И., Овчинникова В.В. Воспалительные заболевания пародонта как фактор риска развития патологии сердечно-сосудистой системы // Стоматология. — 2007. — № 5. — С. 76 — 78.
2. Долгих В.В., Колесникова Л.И. Патогенез эссенциальной артериальной гипертензии у детей. — Иркутск : ВСНЦ СО РАМН, 1999. — 220 с.

3. Казарина Л.Н., Дубровская Е.Н. Оценка показателей минерального обмена ротовой жидкости при хроническом генерализованном пародонтите у больных артериальной гипертензией // Нижегород. мед. журн. — 2008. — № 2, Вып. 2. — С. 69—69.

4. Леонтьева И.В. Проблема артериальной гипертензии у детей и подростков // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. — 2006. — № 5. — С. 7—18.

5. Метод ПЦР-детекции пародонтопатогенных бактерий и стрептококка мутанс в биологических

образцах из ротовой полости / А.Б. Чухловин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. — 2007. — № 4. — С. 35—38.

6. Николаева Е.Н. Молекулярно-генетические маркеры генерализованного пародонтита и их применение в диагностике : автореф. дис. ... док. мед. наук : 03.00.07; 14.00.36 / Моск. Гос. медико-стом. университет «Росздрава». — М., 2007. — 48 с.

7. Тец В.В. Роль микрофлоры полости рта в развитии заболеваний человека // Стоматология. — 2008. — № 3. — С. 76—80.

Сведения об авторах

Долгих Владимир Валентинович — д.м.н., профессор, зам. директора ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН по науке

Кулеш Дмитрий Владимирович — к.м.н., директор ИЭМ ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН

Колесникова Лариса Романовна — к.м.н., врач-стоматолог клиники ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН

Чемезова Наталья Николаевна — к.м.н., научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН

С.Н. Жданова ¹, О.Б. Огарков ¹, А.Н. Зарбуев ², Л.С. Унтанова ², Е.Д. Савилов ^{1, 3}**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ПРИ СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИИ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ВОСТОЧНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ**¹ ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)² Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер им. Г.Д. Дугаровой (Улан-Удэ)³ ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (Иркутск)

Проведено исследование 61 клинического штамма *M. tuberculosis* методом MIRU-VNTR по 12-ти локусам. Продемонстрировано преобладание генетической группы Beijing (78,7 %) в популяции микобактерий, выделенных от больных с сочетанной инфекцией туберкулез–ВИЧ, проживающих на территории Иркутской области и республики Бурятия. Множественная лекарственная устойчивость проявлялась у трети (34,4 %) изученных изолятов без существенного отличия у представителей генотипа Пекин и не-Пекин.

Ключевые слова: *M. tuberculosis*, туберкулез, ВИЧ-инфекция, лекарственная устойчивость, генотип Пекин, MIRU-VNTR, SITVIT

GENETIC POLYMORPHISM OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION IN EASTEN SIBERIAS.N. Zhdanova ¹, O.B. Ogarkov ¹, A.N. Zarbuev ², L.S. Untanova ², E.D. Savilov ^{1, 3}¹ Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Irkutsk² Republican Clinical TB Dispensary, Ulan-Ude³ Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

A total 61 randomly selected strains of *M. tuberculosis* were genotyped by the 12 loci of MIRU-VNTR. It was shown the predominance of the Beijing genetic group (78,4 %) in population of mycobacterium from the patients with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in Irkutsk region and Buryatia. Multidrug resistance was observed in 34,4 % of the studied strains without significant differences among representatives of Beijing and non-Beijing.

Key words: *M. tuberculosis*, HIV-infection, MIRU-VNTR, Beijing genotype, drug resistant, SITVIT

Некоторые из ключевых особенностей туберкулеза — хронический характер заболевания, и, как правило, предшествующая многие годы латентная инфекция, приобрели в современных условиях развития двух эпидемий — туберкулеза (ТБ) и ВИЧ-инфекции, новые черты. У ВИЧ-инфицированных эффективное сдерживание клинических проявлений туберкулеза во время латентного периода становится недостижимым вследствие непосредственного поражения клеток иммунной системы вирусом иммунодефицита человека. Это приводит как к сокращению латентного периода туберкулеза, так и повышению риска нового заражения на фоне падения защитных сил организма. У ВИЧ-инфицированных больных с низким числом CD4 Т-клеток быстро развивается активная форма туберкулеза [14].

Проблема распространения туберкулеза усугубляется тем, что происходит расширение группы риска заражения и распространения инфекции за счет наблюдаемого в настоящий момент преодоления границ концентрированной эпидемии ВИЧ-инфекции и выхода ее в общую популяцию на ряде территорий РФ, в том числе и Сибирском Федеральном округе, где лидирующую позицию занимает Иркутская область.

Резервуар микобактерий туберкулеза (МБТ), обеспечиваемый больными ко-инфекцией ТБ/ВИЧ, неоднозначен. Значительное преобладание диссеминированных и распространенных форм ТБ у ВИЧ-инфицированных, по сравнению с ВИЧ-негативными больными ТБ, на фоне меньшей частоты и менее значительных размеров полостей распада при легочных формах может привести к тому, что активность передачи инфекта в этой специфической популяции может в целом остаться неизменной [9, 12]. Другая характерная черта — развитие множественной лекарственной устойчивости у больных ко-инфекцией ТБ/ВИЧ — повышает эпидемическое значение этой уязвимой группы в современном течении эпидемического процесса ТБ [23].

Современные исследования показали, что результат инфицирования и заболевания туберкулезом зависит от генотипа возбудителя и хозяина [13, 15]. При этом предполагается, что определенные генотипы МБТ могут иметь конкурентные преимущества среди ВИЧ-инфицированных. Целый ряд исследований показал, что штаммы генотипа Пекин, с которым связывают повышенные частоты резистентности к лекарственным средствам, стали эпидемическими за последние несколько

десятилетий на территории бывшего СССР [2, 6, 15], в том числе и в Восточно-Сибирском регионе [3]. На основании вышеизложенного, актуальным является изучение распространенности различных генотипов МБТ и оценки их лекарственной устойчивости среди больных ко-инфекцией ТБ/ВИЧ на территории эпидемиологического неблагополучия, что и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включен 61 случайно отобранный штамм МБТ, выделенный от больных (взрослые мужчины (42) и женщины (19) 21 – 49 лет) с различными формами легочного туберкулеза, сочетанными с ВИЧ-инфекцией (46 – от впервые выявленных пациентов, 13 – от хронических больных и 2 – больных с рецидивом), находившихся на лечении в противотуберкулезных диспансерах Иркутской области и Республики Бурятия (РБ) в 2010 – 2012 гг. ДНК собранных нами изолятов выделяли и генотипировали по 12 локусам MIRU-VNTR как описано ранее [1]. Для идентификации генетических семейств использовали открытые базы данных MIRU-VNTRplus [17] и SITVIT [128]. Анализ на наличие или отсутствие делеции RD105 в геноме МБТ осуществляли по методике, описанной М. Reed и соавт. [16]. Оценка лекарственной устойчивости в исследуемой выборке была осуществлена по результатам использования метода абсолютных концентраций.

Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц MS Excel 7.0 и пакете статистических программ «Statistica for Windows» (версия 6.0). Значимость различий между параметрами оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании скрининг-теста делеции RD105 в исследуемой выборке было обнаружено 78,7 % (48/61) представителей генотипа Beijing без значимого отличия среди впервые выявленных (80,4 % – 37 из 46 случаев), хронических и рецидивирующих (73,3 % – 11 из 14 случаев) больных туберкулезом с ВИЧ. Путем дальнейшей дифференциации штаммов с помощью MIRU-12 локусного типирования были обнаружены профили, свидетельствующие о циркуляции штаммов и других генетических семейств, большинство из которых были отнесены к известным: LAM (8,2 %), Ural (1,6 %), T18 (1,6 %). Доля неклассифицированных штаммов среди изученных образцов составила 9,8 % (6/61). Применение MIRU – VNTR типирования позволило выявить неоднородность преобладающей группы штаммов, отнесенных к генотипу Пекин. Около половины (45,9 %) из них имели профили 223325153533 и 223325173533, классифицированные как Beijing MIT16 и Beijing MIT17 [19] соответственно. Сравнение других MIRU-профилей Beijing с базой данных SITVIT позволило определить присутствие более редких классифицированных образцов и

уникальных профилей. Описанный нами ранее [3] среди больных туберкулезом Бурятии профиль 223325173423 (MIT642) встречался как среди больных коинфекцией ТБ/ВИЧ из Бурятии, так и в Иркутской области – 6,6 % (4/61). Обнаружены также единичные изоляты с профилями, которые отсутствуют в базе SITVIT. Выявленные особенности преобладания и разнообразия представителей генотипа Beijing среди исследуемой группы больных свидетельствуют об эпидемическом распространении этих штаммов. Структура распределения изолятов, выделенных от больных ТБ/ВИЧ, носит сходный характер с полученными нами ранее результатами по территории Иркутской области и Республике Бурятия [3].

В исследуемой выборке треть (34,4 % – 21/61) составляли штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (одновременная резистентность к рифампицину и изониазиду) без значительного перевеса хронических больных ТБ – 40,2 % (6/15) по сравнению с впервые выявленными – 32,6 % (15/46). На этом фоне чувствительность сохраняли только 18,0 % (11/61) штаммов, выделенных от больных с новыми случаями ТБ. Распределения частот МЛУ среди штаммов генотипа «Пекин» и «не-Пекин» не имели отличия, как от общей выборки ($\chi^2 = 0,146$; $p = 0,703$), так и в группах впервые выявленных и хронических больных с сочетанной патологией ($\chi^2 = 0,768$; $p = 0,375$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Условия ретроспективного сбора анамнестических данных пациентов не позволили нам выяснить, была ли у впервые выявленных больных первичная лекарственная устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам в исследуемой группе пациентов, которая являлась бы доказательством повышенного риска заражения антибиотикоустойчивыми МБТ у ВИЧ-инфицированных. Тем не менее, мы предприняли попытку оценить общее влияние МЛУ среди больных ТБ/ВИЧ по данным нашей выборки. Оценка исходов пациентов с МЛУ ТБ свидетельствует, что две трети перестали быть бактериовыделителями (вследствие смертельного исхода болезни – 33,3 % (7/21) или эффективного курса лечения – 33,3 % (7/21)), а у трети больных стационарный курс лечения был либо закончен, либо прерван с наличием бактериовыделения. На фоне этого, по нашим данным, стационар покинули 41,0 % (25/61) ВИЧ-позитивных бактериовыделителей МБТ, четвертая часть из которых (7/25) – носители МЛУ. Насколько большую эпидемическую опасность несут эти больные, оценить однозначно сложно.

Заразность ВИЧ/ТБ-инфицированных пациентов по сравнению с ВИЧ-отрицательными лицами была предметом многих исследований, которые, однако, дали противоречивые результаты. Эти данные, как внутрибольничные, так и внебольничные, были объединены в мета-анализе М. Cruciani с соавт., который заключил, что случаев повторного заражения туберкулезом в целом среди ВИЧ-

инфицированных пациентов было ни больше, ни меньше, чем среди ВИЧ-отрицательных больных [19]. Результаты другого исследования позволили выявить, что при домашних контактах с ВИЧ-отрицательными случаев повторного заражения было больше по сравнению с контактами с ВИЧ/ТБ-инфицированными в Рио-де-Жанейро [2].

Рядом авторов считается, что в некоторых ситуациях, ВИЧ-инфицированные пациенты с легочными заболеваниями могут передавать МБТ меньше, чем ВИЧ-неинфицированные больные. Эти предположения построены на том, что лица с сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ не в состоянии поддерживать туберкулезную инфекцию, в основном, потому что ВИЧ истощает CD4 Т-клетки, которые необходимы для активации макрофагов и гранулема-образования [14]. Возможно, ВИЧ-инфицированные менее заразны, потому что в их мокроте содержится меньше бактерий за счет редуцированных полостей распада. Кроме того, из-за отсутствия иммунитета, средняя скорость прогрессирования заболевания у ВИЧ/ТБ-инфицированных ускоряется по отношению к больным туберкулезом, которые являются ВИЧ-отрицательными. Следовательно, у ВИЧ/ТБ пациентов клинические и рентгенологические признаки проявляются раньше [12]; и у них более короткий период, в течение которого они заразны до начала лечения, поэтому должны иметь, следовательно, меньше возможностей для распространения.

При этом следует иметь ввиду, что, при легочном туберкулезе существует положительная связь между вирулентностью и активностью передачи, которая связана с образованием полостей, более часто приводящих не только к усилению бактериовыделения, но к смерти пациента с коинфекцией [10]. В то же время, туберкулезный менингит или внелегочный туберкулез, более характерные для ВИЧ-инфицированных, представляют собой тупиковый путь для передачи бактерий [8], т.е. МБТ штаммы, которые приводят к смертельным исходам, считаются более опасными, но эти штаммы теряют возможность эффективной передачи.

Другой оценкой опасности больных коинфекцией ТБ/ВИЧ, как резервуара МБТ, служит определение разнообразия генотипов, которые, поражая иммунокомпрометированных людей, могут расширить свои биологические ниши. Это подтверждают наблюдения из исследования, проведенного в Сан-Франциско, где выявлена повышенная вероятность заражения МБТ среди разных генетических линий у ВИЧ-инфицированных лиц, чем ВИЧ-отрицательных лиц [21]. В другой работе обнаружено, что генетическое разнообразие МБТ изолятов в обеих группах пациентов было одинаковым [11]. Последние данные согласуются с материалами, полученными нами в настоящей работе.

Обнаруженное абсолютное превалирование штаммов генотипа Beijing, представленного неоднородной группой MIRU – VNTR вариантов, отражает общую обстановку циркулирующих в Восточно-Сибирском регионе МБТ. Со штаммами этого генотипа связывают способность предпо-

лагать к приобретению устойчивости к лекарственным препаратам, обеспечиваемых мутациями [6]. Тем не менее, доказательства повышения частоты мутаций штаммов Пекин до сих пор отсутствуют [22]. К тому же, следует учитывать, что данные об относительной трансмиссивности МЛУ штаммами по сравнению с лекарственно-чувствительными штаммами неоднозначны [7]. Лекарственно-устойчивые штаммы могут быть меньше размером, чем полностью чувствительные штаммы [7]. И, вместе с тем, в некоторых районах мира, таких как страны бывшего Советского Союза, где распространенность МЛУ особенно высока, МЛУ штаммы МБТ весьма успешны, и среди них преобладают штаммы генотипа Beijing [2, 23]. Одним из возможных объяснений служит то обстоятельство, что MDR штаммы достаточно длительно циркулируют в этих регионах, произошла компенсационная эволюция [5], которая облегчает начальный дефицит размеров бактерий.

Таким образом, выявленное преобладающее распространение штаммов генотипа Beijing среди больных ТБ/ВИЧ коинфекцией носит неоднозначный характер, требующий настороженного внимания специалистов и исследователей. Успешность распространения эпидемических штаммов этого генотипа на фоне высоких показателей первичной и приобретенной антибиотикорезистентности МБТ и расширения группы риска заражения за счет значительного увеличения числа ВИЧ-инфицированных создали весомые предпосылки для сохранения устойчивого резервуара этой опасной инфекции в регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулеза в Иркутской области (Восточная Сибирь) в 2000 – 2005 гг. / О.Б. Огарков [и др.] // Молекулярная медицина. – 2007. – № 2. – С. 33 – 38.
2. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. Пекинский генотип *M. tuberculosis* // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 4. – С. 50 – 53.
3. Характеристика лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов / С.Н. Жданова [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – № 6. – С. 228 – 230.
4. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала / Е.Д. Савилов [и др.]. – Новосибирск : Наука-Центр, 2011. – 156 с.
5. Andersson D.I., Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? // Na. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 260 – 271.
6. Borrell S., Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1456 – 1466.
7. Cohen T., Sommers B., Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis* // Lancet Infect. Dis. – 2003. – Vol. 3. – P. 13 – 21.

8. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection / R.W. Shafer [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. — 1991. — Vol. 70. — P. 384–397.
9. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // *Annu. Rev. Immunol.* — 2001. — Vol. 19. — P. 93–129.
10. Helke K.L., Mankowski J.L., Manabe Y.C. Animal models of cavitation in pulmonary tuberculosis // *Tuberculosis (Edinb.)*. — 2006. — Vol. 86. — P. 337–348.
11. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved / I. Comas [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42. — P. 498–503.
12. Human immunodeficiency virus and the prevalence of undiagnosed tuberculosis in African gold miners / Corbett E.L. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2004. — Vol. 170. — P. 673–679.
13. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis / R. van Crevel [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 200. — P. 1671–1674.
14. Kwan C.K., Ernst J.D. HIV- and tuberculosis: a deadly human syndemic // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2011. — Vol. 24. — P. 351–376.
15. «Lethal» combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209-336G allele in Russian male population / O. Ogarkov [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution*. — 2012. — Vol. 12. — P. 732–736.
16. Major *Mycobacterium tuberculosis* Lineages Associate with Patient Country of Origin / M. Reed [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2009. — Vol. 47 (4). — P. 1119–1128.
17. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria / T. Weniger [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38. — P. 326–331. — <http://www.miru-vntrplus.org>
18. SITVITWEB — A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology / C. Demay [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* — 2012. — Vol. 12(4). — P. 755–766. — http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/index.jsp
19. The impact of human immunodeficiency virus type 1 on infectiousness of tuberculosis: a meta-analysis / M. Cruciani [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33. — P. 1922–1930.
20. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to contacts of HIV-infected tuberculosis patients / A.C. Carvalho [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 164. — P. 2166–2171.
21. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Gagneux [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2006. — Vol. 103. — P. 2869–2873.
22. Werngren J., Hoffner S.E. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1520–1524.
23. WHO. Global tuberculosis control — surveillance, planning, financing. — Geneva, Switzerland: WHO; 2010.

Сведения об авторах

Жданова Светлана Николаевна — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3; тел. (3952) 333425, e-mail: svetnii@mail.ru)

Огарков Олег Борисович — к.б.н., заведующий лабораторией ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3)

Зарбуев Антон Найданович — к.м.н., главный врач Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера им. Г.Д. Дугаровой

Унтанова Лариса Семеновна — к.м.н., заведующий организационно-методическим отделом Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера им. Г.Д. Дугаровой

Савилов Евгений Дмитриевич — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100)

С.Ф. Карпенко, Х.М. Галимзянов, Н.Б. Касимова

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ КОКСИЕЛЛЕЗЕ

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» (Астрахань)

Представлены результаты клинического наблюдения и обследования 62 больных со среднетяжелым течением коксииеллеза в возрасте от 17 до 74 лет: первая группа (32 чел.) — лица моложе 50 лет, вторая группа (30 чел.) — пациенты старше 50 лет. У больных коксииеллезом в динамике болезни и у 30 доноров определяли в сыворотке крови каталазу и церулоплазмин. Клинические проявления коксииеллеза: гиперемия зева, озноб, миалгии, слабость, склероконъюнктивит и артралгии наблюдались дольше у лиц старше 50 лет. Содержание каталазы и церулоплазмينا зависело от периода болезни и возраста больных. На первой неделе болезни у 80 % больных моложе 50 лет отмечалось понижение уровней каталазы, а у 100 % пациентов старше 50 лет — повышение. На второй неделе заболевания у большинства пациентов независимо от возраста наблюдалось понижение уровней каталазы. Чаше отмечалось повышение уровней церулоплазмина в старшей возрастной группе. На третьей неделе болезни на фоне угасания клинических проявлений болезни у большинства больных коксииеллезом независимо от возраста наблюдалось повышение содержания изучаемых показателей, что свидетельствует о компенсаторной активации антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: коксииеллез, возраст, каталаза, церулоплазмин

AGED FEATURES OF ANTIOXIDANT PROTECTION UNDER COXIILLOSIS

S.F. Karpenko, H.M. Galimzyanov, N.B. Kasimova

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan

The results of the clinical examination and supervision of 62 patients under average—severe course of coxiellosis at the age of 17–74: the first group (32 persons) — patients younger than 50, the second group (30 persons) — patients older than 50 are presented here. Catalase and ceruloplasmin have been defined in the blood serum of the patients with coxiellosis in the disease dynamics. Clinical evidences of coxiellosis: hyperaemia of the pharynx, shivering, myalgia, weakness, scleroconjunctivitis and arthralgia have been seen longer in the patients older than 50. Catalase and ceruloplasmin content depended on the period of the disease and the patients age. At age first week of the disease there noted decreasing of the catalase levels in 80 % of the patients younger than 50; but in 100 % of the patients older than 50 increasing was noted. At the second week of the disease most of the patients, regardless of their age, had decreased the levels of catalase. Increase of the levels of ceruloplasmine has been noted the elder aged group. At the third week of the disease at the background of ceasing of clinical evidences of the disease most patients with coxiellosis, independent on age, had increased content of the studied indices, which shows the compensatory activation of the antioxidant protection.

Key words: coxiellosis, age, catalase, ceruloplasmine

Коксииеллез (лихорадка Ку) — это природно-очаговый зооноз, характеризующийся различными путями передачи, общей интоксикацией и полиморфизмом клинических проявлений. Астраханская область является эндемичной по заболеваемости населения коксииеллезом. В процессе эволюции сформировался ряд защитно-приспособительных механизмов, адаптирующих организм к действию болезнетворных факторов. Одним из них является антиоксидантная защита (АОЗ), которая представляет собой многоуровневую и многофункциональную систему, активно участвующую в механизмах неспецифической резистентности организма.

Целью настоящей работы было изучение особенностей антиоксидантной защиты у больных коксииеллезом в зависимости от периода заболевания и возраста больных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находилось 62 больных со среднетяжелым течением коксииеллеза в возрасте от 17 до 74 лет (55 мужчин и 7 женщин), госпитализированных в ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги»

в 2006–2011 гг. Больные были распределены на две группы. Первая группа пациентов (32 чел.) — это лица в возрасте от 17 до 49 лет. Вторая группа (30 чел.) — это пациенты от 50 до 70 лет. Средний возраст обследованных в первой группе больных составил $31,0 \pm 1,3$ лет, а во второй группе пациентов — $58,0 \pm 1,3$ лет. Диагноз коксииеллеза подтверждался эпидемиологическим анамнезом, клиническими данными и результатами методов ИФА и ПЦР.

Все больные коксииеллезом получали этиотропное, патогенетическое и симптоматическое лечение. В качестве этиотропной терапии назначался доксициклин по общепринятой схеме (в первый день по 0,2 г, затем по 0,1 г однократно) в течение $8,0 \pm 0,1$ дней.

Клиническое наблюдение и обследование больных коксииеллезом проводилось в динамике на 1–3 неделях заболевания, т.е. при поступлении в стационар и перед выпиской. Материалом исследования служила венозная кровь, забираемая в утренние часы.

В качестве контрольной группы было обследовано 30 доноров.

Для определения каталазы и церулоплазмينا в крови больных коксиделлезом и доноров были использованы методы М.А. Королюка с соавторами [2] и Х.А. Равина [3].

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Microsoft Excel. Определяли среднюю арифметическую (M), среднюю ошибку средней арифметической (m), коэффициент корреляции (r). Для оценки статистической значимости различий между сопоставляемыми средними величинами использовали критерий Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, содержание каталазы и церулоплазмينا в крови здоровых лиц было равно соответственно $15,7 \pm 0,5$ мкат/л и $366,9 \pm 13,5$ усл. ед.

Больные коксиделлезом поступали в стационар на 1 неделе болезни ($5,4 \pm 0,2$ день болезни). Статистически значимых различий по частоте встречаемости клинических симптомов у больных коксиделлезом в зависимости от возраста не отмечалось. Одними из ведущих симптомов были жалобы на слабость и лихорадку (100 %). У 77,8 % больных наблюдалась гиперемия зева, у 65,0 % — головная боль, у 63,5 % — гепатомегалия и озноб, у 63,0 % — миалгии, у 61,9 % — снижение аппетита, у 55,5 % — склероконъюнктивит, у 28,6 % — тошнота, у 26,9 % — артралгии, у 25,4 % — рвота, у 22,2 % — кашель и у 11,1 % — иктеричность кожных покровов.

Различия в клинических проявлениях коксиделлеза в зависимости от возраста пациентов выявлялись по длительности основных симптомов, характерных для данного заболевания (табл. 1).

Таблица 1
Длительность клинических проявлений у больных коксиделлезом в зависимости от возраста, ($M \pm m$, дни болезни)

Симптомы	Больные	
	молоче 50 лет ($n = 32$)	старше 50 лет ($n = 30$)
Длительность болезни	$14,1 \pm 0,6$	$19,7 \pm 0,5$
Слабость	$9,1 \pm 0,6$	$14,1 \pm 1,6$
Миалгии	$6,7 \pm 0,3$	$10,5 \pm 0,5$
Артралгии	$6,8 \pm 0,8$	$10,3 \pm 1,0$
Склероконъюнктивит	$9,5 \pm 0,4$	$11,0 \pm 0,1$
Гиперемия зева	$8,5 \pm 0,4$	$15,0 \pm 0,7$
Озноб	$6,7 \pm 0,5$	$11,5 \pm 2,2$

Примечание: указаны только статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Каталаза — это фермент АОЗ, который разлагает образующуюся в процессе биологического окисления перекись водорода на воду и молекулярный кислород и тем исключает образование активных радикальных инициаторов свободнорадикального окисления [2]. На первой неделе болезни у 20,0 % больных коксиделлезом первой группы содержание

каталазы в 1,1 раза превышало норму ($p < 0,05$). У 80,0 % пациентов уровень каталазы оказался в 1,7 раза ниже контрольного значения ($p < 0,001$). У 60,0 % больных отмечалось повышение активности церулоплазмينا в 1,3 раза по сравнению с аналогичным показателем у доноров ($p < 0,001$). У 40,0 % пациентов уровень церулоплазмينا был в 1,5 раза ниже нормального показателя ($p < 0,001$). Многие исследователи отмечают полифункциональность и исключительную активность церулоплазмينا и рассматривают его в качестве одного из основных антиоксидантов плазмы крови. Медьсодержащий белок церулоплазмин посредством ионов меди связывает кислород, осуществляет четырехэлектронное восстановление кислорода до воды и в результате этого является «перехватчиком» супероксидных радикалов [1, 3]. В этот период выявлялась прямая, сильная коррелятивная зависимость между длительностью лихорадки и содержанием церулоплазмينا ($r = 0,795$, $p < 0,02$). У всех пациентов второй группы (100 %) наблюдалось повышение содержания каталазы в среднем в 1,9 раза по сравнению с нормальным уровнем ($p < 0,05$). Повышенные показатели каталазы у больных старше 50 лет выявлялись в 5 раз чаще, чем у пациентов моложе 50 лет ($p < 0,001$). У 50 % больных отмечалось повышение количества церулоплазмينا в 1,2 раза по сравнению с контрольным показателем ($p < 0,05$), а у половины пациентов (50 %) — понижение. На первой неделе болезни у больных коксиделлезом старше 50 лет выявлялась обратная, сильная коррелятивная зависимость между содержанием каталазы и церулоплазмينا ($r = -0,980$, $p < 0,01$).

На второй неделе болезни у 67,0 % больных моложе 50 лет показатель каталазы понижался по сравнению с контрольным значением в 2,9 раза ($p < 0,05$). Содержание каталазы оказалось в 1,7 раза ниже, чем на первой неделе болезни ($p < 0,001$). У 33,0 % пациентов наблюдалось повышение уровня каталазы в 1,7 раза по сравнению с нормой ($p < 0,001$). Содержание каталазы в 1,6 раза превышало аналогичный показатель на первой неделе болезни ($p < 0,001$). Пониженный уровень церулоплазмينا наблюдался у 40,0 % больных. У 53,4 % пациентов содержание церулоплазмينا было в 1,4 раза выше контрольного значения ($p < 0,001$). У 6,6 % больных показатель церулоплазмينا оказался нормальным. У 66,7 % пациентов старше 50 лет содержание каталазы оказалось в 2 раза ниже нормы ($p < 0,05$). Уровень каталазы был повышен в 1,4 раза по сравнению с контролем у 33,3 % больных ($p < 0,001$). Выявлялась прямая, средняя коррелятивная зависимость между содержанием каталазы и длительностью лихорадки ($r = 0,718$, $p < 0,05$). У 80 % пациентов второй группы отмечалось повышение активности церулоплазмينا в 1,3 раза по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$). Повышенные показатели церулоплазмينا наблюдались во второй группе больных в 1,5 раза чаще, чем в первой группе ($p < 0,05$). У 20 % больных содержание церулоплазмينا было в 1,7 раза ниже, чем у доноров ($p < 0,05$). При этом

пониженный уровень церулоплазмينا на второй неделе болезни оказался в 1,6 раза меньше чем на первой неделе ($p < 0,001$). Выявлялась коррелятивная зависимость: обратная, сильная между содержанием церулоплазмينا и длительностью лихорадки ($r = -0,928, p < 0,05$), обратная, средняя между показателями каталазы и церулоплазмينا ($r = -0,723, p < 0,05$).

На третьей неделе болезни наблюдалось угасание клинических проявлений болезни и постепенное восстановление нарушенных функций организма. У 83,3 % больных коксиделлезом первой группы отмечалось повышение каталазной активности крови в 2,2 раза по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,001$). Частота обнаружения повышенных показателей каталазы на третьей неделе болезни оказалась больше чем на первой и второй неделях соответственно в 4,1 ($p < 0,001$) и в 2,5 раза ($p < 0,001$). При этом повышенный уровень каталазы на первой и второй неделях болезни оказался в 1,9 ($p < 0,001$) и 1,2 раза ($p < 0,05$) меньше чем на третьей неделе. У 16,7 % пациентов показатель каталазы восстанавливался до нормального значения. Содержание церулоплазмينا было повышено в 1,3 раза ($p < 0,001$) по сравнению с нормальным значением у 76,7 % больных. У 23,4 % пациентов отмечалось понижение уровня церулоплазмينا. Показатель церулоплазмينا был в 1,2 раза меньше чем у доноров ($p < 0,05$). При этом пониженный показатель церулоплазмينا на третьей неделе болезни оказался в 1,2 раза больше аналогичного на второй неделе ($p < 0,001$). Выявлялась сильная, обратная коррелятивная зависимость между уровнем церулоплазмينا и длительностью слабости ($r = -0,849, p < 0,05$), отмечалась сильная, прямая коррелятивная зависимость между уровнями каталазы и церулоплазмينا ($r = 0,908, p < 0,05$). У 85,7 % больных второй группы содержание каталазы оказалось в 2,8 раза выше, чем у доноров ($p < 0,001$). Частота обнаружения повышенных показателей каталазы на третьей неделе болезни была в 2,6 раза больше, чем на второй неделе ($p < 0,05$). При этом повышенный уровень каталазы на третьей неделе болезни оказался в 1,9 раза больше, чем на второй неделе ($p < 0,001$). У 14,3 % больных уровень каталазы был в 1,6 раза ниже контрольного

значения ($p < 0,05$). У 83,3 % пациентов отмечалось повышение содержания церулоплазмينا в 1,3 раза по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$). А у 16,7 % больных показатель церулоплазмينا был в 1,1 раза ниже нормы ($p < 0,05$). Однако пониженный уровень церулоплазмينا на третьей неделе болезни оказался в 1,5 раза больше, чем на второй неделе ($p < 0,001$).

Таким образом, механизмы антиоксидантной защиты при коксиделлезе зависели от периода заболевания и возраста больных. На первой неделе болезни у большинства больных коксиделлезом моложе 50 лет наблюдалось понижение содержания каталазы и увеличение уровней церулоплазмينا. А у всех пациентов старше 50 лет отмечалось повышение каталазной активности крови. У 50 % больных отмечалось повышение количества церулоплазмينا, а у половины пациентов (50 %) — понижение. Уменьшение активности антиоксидантов свидетельствует об их активном участии в ингибировании перекисного окисления липидов и истощении компенсаторных возможностей организма. А повышение их уровня, очевидно, имеет компенсаторное значение. На второй неделе заболевания у большинства пациентов независимо от возраста наблюдалось понижение уровней каталазы. При этом чаще отмечалось повышение уровней церулоплазмينا в старшей возрастной группе. На третьей неделе болезни на фоне угасания клинических проявлений болезни у большинства больных коксиделлезом наблюдалось повышение содержания изучаемых показателей, что свидетельствует о компенсаторной активации АОЗ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Добротина Н.А., Рутницкий А.Ю., Кузьмина Е.И. Иммуномодулирующая активность и полифункциональность церулоплазмينا // Иммунология. — 1998. — № 5. — С. 49 — 50.
2. Метод определения активности каталазы / М.А. Корольюк [и др.] // Лабораторное дело. — 1988. — № 8. — С. 16 — 19.
3. Ravin X.A. An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin // J. Lab. Clin. Med. — 1961. — Vol. 58. — P. 161 — 168.

Сведения об авторах

Карпенко Светлана Федоровна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник клинко-иммунологической лаборатории НИИ краевой инфекционной патологии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (414004, г. Астрахань, Покровская роща, ул. 2-я Загородная, 2а; тел. 89275647753; e-mail: carpenko.swet@yandex.ru)

Галимзянов Халил Мингалиевич — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121; тел. (8512) 44-74-96; e-mail: agma@astranet.ru)

Касимова Нина Борисовна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая клинко-иммунологической лабораторией НИИ краевой инфекционной патологии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (414004, г. Астрахань, Покровская роща, ул. 2-я Загородная, 2а; тел. (8512) 38-50-66)

С.Ф. Карпенко

ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ МИГРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ С ЛЕГОЧНЫМ ЭКСТРАКТОМ У БОЛЬНЫХ КОКСИЕЛЛЕЗОМ

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» (Астрахань)

Представлены результаты клинического наблюдения и обследования 41 больного со среднетяжелым течением коксиеллеза в возрасте от 17 до 48 лет (39 мужчин и 2 женщины). У больных коксиеллезом в динамике болезни и у 30 доноров определяли гиперчувствительность замедленного типа в реакции торможения миграции лейкоцитов с легочным экстрактом. 29,3 % пациентов предъявляли жалобы на чувство стеснения в груди и кашель. Аускультативно отмечалось жесткое дыхание у 65,9 % больных коксиеллезом, сухие и влажные хрипы — у 19,5 % пациентов. Рентгенологические исследования подтвердили наличие у 9,8 % больных бронхита и у 2,4 % — пневмонии. Формирование гиперчувствительности замедленного типа зависело от периода болезни. Торможение миграции лейкоцитов отмечалось на первой, второй и третьей неделях заболевания у 25,0, 35,3 и 50,0 % больных, что свидетельствует о формировании клеточной аутоенсибилизации к легочной ткани при коксиеллезе.

Ключевые слова: коксиеллез, аутоенсибилизация, иммунитет, легкие

HYPERSENSITIVITY OF THE SLOW-TYPE REACTION OF STOPPING MIGRATION OF THE LEUCOCYTES WITH PULMONARY EXTRACT IN THE PATIENTS WITH COXIELLOSIS

S.F. Karpenko

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan

The results of clinical follow-up and examination of 41 patients with average-severe course of coxiellosis at the age of 17–48 years (39 males and 2 females) are presented in this study. Hypersensitivity of the slow-type reaction of stopping of migration of leucocytes with pulmonary extract has been discovered in the patients with coxiellosis in dynamics and in 30 donors. 29,3 % patients complained on tightness in the chest and cough. Auscultation revealed hard breathing in 65,9 % patients with coxiellosis, dry and moist rattles in 19,5 % patients. X-ray examinations confirmed the presence of bronchitis in 9,8 % patients and pneumonia — 2,4 %. Formation of hypersensitivity of the slow-type depended on the period of the disease. Stopping of migration of leucocytes has been noted at the first, second and third weeks of the disease in 25,0, 35,3 and 50,0 % patients, which shows the formation of the cellular autosensibilisation the pulmonary tissue under coxiellosis.

Key words: coxiellosis, autosensibilisation, immunity, lungs

Коксиеллез (лихорадка Ку) является единственным представителем четвертой группы пневмотропных риккетсиозов, хотя суждения о поражении легких при коксиеллезе весьма спорны [2]. Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) — это аллергическая реакция IV типа, которая запускается после взаимодействия сенсibilизированных Т-лимфоцитов с антигенами и представляет собой особый способ элиминации разнообразных внутриклеточных микроорганизмов. Определение Т-клеточно-опосредованной миграционной активности лейкоцитов в реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) является одним из основных тестов выявления функциональной активности Т-клеток. Торможение миграции лейкоцитов может быть весьма значительным при состоянии повышенной активности лимфоцитов. Если Т-лимфоциты не сенсibilизированы к данному антигену, реакции торможения не происходит. Тест характеризует активность воспалительного процесса [3]. В доступной литературе не освещен вопрос об особенностях клеточного звена аутоиммунной аллергии у больных коксиеллезом.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей формирования ГЗТ в РТМЛ с легочным экстрактом при коксиеллезе в зависимости от периода заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находился 41 больной со среднетяжелым течением коксиеллеза в возрасте от 17 до 48 лет (39 мужчин и 2 женщины), госпитализированных в ГБУЗ АО «Областная инфекционная клиническая больница им. А.М. Ничоги» в 2006–2012 гг. Средний возраст обследованных составил $32,7 \pm 1,1$ лет. Диагноз коксиеллеза подтверждался эпидемиологическим анамнезом, клиническими данными и результатами иммуноферментного анализа для выявления антител классов М и G к антигенам коксиелл Бернета и полимеразной цепной реакции для определения специфических последовательностей нуклеиновых кислот возбудителей коксиеллеза.

Все больные коксиеллезом получали этиотропное, патогенетическое и симптоматическое лечение. В качестве этиотропной терапии назначался доксициклин по общепринятой схеме (в первый день по 0,2 г, затем по 0,1 г однократно) в течение $8,0 \pm 0,1$ дней. При отсутствии эффекта в течение 2–3 дней при пероральном назначении доксициклина, его назначали парентерально внутривенно. Кроме этого, больные получали жаропонижающие и антигистаминные средства, витамины, спазмолитики, ферментные препараты. Дезинтоксикационную терапию проводили в объеме 1,0–1,5 л

в сутки внутривенным капельным введением кристаллоидных растворов и 5% раствора глюкозы. Клиническое наблюдение и обследование больных коксидиозом проводилось в динамике на первой — третьей неделях заболевания.

Материалом исследования служила венозная кровь, забираемая в утренние часы.

В качестве контрольной группы было обследовано 30 доноров.

Для изучения особенностей формирования ГЗТ к ткани легкого у больных коксидиозом проводили реакцию торможения миграции лейкоцитов по методу J. Clausen в модификации Т. Тогге в агаровой среде [4]. Использовали легочный экстракт, полученный по методу М.И. Китаева [1]. Учет реакции проводили под микроскопом МБС 2 при увеличении в 16 раз с помощью окуляр-микрометра. Измеряли диаметры зон миграции лейкоцитов. Результаты реакции оценивали по соотношению площадей миграции в присутствии антигена и без него в виде индекса миграции (ИМ) по стандартной формуле. Контролем качества постановки реакции служила спонтанная миграция. Увеличение площади миграции по сравнению с контролем свидетельствовало об ускорении миграции, уменьшение — о торможении. Относительный индекс миграции (ИМ) менее 80 % и более 100 % учитывали в виде положительного результата реакции.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи программы Microsoft Excel. Определяли среднюю арифметическую (M), среднюю ошибку средней арифметической (m). Для оценки статистической значимости различий между сопоставляемыми средними величинами использовали критерий Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, больные поступали в стационар на 1–2 неделях болезни ($6,0 \pm 0,2$ день). Одними из ведущих были жалобы на слабость и лихорадку (100 %). У большинства пациентов наблюдалась ремиттирующая (85,4 %), реже интермиттирующая (10,4 %) и постоянная (4,2 %) лихорадка. Длительность лихорадочного периода варьировала от 5 до 21 дня и в среднем составила $13,5 \pm 0,8$ дней. В течение 1 недели лихорадка регистрировалась у 17,1 % заболевших, до 2 недель — у 48,8 %. В разгар болезни наблюдалась лихорадка до $39–40^\circ\text{C}$. На $13,0 \pm 0,5$ день болезни в среднем отмечалось снижение температуры до субфебрильных цифр. Субфебрилитет сохранялся от 2 до 8 дней.

29,3 % пациентов предъявляли жалобы на чувство стеснения в груди и кашель, сухой или с мокротой. Аускультативно отмечалось жесткое дыхание у 65,9 % больных коксидиозом, сухие и влажные хрипы — у 19,5 % пациентов. Рентгенологические

исследования подтвердили наличие у 9,8 % больных бронхита и у 2,4 % — пневмонии.

Установлено, что на первой неделе заболевания у 75,0 % больных коксидиозом выявлялось ускорение миграции лейкоцитов, ИМ достигал $120,6 \pm 1,4$ %. А торможение миграции лейкоцитов выявлялось лишь у 25,0 % пациентов. ИМ был равен $43,1 \pm 1,6$ %.

На второй неделе заболевания частота обнаружения торможения миграции лейкоцитов увеличивалась до 35,3 %, ИМ достигал $51,8 \pm 1,5$ %. У 52,9 % пациентов наблюдалось ускорение миграции лейкоцитов. ИМ был равен $133,6 \pm 2,9$ % и в 1,1 раза превышал аналогичный показатель в предыдущий период заболевания ($p < 0,001$). У 11,8 % больных аутоаллергии замедленного типа к легочной ткани не выявлялось, и ИМ не отличался от такового у доноров.

На третьей неделе заболевания у 50,0 % больных коксидиозом отмечалось торможение миграции лейкоцитов. Торможение миграции лейкоцитов в данный период встречалось в 2 раза чаще, чем на первой неделе заболевания ($p < 0,05$). ИМ достигал $61,5 \pm 0,1$ % и был в 1,4 и 1,2 раза выше аналогичного показателя на первой и второй неделях заболевания ($p < 0,001$). У 50,0 % пациентов показатели ГЗТ не отличались от контрольных значений. Нормальные показатели миграционной активности лейкоцитов встречались на третьей неделе заболевания в 4,2 раза чаще, чем на второй неделе ($p < 0,05$).

Таким образом, РТМЛ позволяет определить антигены, к которым сенсибилизированы Т-лимфоциты и, следовательно, может использоваться в выявлении органоспецифической гиперчувствительности замедленного типа. Показатели РТМЛ с легочным экстрактом отражали уровень клеточной аутоенсибилизации при коксидиозе и зависели от периода заболевания. Торможение миграции лейкоцитов отмечалось на первой, второй и третьей неделях заболевания у 25,0 %, 35,3 % и 50,0 % больных, что свидетельствует о формировании клеточной аутоенсибилизации к легочной ткани при коксидиозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Китаев М.И., Лехтман С.М. Тканевая терапия при токсикозе беременных // Акушерство и гинекология. — 1973. — № 9. — С. 15–17.
2. Лобан К.М., Лобзин Ю.В., Лукин Е.П. Риккетсиозы человека. — М.-СПб.: Изд.-во ЭЛБИ — СПб., 2002. — 397 с.
3. Юдина Ю.В., Белая О.Ф. Прогностическое значение показателей миграционной активности лейкоцитов у больных рожей // Клинич. лабор. диагн. — 2008. — № 5. — С. 47–49.
4. Clausen J.E. Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium // Acta Allergol. — 1971. — Vol. 26. — P. 56–80.

Сведения об авторах

Карпенко Светлана Федоровна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник клинко-иммунологической лаборатории НИИ краевой инфекционной патологии ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (414004, г. Астрахань, Покровская роща, ул. 2-я Загородная, 2а; тел. 89275647753; e-mail: carpenko.swet@yandex.ru)

Н.М. Корецкая, А.Н. Наркевич

**ПЕРВИЧНАЯ МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ
МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА ПО ДАННЫМ СТАЦИОНАРА КРАСНОЯРСКОГО
КРАЕВОГО ПРОТИВТУБЕРКУЛЕЗНОГО ДИСПАНСЕРА № 1****ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф.
В.Ф. Войно-Ясенецкого» (Красноярск)**

Изучение частоты множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) показало, что в 2011 г. она наблюдалась у 28,4 % бактериовыделителей с впервые установленным туберкулезом легких, среди которых преобладали мужчины (70,1 %), сельские жители (57,7 %), неработающие лица трудоспособного возраста (56,7 %). Структура клинических форм у больных с МЛУ МБТ характеризовалась высоким удельным весом диссеминированного (39,2 %), инфильтративного (44,3 %) туберкулеза, казеозной пневмонии (7,2 %); преобладали распространенные процессы с массивным бактериовыделением в 55,6 % случаев, что в значительной мере обусловлено нарушением декретированных сроков флюорообследования. У 45,3 % больных МЛУ сочеталась с устойчивостью к другим противотуберкулезным препаратам основного ряда; в 54,7 % случаев к этому сочетанию добавлялась еще и устойчивость к препаратам резервного ряда. Сделано заключение о нецелесообразности применения первого режима химиотерапии впервые выявленным больным туберкулезом легких в современных условиях.

Ключевые слова: туберкулез легких, множественная лекарственная устойчивость, противотуберкулезные препараты, режимы химиотерапии

**PRIMARY MULTIDRUG RESISTANCE OF TUBERCULOSIS MYCOBACTERIUM
ACCORDING TO DATA OF KRASNOYARSK REGIONAL TUBERCULOSIS DISPENSARY
№ 1 IN-PATIENT DEPARTMENT**

N.M. Koretskaya, A.N. Narkevich

«Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky», Krasnoyarsk

This study of multidrug resistance (MDR) of tuberculosis mycobacterium (TMB) frequency has revealed that in 2011 28,4 % persons discharging bacteria with newly diagnosed pulmonary tuberculosis had multidrug resistance of tuberculosis mycobacterium and among them are (70,1 %), rural population (57,7 %), non-workers of employable age (56,7 %) prevailed. Among patients with multidrug resistance (MDR) of tuberculosis mycobacterium (TMB) there was a great proportion of patients with disseminated tuberculosis (39,2 %), infiltrative tuberculosis (44,3 %), caseous pneumonia (7,2 %); there were 55,6 % of cases with profuse bacterioexcretion due to the violation of the Chest X-ray examination terms. 45,3 % of patients with multidrug resistance also had resistance to other essential antituberculosis drugs; in 54,7 % cases besides combination of this resistance there was also the rescue therapy drug resistance. Medical comment was made that under modern conditions it is not advisable to use chemotherapy of the first mode with patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis.

Key words: pulmonary tuberculosis, multidrug resistance, antituberculosis drugs, modes of chemotherapy

Последние два десятилетия в нашей стране характеризуются неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по туберкулезу, проявившейся высокими показателями заболеваемости и смертности от этого заболевания, ростом доли острых и жизнеугрожающих форм. Положение усугубляется снижением эффективности лечения, связанным не только с ухудшением структуры заболеваемости, но и с ростом случаев с лекарственной устойчивостью (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ), особенно множественной (МЛУ). Туберкулез, вызванный МБТ с МЛУ, является наиболее опасной формой болезни, ибо при этом имеется ЛУ к наиболее сильным противотуберкулезным препаратам: изониазиду и рифампицину, независимо от наличия или отсутствия ЛУ к другим препаратам.

Лечение такого туберкулеза требует больше времени, а применяемые при этом противотуберкулезные препараты являются дорогостоящими и имеют больше побочных эффектов, что увеличивает стоимость лечения в 80–100 раз [2, 3]. Не

выявленные и оставшиеся без лечения больные с МЛУ МБТ становятся постоянным источником распространения ЛУ-штаммов возбудителя, что в последствии приводит к дополнительным расходам и летальности от туберкулеза [3].

В этой связи в резолюции IX съезда фтизиатров России, состоявшегося 1–3 июня 2011 г. в г. Москве, отмечена необходимость разработки оптимальных режимов химиотерапии больных туберкулезом с учетом ЛУ возбудителя [4], рост которой, особенно МЛУ, является одной из главных проблем современной фтизиатрии. Россия входит в число 27 стран, в которых находится 86 % всех случаев МЛУ-туберкулеза в мире и которые, согласно оценке ВОЗ, являются приоритетными с точки зрения необходимости улучшения диагностики и ведения случаев такого туберкулеза [5].

Следует отметить, что на территории Сибири и Дальнего Востока имеет место самый высокий уровень регистрируемого числа случаев МЛУ-туберкулеза среди впервые выявленных больных

(7,2 и 8,2 на 100 000 населения) [5], что отражает относительно высокий риск заражения МЛУ МБТ в этих регионах и делает актуальной изучение данной проблемы.

Цель исследования: изучить частоту МЛУ МБТ и ее сочетаний с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда среди впервые выявленных больных туберкулезом легких, проанализировать их клинико-социальную характеристику, пути и своевременность выявления заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В разработку взяты данные из историй болезни 341 больного туберкулезом легких, в возрасте от 16 до 69 лет, находившихся на стационарном лечении в Красноярском краевом противотуберкулезном диспансере № 1 (ККПТД № 1) в 2011 г.

Все больные были впервые выявлены и являлись бактериовыделителями. Бактериовыделение установлено посевом мокроты на питательную среду Левенштейна – Йенсена.

Исследование лекарственной чувствительности штаммов МБТ проводилось стандартным непрямой методом абсолютных концентраций к изониазиду (H), рифампицину (R), стрептомицину (S), этамбутолу (E), протионамиду (Pt), канамицину (K) и офлоксацину (OfI).

По результатам определения лекарственной чувствительности были отобраны истории болезни пациентов, выделяющих МБТ с МЛУ (97 чел.). Анализировался возрастно-половой и социальный состав больных, структура клинических форм и характеристика специфического процесса, пути его выявления; сроки флюорообследования (ФЛГО), предшествующего выявлению заболевания; определялась частота сочетания МЛУ МБТ с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам основного (S, E) и резервного (Pt, K, OfI) ряда.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты исследования, первичная МЛУ МБТ была установлена у 97 больных (28,4 %), т.е. почти у каждого третьего, лечившегося в 2011 г. в ККПТД № 1. Среди больных с МЛУ МБТ преобладали мужчины (70,1 %) и сельские жители (57,7 %). В возрасте 16 – 19 лет было 4,1 % больных; 20 – 29 и 30 – 39 лет – по 25,8 %; 40 – 49 лет – 22,7 %; 50 – 59 лет – 16,5 %; 60 – 69 лет – 5,2 %, т.е. большую долю составляли лица трудоспособного возраста.

По социальному статусу наибольший удельный вес имели неработающие лица трудоспособного возраста – 56,7 %; на лиц рабочих профессий приходилось 23,7 %; служащих – 4,1 %, из которых 3/4 – медицинские работники; пенсионеров было 7,2 %, инвалидов – 4,1 %, учащихся – 2,1 %; предприниматели и лица БОМЖ составили по 1 %.

В структуре клинических форм преобладали инфильтративный (44,3 %), диссеминированный (39,2 %) туберкулез легких; казеозная пневмония, туберкулема, милиарный и фиброзно-кавернозный туберкулез составили соответственно: 7,2, 6,2, 2,1,

1,0 %. У большинства больных наблюдались распространенные поражения: долевые – 19,6 % и более доли – 55,7 %, в том числе с тотальным поражением легких – 27,8 %. Распад легочной ткани констатирован у 72,2 % больных.

Заболевание чаще выявлялось при обращении (52,6 %). Необходимо отметить, что лишь 44,3 % обследовались флюорографически в декретированные сроки (до 2-х лет); от 2-х до 3-х лет не проходили обследование 18,6 %, более 3-х лет – 37,1 %.

Сопоставляя структуру клинических форм и характеристику процесса с этими сроками, а также путями выявления заболевания, мы пришли к заключению, что в значительной части случаев имело место довольно длительное течение туберкулеза, а данные больные, выделяющие МБТ с МЛУ, продолжительное время до выявления заболевания представляли высокую эпидемиологическую опасность для окружающих. Доказательством последнего является и тот факт, что у 55,6 % больных бактериовыделение определялось не только методом посева, но и люминесцентной микроскопией, т.е. они являлись массивными бактериовыделителями. В этой связи недостаточный охват массовыми ФЛГО населения, который в Красноярском крае в 2011 г. составил лишь 56 %, нарушение декретированных сроков его прохождения не позволяют осуществить своевременное выявление малых форм туберкулеза с отсутствием бактериовыделения и, тем самым, позитивно влиять на эпидемиологическую ситуацию в регионе.

В спектре МЛУ МБТ устойчивость к противотуберкулезным препаратам основного ряда была наиболее высока (S – 97,9 %, E – 82,5 %); к препаратам резервного ряда она была хотя и ниже, но ее показатели оказались достаточно высокими (K – 39,2 %, Pt – 37,1 %, OfI – 16,5 %).

В структуре МЛУ МБТ, представленной в таблице 1, обращает внимание отсутствие устойчивости только к H и R: во всех случаях имеется сочетание устойчивости к этим препаратам с устойчивостью к другим препаратам основного ряда (45,3 %) либо с совместной устойчивостью к препаратам основного и резервного ряда (54,7 %). При этом наибольший удельный вес составили комбинации: HRSEK (15,6 %), HRSEPt (12,4 %), HRSEKPt и HRSEKPtOfI (по 10,3 %).

Устойчивость к комбинации HRSE, составляющей практически ядро химиотерапии по первому режиму и ее сочетание с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам резервного ряда, была наивысшей – 80,4 %. Это вызывает крайнюю обеспокоенность и сомнение в целесообразности лечения впервые выявленных больных с бактериовыделением по данному режиму химиотерапии, включающему только препараты основного ряда, ибо это может привести к амплификации устойчивости и неэффективности проводимой терапии. Особенно необходимо констатировать сочетание МЛУ с устойчивостью к одному из инъекционных препаратов резервного ряда (K) и фторхинолонам (OfI), которая расценивается как обширная лекар-

ственная устойчивость, и она, по нашим данным, имела место в 13,3 % случаев. Как известно, при такой ЛУ МБТ наблюдаются самые низкие показатели негативации мокроты [1].

Таблица 1
Первичная МЛУ МБТ по сочетаниям
противотуберкулезных препаратов (абс, %)

Сочетание МЛУ с ПТП основного и резервного ряда	ЛУ МБТ	Количество больных	
		абс.	%
МЛУ + ЛУ к ПТП основного ряда	HRS	16	16,5
	HRE	1	1,0
	HRSE	27	27,8
Итого		44	45,3
МЛУ + ЛУ к ПТП основного и резервного ряда	HRSEK	15	15,6
	HRSEPt	12	12,4
	HRSEOfi	1	1,0
	HRSEKPt	10	10,3
	HRSEKOfi	1	1,0
	HREKPtOfi	1	1,0
	HRSEPtOfi	2	2,1
	HRSKPtOfi	1	1,0
	HRSEKPtOfi	10	10,3
Итого		53	54,7
Всего		97	100,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2011 г. у впервые выявленных больных туберкулезом легких, лечившихся в ККПТД № 1, первичная МЛУ МБТ наблюдалась в 28,4 % случаев. Среди больных, выделяющих МБТ с МЛУ, преобладали мужчины (70,1 %), сельские жители (57,7 %), лица трудоспособного возраста, в 56,7 % неработающие. Констатирована тяжелая структура клинических форм впервые выявленного туберкулеза с МЛУ МБТ: диссеминированный

— 39,2 %, инфильтративный — 44,3 %, казеозная пневмония — 7,2 %, с выраженным преобладанием распространенных (доля и более) поражений (75,3 %), в том числе с тотальным поражением обоих легких в 27,8 % случаев, сопровождающихся распадом легочной ткани в 72,2 % и массивным бактериовыделением в 55,6 %, что в значительной мере обусловлено нарушением декретированных сроков прохождения ФЛГО. В 45,3 % МЛУ МБТ сочеталась с устойчивостью к другим противотуберкулезным препаратам основного, а в 54,7 % к препаратам основного и резервного ряда; в 13,3 % определена обширная ЛУ МБТ. Полученные данные свидетельствуют о нецелесообразности назначения первого режима химиотерапии впервые выявленным больным туберкулезом легких в современных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комиссарова О.Г., Абдулаев Р.Ю., Ерохин В.В. Эффективность комплексного лечения больных туберкулезом легких при разном спектре лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // XXI Национальный конгресс по болезням органов дыхания. — Уфа, 2011. — С. 237.
2. Маркелов Ю.М. Затраты на лечение на лечение больных лекарственно-устойчивым туберкулезом // XIX Национальный конгресс по болезням органов дыхания. — М., 2009. — С. 335—336.
3. Матиян Н.С., Скачкова Е.И. Множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза как глобальная проблема общественного здоровья // Бюллетень Программы ВОЗ по борьбе с туберкулезом в Российской Федерации. — 2009. — Вып. 8. — С. 13—21.
4. Резолюция IX съезда фтизиатров России. 1—3 июня 2011 г., г. Москва // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — № 8. — С. 4—6.
5. Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. — М., 2011. — 280 с.

Сведения об авторах

Корецкая Наталия Михайловна — зав. кафедрой туберкулеза с курсом ПО, профессор ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 261-76-82, факс (391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Наркевич Артем Николаевич — клинический ординатор кафедры туберкулеза с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. 8(391) 261-76-82, факс (391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

О.А. Лисовская

МИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА, ДЫХАТЕЛЬНОЙ И МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМ

ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» (Иркутск)

В работе приведены результаты микологических исследований биоматериалов, взятых при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем, которые проводились в клинко-диагностической лаборатории на базе муниципального бюджетного учреждения здравоохранения «Нижнеудинская центральная районная больница» в период с 2006 по 2010 гг. Элементы гриба были выявлены при гастритах (в 15–30 % случаев), злокачественных новообразованиях (5–30 %), язвенной болезни двенадцатиперстной кишки (3–12 %), при заболеваниях органов дыхания (9–14 %). При обследовании женщин в связи с диспансеризацией количество случаев обнаружения грибов рода *Candida* в гинекологических мазках составило 12–15 %, у обратившихся в женскую консультацию – 19–28 % (здоровые небеременные) и 14–32 % (беременные женщины).

Ключевые слова: микологические исследования, грибы рода *Candida*, Нижнеудинский район

MYCOLOGICAL STUDYING DURING VARIOUS DISEASES OF GASTROINTESTINAL, RESPIRATORY AND UROGENITAL SYSTEMS

O.A. Lisovskaya

Irkutsk State University, Irkutsk

The results of mycological studies of variety of biosamples during gastrointestinal, respiratory and genitourinary diseases in different patients we analyzed during the period from 2006 to 2010 years. Different types of fungi were found at gastritis (15–30 % of cases), gastric cancers (5–30 %), duodenal ulcer (3–12 %), diseases of the respiratory system (9–14 %). In the cases of prophylactic gynecological evaluations the fungi were found in 12–15 % of women; among these 19–28 % were healthy non-pregnant women and 14–32 % healthy pregnant women.

Key words: mycological studying, *Candida*, Nizhneudinsk

Грибковые инфекции в настоящее время являются одной из важнейших проблем здравоохранения. Из потенциальных «болезней будущего» они превратились в актуальные «болезни настоящего» [1]. Среди микотических инфекций одно из ведущих мест занимает кандидоз. Заболеваемость кандидозом растет во всем мире, и это связывают с широким применением антибактериальных препаратов, гормональных средств, цитостатиков, также с увеличением спектра заболеваний, создающих благоприятный фон для развития кандидоза (заболевания кроветворных органов, эндокринные дисфункции, иммунодефицитные состояния, злокачественные новообразования, радиационные поражения, ВИЧ-инфекция и др.).

Цель данной работы заключалась в проведении микологических исследований биоматериалов, взятых при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, дыхательной и мочеполовой систем.

Исследования проводились в клинко-диагностической лаборатории на базе муниципального бюджетного учреждения здравоохранения (МБУЗ) «Нижнеудинская центральная районная больница» в период с 2006 по 2010 гг.

МЕТОДИКА

Объектами исследования являлся патологический биоматериал, взятый у пациентов, находящихся на стационарном лечении в МБУЗ

«Нижнеудинская центральная районная больница»; мазки, взятые у женщин в связи с диспансеризацией, и женщин, обратившихся за помощью в гинекологическую и акушерскую службы.

В зависимости от характера и локализации поражения для лабораторного анализа берут: мокроту; соскобы с кожи или слизистых оболочек; ногтевые чешуйки; кровь, ликвор, мочу, желчь, фекалии; пунктаты из закрытых полостей, отделяемое свищей; биопсированный и секционный материал.

Для выявления грибов рода *Candida* применяют микроскопический, культуральный, серологический методы. Первоначально микроскопируют патологический материал (соскобы со слизистых оболочек, кожи, ногтевые чешуйки, ликвор, пунктаты закрытых полостей, срезы тканей, мочу после центрифугирования). Обнаружение в этом материале мицелия или псевдомицелия грибов *Candida* указывает на наличие инвазивного кандидозного процесса. Срезы из полученных биопсий изучают с помощью электроктивных окрасок, позволяющих выявить и частично идентифицировать грибы в тканях, а также учесть характер ответной тканевой реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с 2006 по 2010 гг. в МБУЗ «Нижнеудинская центральная районная больница» с жалобами на дискомфорт и/или боль в

эпигастральной области обратились 3235 человек. Этим пациентам были проведены различные исследования, в том числе ФГДС, был взят материал для микроскопического исследования, при этом в 105 случаях (3 % от общего количества обследованных) были обнаружены элементы гриба.

Грибковые поражения как сопутствующая патология при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) чаще встречались в зрелом и пожилом возрасте (40 лет и более). Так, при гастритах и раках ЖКТ различной локализации кандидозы были выявлены в 30 % случаев, при язвенной болезни — в 12 % случаев (табл. 1).

Цитологическая картина была типичной для указанных заболеваний (гастриты, рак различной локализации, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (ДПК), другие заболевания желудка и ДПК). При этом в препарате отмечали элементы гриба (дрожжевая фаза, реже мицелиальная) — единичные, если заселение грибом данного биотопа только начинается, или в больших количествах при длительно текущих заболеваниях и запущенных случаях.

В период 2006 — 2010 гг. в МБУЗ «Нижнеудинская центральная районная больница» находились на лечении и проходили обследование по поводу заболеваний органов дыхания 5108 человек. При микроскопическом исследовании мокроты было выявлено 578 случаев обнаружения элементов гриба (11 % от общего количества обследованных за период 2006 — 2010 гг.).

В последние годы наблюдается тенденция увеличения заболеваемости верхних дыхательных путей, что связано с недостаточно качественным лечением и переходом заболеваний в хроническую

форму, что приводит к снижению иммунного статуса человека, а также с ухудшением экологической обстановки. Та же тенденция характерна для грибковых поражений, как сопутствующей патологии. Так, в 2006 г. количество случаев выявления грибов при заболеваниях верхних дыхательных путей составляло 9 % от общего числа обследованных, а в 2008 и 2009 гг. увеличилось до 11 и 14 %, соответственно (табл. 2).

При заболеваниях верхних дыхательных путей мокрота исследуется неоднократно, так как в конце лечения делается заключение об эффективности проводимой терапии. У 29 % пациентов после проведенного лечения в мазках мокроты по-прежнему обнаруживались элементы гриба. Следовательно, проведенная терапия не всегда эффективна по отношению к грибам, что требует дополнительных специфических исследований — культуральных, серологических методов и ПЦР-диагностики для определения вида возбудителя и подбора лекарственных препаратов, действующих именно на этот вид.

В период с 2006 по 2010 гг. в клинко-диагностической лаборатории МБУЗ «Нижнеудинская центральная районная больница» было исследовано 7352 гинекологических мазка, взятых при обследованиях женщин разных возрастов в связи с диспансеризацией, а также женщин, обратившихся за помощью в гинекологическую и акушерскую службу. В 998 мазках обнаружены элементы гриба, что составляет около 14 % от всего количества исследованных мазков. Заболеваемость кандидозом в последние два года (2009 — 2010 гг.) снизилась, что, вероятно, является следствием более полного обследования населения и ранней диагностики (табл. 3).

Таблица 1
Случаи выявления кандидозов как сопутствующей патологии при заболеваниях ЖКТ (2006–2010 гг.)

Диагноз	Случаи выявления кандидоза, %			
	Пол		Возраст	
	Мужчины	Женщины	до 40 лет	40 лет и более
Гастриты	15	25	15	30
Раки различной локализации	25	15	5	30
Язвенная болезнь ДПК	5	10	3	12
Другие заболевания желудка и ДПК	4	1	3	2

Таблица 2
Обнаружение элементов гриба в мокроте при заболеваниях органов дыхания (2006–2010 гг.)

Годы	Количество проведенных исследований	Обнаружение грибов рода <i>Candida</i>	
		Количество выявленных случаев	% выявленных случаев
2006	958	88	9
2007	920	71	8
2008	1072	121	11
2009	1126	163	14
2010	1032	135	13

Таблица 3
Обнаружение грибов рода *Candida* в мазках в ходе диспансеризации населения (2006–2010 гг.)

Годы	Всего исследовано мазков	Обнаружение грибов рода <i>Candida</i>	
		Количество выявленных случаев	% выявленных случаев
2006	1338	195	15
2007	1452	211	15
2008	1565	231	15
2009	1428	178	13
2010	1569	183	12

Таблица 4
Результаты обследования женщин, обратившихся в женскую консультацию в период 2006–2010 гг.

Причины обращения	Возрастные группы	Количество обследований	Обнаружение грибов рода <i>Candida</i>	
			Количество выявленных случаев	% выявленных случаев
Плановое обследование женщин	до 25 лет	6741	1286	19
	25–40	7954	1829	23
	после 40	6813	1938	28
Беременность	до 25 лет	1570	235	14
	25–40	2962	563	19
	после 40	538	169	32
Случаи обращения с жалобами	до 25 лет	9331	2705	29
	25–40	7044	2101	30
	после 40	1112	741	67

Таблица 5
Результаты исследования гинекологических мазков, доставляемых из роддома и отделения гинекологии в период 2006–2010 гг.

Случаи обращения	Годы	Количество обследованных	Обнаружение грибов рода <i>Candida</i>	
			Количество выявленных случаев	% выявленных случаев
Беременность	2006	986	104	11
	2007	970	93	10
	2008	1003	116	12
	2009	1014	113	11
	2010	1097	137	13
Плановое лечение	2006	568	19	3
	2007	736	14	2
	2008	695	25	4
	2009	699	21	3
	2010	732	26	4
Воспалительные заболевания	2006	944	87	9
	2007	895	63	7
	2008	951	86	9
	2009	1028	116	11
	2010	1208	128	11
Онкология	2006	–	–	–
	2007	3	1	33
	2008	1	–	–
	2009	4	–	–
	2010	6	2	33

В ходе обследования женщин, обратившихся в женскую консультацию в период с 2006 по 2010 г., выявлено следующее. В составе сапрофитной микрофлоры влагалища грибы рода *Candida* обнаруживались у 19–28 % здоровых небеременных и у 14–32 % беременных женщин. Кандидозный вульвовагинит, вызванный *Candida albicans*, широко распространен среди женщин, принимающих пероральные или использующих внутриматочные контрацептивы, либо находящихся в III триместре беременности (состояние опосредовано иммунодепрессивным действием высоких концентраций прогестерона и фактора, связанного с α -глобулином сыворотки). Большинство женщин страдают от спорадических редких эпизодов вульвовагинального кандидоза, наиболее распространенным предрасполагающим фактором является применение антибиотиков. Также большое значение для развития кандидозного вульвовагинита, вызванного *C. albicans*, имеет возраст женщины (табл. 4).

В период с 2006 по 2010 гг. проводились исследования материала (гинекологические мазки), доставляемого из роддома и отделения гинекологии в клинко-диагностическую лабораторию МБУЗ «Нижнеудинская центральная районная больница». У беременных женщин грибы рода *Candida* обнаруживались в составе сапрофитной микрофлоры влагалища в 10–13 % случаев, у жен-

щин, проходящих плановое лечение, — в 2–4 % случаев, при воспалительных заболеваниях — в 7–11 % случаев (табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что количество случаев выявления элементов гриба при различных заболеваниях желудочно-кишечного тракта составляло 3 % от общего числа обследованных, органов дыхания — 11 %.

При обследовании женщин в ходе диспансеризации (2006–2010 гг.) количество случаев обнаружения грибов рода *Candida* в гинекологических мазках составило 12–15 %. У женщин, обратившихся в женскую консультацию, грибы рода *Candida* выявлены у 19–28 % здоровых небеременных и у 14–32 % беременных женщин. Исследование гинекологических мазков, доставляемых из роддома и отделения гинекологии, показало, что наиболее часто грибы рода *Candida* встречались у беременных женщин (10–13 % случаев) и женщин с воспалительными заболеваниями (7–11 % случаев).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dupont B. Les Champignons du XXI sieele / B. Dupont // J. Mycol. Med. — 1993. — Vol. 3, N 4. — P. 193–195.

Сведения об авторе

Лисовская Ольга Алексеевна – магистрант биолого-почвенного факультета ИГУ, фельдшер-лаборант клинко-диагностической лаборатории Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения «Нижнеудинская центральная районная больница» (665106, Иркутская область, г. Нижнеудинск, ул. Кашика, д. 61, кв. 55; тел. 89021748735; e-mail: arinoris@rambler.ru)

Е.И. Лиханская, Л.В. Пожалостина, Л.В. Феклисова, Н.М. Бочкарева

ВЫЯВЛЕНИЕ КРИПТОСПОРИДИЙ И ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (Москва)
Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (Москва)

В работе представлены результаты обследования 106 детей, больных острыми кишечными инфекциями на наличие криптоспоридий и состояния микрофлоры кишечника. Ооцисты криптоспоридий были обнаружены у 31 (29,2 %) обследованного ребенка, в основном в возрасте до 3-х лет. При этом выявлен дисбактериоз II–III степени у 92,5 % больных. После проведенного комплексного лечения с включением в терапию пробиотиков, содержащих лактобактерии, значительно уменьшилось выделение криптоспоридий – 6 (5,7 %), и улучшилось состояние микрофлоры кишечника – дисбактериоз II–III степени составил 36,8 %. Полученные результаты показали эффективность при лечении детей, больных ОКИ, пробиотиков, содержащих лактобактерии, для нормализации микрофлоры кишечника и эрадикации криптоспоридий.

Ключевые слова: криптоспоридии, микрофлора, кишечные инфекции

DETECTION OF CRYPTOSPORIDIUM AND CHARACTERIZATION OF THE INTESTINAL MICROFLORA IN CHILDREN WITH ACUTE INTESTINAL INFECTIONS

E.I. Likhanskaya, L.V. Pozhalostina, L.V. Feklisova, N.M. Bochkareva

Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky, Moscow
Moscow Regional Research Clinical Institute named after M.F. Vladimirovsky, Moscow

This paper presents results, which were obtained during investigation of 106 children with acute intestinal infections in order to determine the presence of cryptosporidia and to evaluate their intestinal microbial status. The cryptosporidia's oocysts were found in 31 of children (29,2 %) that were mainly under the 3 age old. At the same time the authors found the dysbacteriosis of the second and third degrees in 92,5 % of patients. Six patients (5,7 %) became cryptosporidium negative and improved their intestinal microbial status. The obtained results showed that lactobacterias containing probiotics are effective in treatment of children with acute intestinal infections for normalizing of intestinal biocenosis and to eradicate cryptosporidia.

Key words: cryptosporidia, microflora, intestinal infections

В последние десятилетия отмечается значительное изменение этиологической структуры острых кишечных заболеваний (ОКИ) в сторону возрастания роли условно-патогенных и мало изученных возбудителей, среди которых важное место занимает криптоспоридиоз [2, 6, 9].

Возрастание роли условно-патогенных возбудителей в возникновении ОКИ привлекло внимание исследователей к анализу состояния микробиотенноза кишечника, как одного из факторов антиинфекционной защиты макроорганизма [1, 7]. Возникло терапевтическое направление с использованием пробиотиков для коррекции микрофлоры кишечника при лечении больных ОКИ [5, 8].

Целью работы является выявление криптоспоридий и оценка состояния микробиотенноза кишечника у детей с острыми кишечными инфекциями различной бактериальной и вирусной этиологии, поступивших в специализированный стационар и получавших терапию пробиотиками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 106 детей. Большую часть обследованных составляли дети до 3 лет (59,4 %). По нозологическим формам больные с ОКИ

неустановленной этиологии составляли 53 (50 %) человека, сальмонеллезом – 17 (16,0 %), острой дизентерией – 9 (8,5 %), ротавирусной инфекцией – 25 (23,6 %), т.е. преобладали больные с ОКИ неустановленной этиологии и ротавирусной инфекцией (73,6 %). По тяжести течения преобладали больные средней тяжести заболевания 84 (79,2 %).

Все дети были обследованы на ооцисты криптоспоридий и выявление дисбиотических нарушений микрофлоры кишечника. Исследования проводились 2-кратно в динамике заболевания при поступлении в стационар и после проведения лечения.

Ооцисты криптоспоридий выявляли путем модифицированной окраски мазков нативных фекалий карбол-фуксином по Цилю – Нельсену с последующим изучением препаратов с помощью иммерсионной микроскопии.

Исследование микрофлоры кишечника проводили согласно методическим рекомендациям «Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериоза кишечника» (М., 1986 г.) и оценивали по отраслевому стандарту ОСТ 91500.11.0004 – 2003, утвержденному приказом Минздрава России № 231 от 9 июня 2003 г.

Все больные обследовались 2-кратно в начале заболевания и после лечения. Лечение детей, наблюдавшихся в клинике, проводили в соответствии с общепринятыми принципами лечения больных с острыми диареями. Помимо базовой терапии применяли препараты флорин-форте и аципол. Препарат флорин-форте содержит *Bifidobacterium bifidum* (сорбированные на активированном угле) не менее 5×10^7 КОЕ/г, *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, сорбированные на активированном угле — не менее 5×10^7 КОЕ/г и лактозу — до средней массы 0,85 г. Препарат аципол состоит из живых ацидофильных лактобацилл 1×10^7 КОЕ/г и полисахарида кефирного грибка 0,4 мкг. Учитывая данные экспериментальных исследований, свидетельствующие об антагонистической активности лактобактерий в отношении криптоспоридий можно предположить, что применение препаратов, содержащих лактобактерии, может привести к уменьшению выявления ооцист криптоспоридий при обследовании больных после лечения [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из 106 наблюдаемых детей, больных ОКИ, при первичном обследовании ооцисты криптоспоридий обнаружены у 31 (29,2 %) ребенка, при повторном — у 6 (5,7 %) детей, т.е. после лечения при повторном обследовании больных выявляе-

ние ооцист криптоспоридий резко уменьшилось (табл. 1).

При этом ооцисты криптоспоридий были обнаружены у больных с ОКИ неустановленной этиологии у 16 (30,2 %) при первичном обследовании и у 4 (7,5 %) при повторном; при сальмонеллезе у 5 (29,4 %) из 17, причем только при первичном обследовании; при острой дизентерии у 2 (22,2 %) из 9, только при первичном обследовании; при ротавирусной инфекции у 8 (32,0 %) при первичном обследовании и 2 (8,0 %) при повторном. Таким образом, наиболее часто ооцисты криптоспоридий обнаружены у детей, больных ротавирусной инфекцией и ОКИ неустановленной этиологии, причем при повторном обследовании после проведенного лечения полной эрадикации возбудителя не наблюдали.

Анализ возрастного состава детей, выделяющих ооцисты криптоспоридий, показал, что наиболее частое обнаружение ооцист криптоспоридий при первичном обследовании происходило у детей до 3-х лет — 20 (31,7 %) случаев. При повторном обследовании у детей до 3 лет ооцисты криптоспоридий обнаружены в 5 (7,9 %) случаях. У детей от 3 до 7 лет были обнаружены ооцисты криптоспоридий при первичном обследовании в 9 (26,4 %) случаях и при повторном в 1 (2,9 %) случае. В возрастной группе старше 7 лет ооцисты криптоспоридий обнаружены в 2-х (22,2 %) случаях только при первичном обследовании (табл. 2).

Таблица 1

Частота обнаружения криптоспоридий у детей, больных ОКИ

Нозология		Число больных	Обнаружение криптоспоридий		
			Всего	Первичное	Повторное
ОКИ неустановленной этиологии		53 (50,0 %)	20 (37,7 %)	16 (30,2 %)	4 (7,5 %)
Сальмонеллез		17 (16,0 %)	5 (29,4 %)	5 (29,4 %)	—
Острая дизентерия		9 (8,5 %)	2 (22,2 %)	2 (22,2 %)	—
Ротавирусная инфекция		25 (23,6 %)	10 (40,0 %)	8 (32,0 %)	2 (8,0 %)
Прочие заболевания		2 (1,9 %)	—	—	—
Итого	абс.	106	37	31	6
	%	100	34,9	29,2	5,7

Таблица 2

Обнаружение криптоспоридий у детей в различных возрастных группах

Возраст		Количество детей	Обнаружение криптоспоридий	
			первичное	повторное
От 0 до 3 лет,		63	20 (31,7 %)	5 (7,9 %)
в том числе	от 0 до 1 года	32 (50,8 %)	11 (34,4 %)	4 (15,6 %)
	от 1 года до 2 лет	18 (28,6 %)	7 (38,9 %)	1 (5,6 %)
	от 2 до 3 лет	13 (20,6 %)	2 (15,3 %)	—
3–7 лет		34	9 (26,4, %)	1 (2,9 %)
Старше 7 лет		9	2 (22,2 %)	—
Итого		106	31 (29,2 %)	6 (5,7 %)

Таким образом, по представленным данным видно, что криптоспоридии чаще наблюдали у детей до 3 лет как при первичном, так и при повторном обследовании.

Среди детей в возрастной группе до 3-х лет обнаружение ооцист криптоспоридий распределилось следующим образом: при первичном обследовании у детей от 0 до 1 года — 11 (34,4 %) случаев, от 1 года до 2 лет — 7 (38,9 %) случаев и от 2 до 3 лет — 2 (15,3 %). При повторном обследовании ооцисты криптоспоридий обнаружены у детей 0 — 1 года в 4 (15,6 %) случаях, от 1 до 2 лет — 1 (5,6 %) и от 2-х до 3-х лет не обнаружены (табл. 2).

Таким образом, ооцисты криптоспоридий чаще обнаруживали у детей первого и второго года жизни, как при первичном (73,3 %) так, и при повторном (21,2 %) обследовании.

С целью анализа состояния микробиоценоза кишечника у детей, больных ОКИ, было проведено исследование микрофлоры кишечника в динамике заболевания до и после проведенного комплексного лечения с применением пробиотиков. Определяли степени нарушения микробиоценоза кишечника, выявленные у наблюдаемых детей больных ОКИ (табл. 3).

Изучение бактериальной микрофлоры кишечника показало, что дисбактериоз I — III степени был выявлен у 106 больных (100 %), причем при первичном обследовании I степень дисбактериоза определена у 8 (7,5 %) детей, II степень — у 41 (38,7 %) ребенка, III степень — 57 (53,8 %) детей. При повторном обследовании I степень дисбактериоза определена у 67 (63,2 %) человек, II степень — у 29 (27,4 %) человек, III степень — у 10 (9,4 %) человек.

Таким образом, после проведенного лечения повторное обследование выявило значительное уменьшение глубоких дисбиотических нарушений кишечника III степени с 52,8 % до 9,5 % соответственно, и резкое возрастание минимальных изменений микрофлоры, определяемых как I степень дисбактериоза с 7,5 % до 63,2 % соответственно.

При различных нозологических формах при первичном обследовании преобладал дисбиоз кишечника III степени. После лечения повторное обследование показало значительное улучшение состояния микрофлоры кишечника, что выразилось в снижении количества детей с дисбактериозом III степени и увеличении изменений микрофлоры I степени. Тем не менее, при ОКИ неустановленной этиологии и ротавирусной инфекции III степень изменения кишечной микрофлоры осталась достаточно высокой 15,1 и 8 % соответственно. Так как ооцисты криптоспоридий чаще всего выделялись у больных детей именно с этими нозологическими формами заболевания можно предположить, что более медленная нормализация микрофлоры кишечника связана с этим фактором.

С целью характеристики микробиоценоза кишечника у детей, выделяющих криптоспоридии, были проанализированы данные состояния микрофлоры у 31 ребенка. При первичном обследовании у детей, выделяющих ооцисты криптоспоридии, обнаружены II степень (41,9 %) и III степень (58,1 %) дисбиотических изменений микрофлоры кишечника. После лечения при повторном обследовании обнаружены I степень (67,1 %), II степень (16,1 %), III степень (16,1 %) дисбиотических изменений микрофлоры кишечника.

Таким образом, наблюдали значительное улучшение состояния микрофлоры кишечника после лечения. Тем не менее, процент выявления дисбактериоза III степени (16,1 %) достаточно высок. Во всех случаях 2-кратного выделения детьми ооцист криптоспоридий микробиологические показатели кишечника соответствовали III степени дисбактериоза (при первичном и повторном обследовании). В одном случае ооцисты криптоспоридий обнаружили только при повторном обследовании, причем дисбиотические показатели были III степени, в то время как при первичном обследовании этого ребенка изменения флоры были II степени, т.е. состояние микрофлоры кишечника ухудшилось. Таким образом, у детей, повторно выделяющих

Таблица 3

Характеристика микробиоценоза кишечника у детей больных ОКИ

Нозология	Число больных	Выявление дисбиотических нарушений					
		первичное обследование			повторное обследование		
		I ст.	II ст.	III ст.	I ст.	II ст.	III ст.
ОКИ неустановленной этиологии	53	8 (15,1 %)	20 (37,7 %)	25 (47,2 %)	28 (52,8 %)	17 (32,1 %)	8 (15,1 %)
Сальмонеллез	17	—	7 (41,2 %)	10 (58,8 %)	12 (70,6 %)	5 (29,4 %)	—
Острая дизентерия	9	—	2 (22,2 %)	7 (77,8 %)	6 (66,7 %)	3 (33,3 %)	—
Ротавирусная инфекция	25	—	10 (40,0 %)	15 (60,0 %)	20 (80,0 %)	3 (12,0 %)	2 (8,0 %)
Прочие заболевания	2	—	2 (100 %)	—	1 (50,0 %)	1 (50,0 %)	—
Итого	абс	106	8	41	57	67	29
	%	100	7,5	38,7	53,8	63,2	27,4

ооцисты криптоспоридии, во всех случаях был дисбактериоз III степени. Повторно ооцисты криптоспоридий были выявлены в 6 случаях, причем у детей с ОКИ неустраненной этиологии и ротавирусной инфекцией (7,5 и 8,0 % соответственно). И именно в этих группах обследованных детей сохранилась III степень дисбиотических нарушений кишечника.

Дисбиотические изменения микрофлоры кишечника у детей, выделяющих криптоспоридии, характеризовались снижением содержания *E. coli* по сравнению с нормой в 100 % случаев при первичном обследовании и в 35,4 % — при повторном, и появлением кишечной палочки со сниженной ферментативной активностью при первичном обследовании у 12 (38,7 %) детей, при повторном обследовании — у 3-х (9,7 %). Гемолизические *E. coli* были выявлены при первичном обследовании у 11 (35,5 %) детей и при повторном — у 4-х (12,9 %).

При первичном обследовании детей, выделяющих ооцисты криптоспоридий, обнаруживали условно-патогенные энтеробактерии $\geq 10^5$ у 16 (51,7 %) детей, причем чаще выделяли микробы рода *Klebsiella* — 8 (25,8 %), на втором месте по частоте обнаруживали *Citrobacter* — у 5 (16,1 %) случаев, другие микроорганизмы были выделены у 3-х (9,8 %) детей. При повторном обследовании условно-патогенные энтеробактерии $\geq 10^5$ обнаружены у 5 (16,2 %) детей, причем микробы рода *Klebsiella* — у 3-х (9,7 %), а *Citrobacter* — у 2-х (6,5 %).

У детей при первичном обследовании были обнаружены стафилококки в фекалиях у 13 (41,9 %), причем золотистый стафилококк — у 9 (29,0 %) детей и сапрофитный — у 4-х (12,9 %) из них, в 3-х (9,8 %) случаях — гемолизующий. При повторном обследовании у 1 (3,2 %) ребенка золотистый стафилококк и сапрофитный — у 1 (3,2 %) ребенка. Гемолизующие стафилококки были обнаружены только при первичном обследовании — у 3-х (9,8 %) детей.

Микробы рода Кандида в концентрации 10^6 КОЕ/г фекалий при первичном обследовании были у 5 (16,1 %) обследованных, при повторном обследовании — у 1 (6,4 %) ребенка.

Снижение количества бифидофлоры $\leq 10^7$ у детей, выделяющих ооцисты криптоспоридий, составило при первичном обследовании 23 (74,2 %) случая, при повторном обследовании — 7 (22,5 %). Снижение лактобактерий $\leq 10^5$ при первичном обследовании составило 29 (93,5 %) случаев, при повторном обследовании — 5 (16,1 %).

Из 31 ребенка, обследованного на наличие ооцист криптоспоридий при повторном обследовании у 6 (19,4 %) человек выделяли ооцисты криптоспоридий. Микробиоценоз кишечника этих детей соответствовал II степени (6,5 %) и III степени (12,9 %).

На основании проведенного клинико-лабораторного анализа только у 3 из 31 (9,7 %) наблюдавшегося ребенка, выделяющего криптоспоридии,

можно было обосновать диагноз криптоспориозной инфекции. Клиническая картина при этом соответствовала среднетяжелому течению заболеваний. В других случаях обнаружение криптоспоридий расценивали как субклиническую форму болезни на фоне другой патологии со стороны желудочно-кишечного тракта с явлениями выраженного дисбактериоза кишечника.

Во всех случаях включения препаратов флорин-форте и аципол флорин-форте и аципол в схему лечения был получен положительный эффект. Происходило улучшение состояния микрофлоры кишечника, уменьшение выделения ооцист криптоспоридий и благоприятное клиническое течение заболевания у обследованных больных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные комплексные исследования позволили выявить наличие ооцист криптоспоридий у 29,2 % детей, поступивших в стационар с ОКИ, причем наиболее часто выделяли возбудителя больные с ОКИ неустраненной этиологии и ротавирусной инфекцией. При этом установлено, что наиболее подвержены инвазии дети первых 2-х лет жизни. Однако клинически обосновать диагноз можно было только у 3-х больных из 31, выделяющего возбудителя. В других случаях обнаружение криптоспоридий расценивали как субклиническую форму болезни на фоне другой патологии со стороны желудочно-кишечного тракта.

Анализ состояния микробиоценоза кишечника у детей, больных ОКИ показал наличие глубоких изменений микрофлоры, определяемых как дисбактериоз II и III степени. Отмечены наиболее глубокие изменения состояния микрофлоры у детей, экскретирующих ооцисты криптоспоридий.

Проведенное комплексное лечение детей, больных ОКИ, с включением в терапию пробиотиков, содержащих лактобактерии, привело к значительному уменьшению дисбиотических проявлений со стороны кишечной микрофлоры и снижению выделения криптоспоридий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дехнич А.В. Клинические и микробиологические аспекты криптоспориоза // Клиническая микробиол. и антимикроб. химиотерапия. — 2000. — Т. 2, № 3. — С. 54–57.
2. Криптоспориоз: эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение / О.С. Партин [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2001. — № 5.
3. Ткаченко Е.И. Суворов А.Н., Дисбактериоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. — СПб., 2007. — 237 с.
4. Феклисова Л.В. Оптимизация результатов лечения детей, больных ОКИ, при использовании отечественных биологических микробных препаратов // Вестник РАМН. — 2005. — № 12. — С. 17–24.

5. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследований // Вестник РАМН. — 2005. — № 12. — С. 13—17.
6. Lopes-Veles R., Tarazona R., Gracia Camacho A. // Eur. J. Clin. Infect. Dis. Microbiol. — 1995. — Vol. 14. — P. 667—681.
7. Patel S., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J. The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RELP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene // Int. J. Parasitol. — 1999. — Vol. 29. — P. 1241—1247.
8. Saavedra J.M., Use of Probiotics in Pediatrics; Rationale Mechanisms of Action and Practical Aspects // Nutr. Clin. Pract. — 2007. — Vol. 22 (3). — P. 351—365.
9. Wolf Bryan Warren, Garleb Keith Allen Lactobacillus reuteri to inhibit cryptosporidiosis in mammals: Пат. 6103227 США МКИ № 081880240; заявл.23.06.97. Опубл. 15.08.00 НКИ 424/93.45.

Сведения об авторах

Лиханская Елена Ивановна – научный сотрудник лаборатории микробиологии и профилактики кишечных инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; тел. 8(495) 452-18-10)

Пожалостина Любовь Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией микробиологии и профилактики кишечных инфекций Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; тел. 8(495) 452-18-10)

Феклисова Людмила Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения детских инфекций Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (110129, Москва, ул. Щепкина, 61/2; тел. 8(499) 268-22-26)

Бочкарева Наталья Михайловна – младший научный сотрудник отделения детских инфекций Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М.Ф. Владимирского (110129, Москва, ул. Щепкина, 61/2; тел. 8(499) 268-22-26)

Л.В. Лялина, М.Е. Игнатьева, О.В. Нарвская, Ю.Н. Филиппова, А.А. Вязовая, Е.В. Касаткин,
Е.В. Каткявичене

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ), САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ И РЕСПУБЛИКЕ КАРЕЛИЯ

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург)
Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия) (Якутск)
Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.И. Никифорова МЧС России
(Санкт-Петербург)
Кожно-венерологический диспансер № 8 (Санкт-Петербург)
Республиканский кожно-венерологический диспансер Республики Карелия (Петрозаводск)

Результаты исследования в трех регионах Российской Федерации показали широкое распространение вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска среди пациентов дерматовенерологического и гинекологического профиля. Частота обнаружения ДНК вируса в материале из цервикального канала и уретры варьировала от 25,2 (Республика Карелия) до 42,5 (Республика Саха (Якутия)) на 100 обследованных лиц. На всех территориях в 2010–2011 годах первое место занимал 16 генотип вируса – от 11,5 (Республика Саха (Якутия)) до 15,9 (Санкт-Петербург) на 100 обследованных. Распространенность других 11 типов различалась. В Республике Саха (Якутия) второе ранговое место занимали 31 и 51 типы (8,0 на 100 обследованных человек), в Санкт-Петербурге – 56 и 31 типы (9,7 и 7,6 на 100 обследованных). Возрастная группа риска – пациенты в возрасте 20–29 лет. Информация о циркулирующих генотипах вируса является необходимой частью надзора для обоснования целесообразности вакцинации против папилломавирусной инфекции и оценки ее эффективности.

Ключевые слова: вирус папилломы человека, распространенность

PREVALENCE OF HIGH CARCINOGENIC RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN THE REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA), ST. PETERSBURG AND THE REPUBLIC OF KARELIA

L.V. Lyalina, M.E. Ignatyeva, O.V. Narvskaya, Yu.N. Filippova, A.A. Vyazovaya, E.V. Kasatkin,
E.V. Katkyavichene

Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg
Department of Federal Service for Consumer Rights Protection and Human Welfare of the Sakha
Republic (Yakutia), Yakutsk
Russian National Center of Emergency and Radiation Medicine named after A. Nikiforov of EMERCOM,
Saint-Petersburg
Dermatovenerologic Dispensary № 8, Saint-Petersburg
Dermatovenerologic Dispensary of the Karelia Republic, Petrozavodsk

Results of the study in three regions of the Russian Federation have shown widespread of high carcinogenic human papillomavirus among patients of dermatovenerological and gynecological profile. Detection of viral DNA in the material from the cervix and urethra ranged from 25,2 (Karelia) to 42,5 (Sakha Republic (Yakutia)) per 100 examined patients. In all areas in 2010–2011 first place was occupied by 16-th virus genotype – from 11,5 (Sakha Republic (Yakutia)) to 15,9 (St. Petersburg) per 100 patients. Prevalence of 11 other types differs. In the Sakha Republic (Yakutia) the second rank place was occupied by types 31 and 51 (8,0 per 100 examined patients), in St. Petersburg – by 56 and 31 types (9,7 and 7,6 per 100 patients). Age risk group contains patients of the age of 20–29 years. Information on circulating genotypes of the virus is a necessary part of surveillance to validate vaccination against human papillomavirus infection and evaluation of its efficiency.

Key words: human papillomavirus, prevalence

В настоящее время установлена ведущая роль онкогенных типов вируса папилломы человека в этиопатогенезе рака шейки матки и существенное значение этого агента в развитии рака вульвы, влагалища, полового члена, анальной области, ротовой полости, гортани [1, 6, 10]. Изучены механизмы вирусного канцерогенеза, индуцированного указанным вирусом [11]. В нашей стране специалистами различного профиля разработаны основы диагностики, эпидемиологического надзора, лечения и профилактики папилломавирусной инфекции и злокачественных новообразований, ассоциирован-

ных с этой инфекцией [2–5]. Внедрение в практику вакцин для профилактики инфекции, вызванной вирусом папилломы человека 6, 11, 16 и 18 типов, позволило создать реальные предпосылки для снижения заболеваемости [7–9]. Особенностью папилломавирусной инфекции, обуславливающей специфику системы эпидемиологического надзора и профилактики, является многообразие генотипов вируса (более 120), полиморфизм клинических проявлений, преобладание бессимптомной инфекции, наличие хронических форм и канцерогенной активности у 15–20 типов вируса.

Цель исследования состояла в изучении региональных особенностей распространения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска на начальном этапе становления вакцинопрофилактики папилломавирусной инфекции в Российской Федерации.

МЕТОДИКА

В работе использован метод полимеразной цепной реакции в формате реального времени и наборы реагентов отечественных производителей для выявления, дифференциации и количественного определения ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в клиническом материале (табл. 1). Проведено обследование пациентов, обратившихся за медицинской помощью в учреждения дерматовенерологического и гинекологического профиля в трех субъектах Российской Федерации (Санкт-Петербург, Республика Карелия, Республика Саха (Якутия)). Материал для исследования — соскоб эпителия слизистой оболочки цервикального канала и уретры, выполненный универсальным уретральным зондом или цитощеткой. Среди обследованных были больные венерическими заболеваниями (гонорея, аногенитальные бородавки), другими инфекциями, передаваемыми половым путем, воспалительными заболеваниями нижних отделов мочеполового тракта, а также обследованные с профилактической целью пациенты, ведущие активный сексуальный образ жизни.

При сопоставлении данных учитывалось, что на территориях используют тест-системы различных производителей и разные наборы одного производителя, позволяющие определить неодинаковое количество типов вируса папилломы человека (в Санкт-Петербурге — 16, в Республике Карелия — 11, в Республике Саха (Якутия) — 12). Вместе с тем, 12 основных генотипов совпадали в Санкт-Петербурге и Республике Саха (Якутия) и 10 генотипов в Республике Карелия, что позволило провести оценку распространения высокоонкогенных типов вируса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска среди пациентов дерматовенерологического профиля в Республике Карелия, Санкт-Петербурге и Республике Саха (Якутия) в 2010—2011 гг. составила 25,2; 36,2 и 42,5 на 100 обследованных лиц соответ-

ственно (табл. 1). В Республике Карелия показатель достоверно ниже ($p < 0,05$), что может быть связано с меньшим количеством определяемых генотипов вируса. В Республике Саха (Якутия) частота обнаружения высокоонкогенных типов вируса существенно не отличалась от данных, полученных в Санкт-Петербурге ($p > 0,05$).

При сопоставлении результатов обследования пациентов мужского и женского пола кожно-венерологического диспансера в Санкт-Петербурге установлено, что у мужчин высокоонкогенные типы вируса обнаруживались несколько чаще, чем у женщин, однако различия оказались статистически не значимы ($p > 0,05$).

Развитие системы эпидемиологического надзора и вакцинопрофилактики папилломавирусной инфекции предполагает знание циркулирующих генотипов вируса. В Республике Саха (Якутия) и Санкт-Петербурге изучена не только частота обнаружения различных типов вируса суммарно, но и распространенность конкретных генотипов, поскольку вакцины включают рекомбинантные антигены против вируса папилломы человека 6, 11, 16 и 18 типов. Кроме того, в последние годы в литературе активно обсуждаются вопросы наличия перекрестного иммунитета, в первую очередь к близкородственным типам вируса папилломы человека. Анализ данных, представленных на рисунке 1, показал, что при обследовании 200 пациенток кожно-венерологического диспансера Республики Саха (Якутия) выделены 11 генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска, относящихся к различным филогенетическим группам. Генотип 35 не был обнаружен в данном исследовании. В 67,1 % случаев была диагностирована моноинфекция, обусловленная каким-нибудь одним типом вируса папилломы человека. В 32,9 % выявлена микст-инфекция, когда у пациенток обнаруживалось от 2 до 5 высокоонкогенных типов вируса. Наибольшее распространение в Республике Саха (Якутия) имеет ВПЧ 16 типа, как и на других территориях Российской Федерации, а также в развитых странах Европейского региона и мира. Распространенность этого генотипа в виде моноинфекции составила 6,0 на 100 обследованных лиц, с учетом ассоциации с другими типами вируса папилломы человека показатель достиг 11,5 на 100 человек. В структуре всех выделенных типов вируса доля 16 типа (включая моно- и микст-инфекцию) составила

Таблица 1
Частота обнаружения высокоонкогенных типов вируса папилломы человека у пациенток кожно-венерологических диспансеров в Санкт-Петербурге, Республике Карелия и Республике Саха (Якутия) в 2010–2011 гг. (на 100 обследованных лиц)

Территория	Типы ВПЧ и тест-системы	Количество обследованных	Количество лиц с ВПЧ ВКР	
			абс. число	% ± m
Санкт-Петербург	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 68, 73, 83 Ген Лаб	664	240	36,2 ± 1,9
Республика Карелия	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58, 59, 67 Амплисенс	6179	1558	25,2 ± 0,6
Республика Саха (Якутия)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 Амплисенс	200	85	42,5 ± 3,5

28,2 %. Ранговые места других генотипов вируса в Республике Саха (Якутия) распределились следующим образом (с учетом смешанной инфекции): 2-е место — типы 31 и 51 — 8,0 на 100 обследованных пациентов; 3-е место — типы 18, 52 и 58 (6,0 %), 4-е — тип 45 (близкородственный 18 типу) — 5,5 %; далее следовали типы 56 (3,5 %), 59 (3,0 %) и 33 (2,0 %).

В Санкт-Петербурге частота обнаружения высокоонкогенных типов вируса папилломы человека отличалась, хотя лидирующие позиции также занимал 16 тип вируса — 15,9 на 100 обследованных пациентов (различия с данными по Республике Саха (Якутия) статистически не значимы ($p > 0,05$)). Второе и третье ранговые места заняли типы 56 и 31 (9,7 и 7,6 на 100 обследованных соответственно). Далее следовали типы 33, 39 и 66 (по 6,3 %), 18 и 52 (по 4,9 %), 35 (4,2 %), 45 и 51 (по 2,8 %), 58 (2,1 %) и 59 (0,7 %). Результаты количественного определения вируса папилломы человека в материале от этой группы пациентов показали, что клинически малозначимое количество ($< 3 \lg$) имели 26,7 %

обследованных, клинически значимое ($3 - 5 \lg$) выявлено в 37,5 % случаев и повышенное количество вируса ($> 5 \lg$) установлено у 35,8 % обследованных женщин.

В системе эпидемиологического надзора за папилломавирусной инфекцией и циркулирующими генотипами вируса на конкретных территориях важнейшее значение имеет анализ возрастной характеристики инфицированных лиц. Результаты исследования в Санкт-Петербурге показали, что возрастной группой риска по частоте обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска являются пациенты в возрасте 20–29 лет (рис. 2). Распространенность высокоонкогенных типов вируса (16 типов суммарно) в 2011 г. составила 39,6 на 100 обследованных пациентов. Второе и третье места заняли пациенты в возрасте 30–39 лет (32,6) и 15–17 лет (30,0 на 100 обследованных человек). В возрастных группах 18–19 лет и старше 40 лет показатели оказались равными 16,7 и 22,6 на 100 обследованных соответственно.

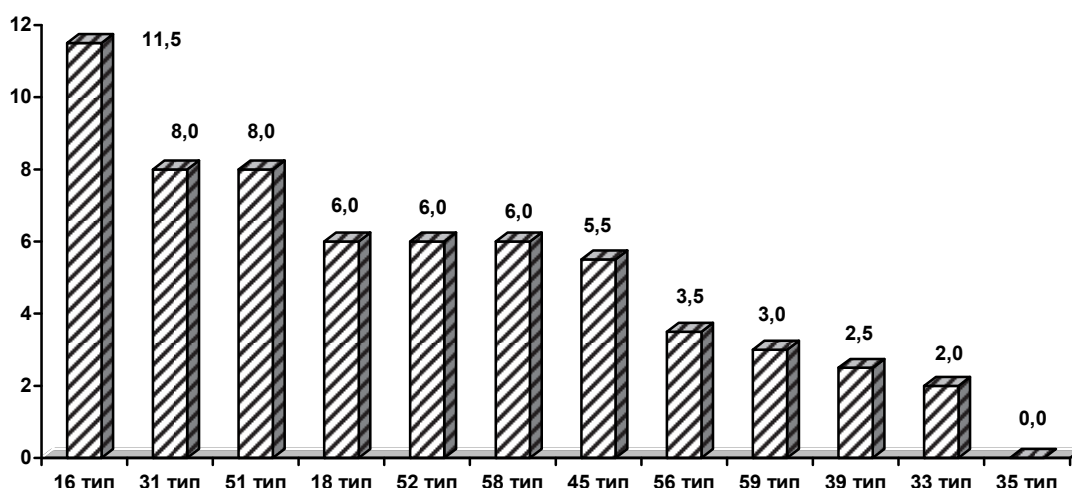


Рис. 1. Частота обнаружения вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у пациентов дерматовенерологического профиля в Республике Саха (Якутия), 2010–2011 гг. (на 100 обследованных лиц).

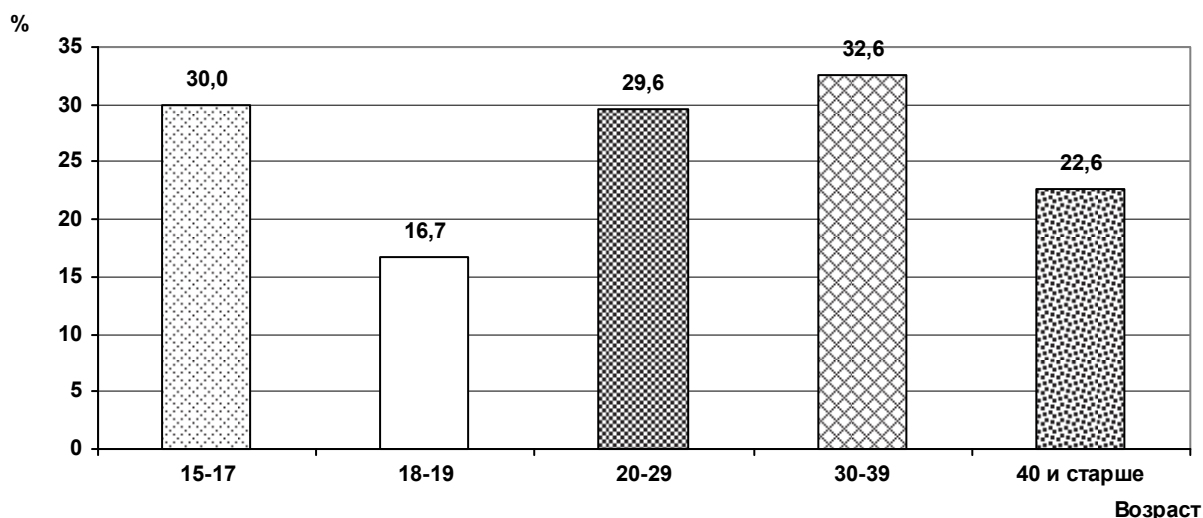


Рис. 2. Частота обнаружения высокоонкогенных типов вируса папилломы человека в различных возрастных группах пациентов дерматовенерологического профиля в Санкт-Петербурге, 2011 г. (на 100 обследованных).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования, проведенного в 2010–2011 гг. в трех субъектах Российской Федерации (Санкт-Петербург, Республика Карелия и Республика Саха (Якутия), показали широкое распространение вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска среди пациентов дерматовенерологического и гинекологического профиля на всех изученных территориях.

Впервые изучена распространенность 12 генотипов вируса в Республике Саха (Якутия), что позволило установить циркуляцию 11 типов и лидирующее значение 16 типа, который является одним из основных агентов, вызывающих рак шейки матки. Антиген этого типа вируса включен в обе вакцины, разрешенные к применению в Российской Федерации. Выявлены различия в распространенности других генотипов вируса папилломы человека на различных территориях страны, это обстоятельство необходимо учитывать для обоснования целесообразности внедрения вакцинации против папилломавирусной инфекции в широкую практику, оценке ее эффективности и наличия перекрестной защиты от инфекции, вызванной разными генотипами вируса. Материалы исследования показали также высокую частоту смешанной инфекции с определением от 2 до 5 типов вируса у одной женщины и высокую долю пациенток, имеющих клинически значимое и повышенное содержание вируса в материале из цервикального канала.

Полученные данные свидетельствуют об актуальности проблемы папилломавирусной инфекции для всех пациентов дерматовенерологического профиля, но особую озабоченность вызывает высокая инфицированность лиц репродуктивного возраста. Эти материалы необходимо анализировать также в контексте изучения заболеваемости раком шейки матки и другими злокачественными новообразованиями, ассоциированными с вирусом папилломы человека высокого канцерогенного риска, как в целом среди населения, так и в различных возрастных группах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев В.И. Вирусы папилломы человека в развитии рака шейки матки. — М. : «Димитрейд График Групп», 2004. — 184 с.

Сведения об авторах

Лялина Людмила Владимировна — заведующая лабораторией эпидемиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, доктор медицинских наук, доцент (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; тел. (812) 233-44-70, факс: (812) 232-92-17; E-mail: lyalina@pasteurorg.ru)

Нарвская Ольга Викторовна — заведующая лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, доктор медицинских наук, профессор

Вязовая Анна Александровна — старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, кандидат биологических наук

Игнатьева Маргарита Егоровна — руководитель Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Саха (Якутия), заочный аспирант ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Филиппова Юлия Николаевна — заведующая научно-исследовательской лабораторией молекулярно-генетической диагностики, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.И. Никитова МЧС России

Касаткин Евгений Владимирович — главный врач СПб ГУЗ «Кожно-венерологический диспансер № 8», кандидат медицинских наук

Катквичене Елена Владимировна — врач-дерматовенеролог Республиканского кожно-венерологического диспансера Республики Карелия, кандидат медицинских наук

2. Медицинские и социальные аспекты профилактики папилломавирусной инфекции и ассоциированных с ней злокачественных новообразований / Л.В. Лялина [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2005. — № 3 (22). — С. 31–34.

3. Папилломавирусная инфекция: диагностика, лечение и профилактика : пособие для врачей / В.Н. Прилепская [и др.]. — М. : «МЕДпресс-информ», 2007. — 32 с.

4. Сафронникова Н.Р., Мерабишвили В.М. Профилактика вирусозависимых онкологических заболеваний. Диагностика и лечение папилломавирусной инфекции : пособие для врачей. — СПб., 2006. — 48 с.

5. Цервикальный скрининг в России: пути повышения его эффективности / О.Ю. Шипулина [и др.] // Папилломавирусная инфекция и рак. Интегрированная система надзора и профилактики : материалы II симпозиума с международным участием, Санкт-Петербург, 7–9 июня 2011 г. — СПб., 2011. — С. 55–59.

6. Cancer Research for Cancer Control // International Agency for Research on Cancer WHO. — Lyon, 2001. — 35 p.

7. Donovan B. Quadrivalent human papillomavirus vaccination and trends in genital warts in Australia: analysis of national sentinel surveillance data / B. Donovan [et al.] // Lancet Infect. Dis. — 2011. — Vol. 11. — P. 39–44.

8. Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24–45 years: a randomized, double-blind trial / N. Munoz [et al.] // Lancet. — 2009. — Vol. 373. — P. 1949–1957.

9. Stanley M. A Practitioners Guide to Understanding Immunity to Human Papillomavirus // US Obstetrics & Gynecology. — 2009. — Vol. 4 (1). — P. 10–15.

10. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer / F.X. Bosch [et al.] // J. Clin. Pathology. — 2002. — Vol. 55. — P. 244–265.

11. Zur Hausen H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49. — P. 4677–4681.

Н.Ф. Муляр, С.А. Верещагина, Т.В. Фадеева, Г.П. Спасов, О.В. Каны

**CLOSTRIDIUM DIFFICILE-АССОЦИИРОВАННЫЕ ДИАРЕИ
В МНОГОПРОФИЛЬНОМ СТАЦИОНАРЕ**

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Иркутская областная орден «Знак Почета»
клиническая больница (Иркутск)
Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр реконструктивной и
восстановительной хирургии» Сибирское отделение Российской академии медицинских наук (Иркутск)
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Иркутское областное
патологоанатомическое бюро» (Иркутск)

Clostridium difficile является основным возбудителем нозокомиальной диареи, связанной с назначением антимикробных препаратов. Данной проблеме в нашей стране не уделяется достаточного внимания. В настоящей статье проанализированы клинические формы 536 случаев антибиотик-ассоциированных инфекций. На основании использования в диагностике нового иммунохроматографического экспресс-теста распространенность *Clostridium difficile*-инфекций среди пациентов многопрофильного стационара ГБУЗ ИОКБ за период 2008–2011 гг. составила 28,7 %. Препаратами выбора при лечении *Clostridium difficile*-инфекций являются ванкомицин, метронидазол. Обращает на себя внимание тенденция к росту сопутствующей грибковой инфекции при антибиотик-ассоциированных диареях. Частота встречаемости таких инфекций, вызванных грибами *Candida* spp. составила за этот период 50,8 %. Препараты выбора при лечении сопутствующей грибковой инфекции — флуконазол, амфотерицин. Рекомендуется после выписки больных из стационара проводить лечение сопутствующего дисбактериоза на протяжении 1 года, врачам-инфекционистам проводить диспансеризацию больных, перенесших *C. difficile*-инфекцию в течение 1 года.

Ключевые слова: антибиотик-ассоциированные диареи (ААД), клостридии-ассоциированные диареи (CDAD), псевдомембранозный колит (ПМК), внутрибольничная инфекция

CLOSTRIDIUM DIFFICILE ASSOCIATED DIARRHEA IN MULTIDISCIPLINARY HOSPITAL

N.F. Mulyar, S.A. Vereschagina, T.V. Fadeeva, G.P. Spasov, O.V. Kanya

Irkutsk Regional clinical hospital, Irkutsk
Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk
Scientific Centre of Reconstructive and Restorative Surgery, Siberian Branch of RAMS, Irkutsk
Regional Pathology Department, Irkutsk

Currently, *Clostridium difficile* is the main reason of a nosocomial diarrhea, caused by uncontrolled antibacterial treatment. This problem is not paid enough attention in our country. We analyzed 536 cases of antibiotic associated infections using new immunochromatographical assay for express detection of *Clostridium difficile*. Since 2008 to 2011 evaluated rate of the positive tests was 28,7 % among the hospital patients. The first line therapy of this infection is vancomycin and metronidazole. We also observed increased incidence of mycosis, which accompanying the antibiotic associated diarrheas. During the same period the rate of *Candida* spp. infection was 50,8 % among the same patients. We used fluconazole and amphotericine for the mycosis treatment. We also recommended to manage disbiosis during one year after discontinue of the treatment, and we supposed reasonable to be managed by infectionist for this group of patients.

Key words: antibiotic associated diarrhea, clostridium associated diarrhea, pseudomembranous colitis, nosocomial infection

ВВЕДЕНИЕ

Токсигенные штаммы *Clostridium difficile* — основная причина внутрибольничных (нозокомиальных) инфекционных диарей в развитых странах. Только в больницах США регистрируется около 300 000 случаев клостридии-ассоциированных диарей (CDAD) в год [13, 14]. В России CDAD не регистрируются, диагностика практически не проводится [5]. *Clostridium difficile* является этиологическим агентом порядка 25 % всех антибиотик-ассоциированных диарей (ААД). Теоретически, любой антибиотик предрасполагает к развитию CDAD у больного. Клинические проявления CDAD варьируют от бессимптомной колонизации до угрожающего жизни псевдомембранозного колита и токсической megacolon [3, 13]. Наиболее патогенные штаммы

Clostridium difficile продуцируют два биологически и иммунологически различных токсина: токсин А (энтеротоксин) и токсин В (цитотоксин).

Наиболее перспективным тестом эпидемиологического мониторинга и профилактики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей является ИХА (иммунохроматографический экспресс-тест), который дает врачу возможность быстро верифицировать инфекцию, начать необходимое лечение, принять меры по изоляции больного, предотвратить распространение инфекции в стационаре [1, 13].

Заражение *Clostridium difficile* может проходить как с передачей из внешней среды, так и с активацией собственной микрофлоры. Возбудитель может высеваться с рук медицинского персонала, ухаживающего за больными, инфицированными *Clostridium*

difficile и выделяющими микробы в окружающую среду. Считают, что контактный путь передачи *Clostridium difficile* через руки медицинского персонала является, вероятно, одним из наиболее значимых механизмов передачи в распространении внутрибольничной инфекции. Отмечено достоверное снижение числа случаев заболеваний, вызванных *Clostridium difficile* при использовании медицинским персоналом резиновых перчаток [2, 10].

Первейшим фактором риска развития ААД и ПМК является применение антибиотиков. Антибактериальные препараты играют роль пускового механизма, нарушающего микроэкосистему и аминокислотный состав кишечной среды, и создают необходимые условия для развития *Clostridium difficile*-ассоциированных болезней [12].

Все антибиотики могут вызывать развитие CDAD инфекции, однако наиболее часто это связано с предшествующим применением клиндамицина, аминопенициллинов и цефалоспоринов. Установлено, что лечение цефалоспоринами III поколения приводит к развитию CDAD гораздо чаще, чем пенициллинами узкого спектра активности [7, 8, 11]. Предыдущая госпитализация и предшествующая антибактериальная терапия предполагают к развитию CDAD. Наибольшую опасность развития CDAD представляют антибиотики, активные в отношении анаэробов и вызывающие наиболее значимые нарушения состава микрофлоры кишечника [4, 6, 7, 11]. Способствовать развитию инфекции CDAD могут некоторые противоопухолевые препараты — доксорубин, антимаетаболиты — 5-фторурацил, метотрексат, циклофосфамид [9].

МЕТОДИКА

Нами использован качественный иммунохроматографический экспресс-метод для определения «Toxins A и B *Clostridium difficile*» в кале «ImmunoCard Toxins A и B». Метод характеризуется высокой информативностью, воспроизводимостью, простотой, быстротой получения ответа (через 1,5–2 часа). Чувствительность теста 87,1–98,9 %, клиническая специфичность 97,6–100 %. Нижний предел определения составляет 3 нанограмма токсинов A и B на 1 мл кала.

При отрицательном ИХА экспресс-тесте на токсины A и B *Clostridium difficile*, клинический материал параллельно исследовался на кишечную группу инфекций — шигеллы, сальмонеллы, условно-патогенную флору, патогенный стафилококк, грибы *Candida spp.*

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиника. Ретроспективно нами проанализировано 536 историй болезни за 2008–2011 гг. (48 % мужчин и 52 % женщин) в возрасте от 38 до 83 лет. Больные были из разных отделений: гнойно-септического центра, торакальной хирургии, нейрохирургии, пульмонологии, гематологии, реанимаций, урологии, гастротерапии.

Легкая форма заболевания диагностирована у 49 (31,82 %) больных. Начало заболевания — острое.

Первым симптомом являлась диарея. Она обычно развивалась через 5–7 дней от начала применения антибиотиков. Стул учащался до 3–5 раз в сутки. Диарея в данном случае протекала легко. При отмене антибиотика, вызвавшего диарею, проводилось специфическое лечение, и такой вариант течения классифицировался как антибиотик-ассоциированная диарея — ААД.

Средне-тяжелая форма наблюдалась у 80 (51,94 %) больных. К диарее присоединялись симптомы интоксикации: общая слабость, тошнота, снижение аппетита, явления колита, появлялась лихорадка, боли в животе, лейкоцитоз и нарастали явления колита, это уже развивался антибиотик-ассоциированный колит — ААК.

Тяжелая форма диагностирована у 25 (16,24 %) больных. Наряду с вышеперечисленной симптоматикой, при тяжелом течении развивались симптомы скрытого кишечного кровотечения, в кале выявлялись прожилки крови, развивалась дегидратация, гипокалиемия, гипоальбуминемия с развитием отеков. Температура тела достигала 40 °C и выше, стул учащался до 15–30 раз в сутки, развивался лейкоцитоз, повышалась СОЭ. При эндоскопическом исследовании толстой кишки — проктосигмоидоскопии — выявлялись характерные морфологические изменения — псевдомембраны, которые указывали на развитие наиболее тяжелого течения инфекции — псевдомембранозный колит — ПМК.

В некоторых случаях ПМК протекал без диареи в виде синдрома «острого живота», имитируя перитонит или токсический мегаколон — 18 (11,7 %) случаев. Токсический мегаколон проявлялся остро развивающейся дилатацией толстой кишки (более 6 см в диаметре) на фоне общей интоксикации организма, отсутствия механической обструкции и характеризовался высокой летальностью — 38 больных (24,5 %). Другим осложнением ПМК была перфорация толстой кишки, перитонит — 6 (3,9 %) случаев.

При возможно ранней отмене антибактериальной терапии и отсутствии осложнений разрешение симптомов ПМК проходило через 10–14 дней. Но прием антибиотика, вызвавшего ПМК, приводил к длительной диарее, сопровождающейся тяжелыми электролитными нарушениями, гипопроteinемией и высокой летальностью.

При отрицательном ИХА экспресс-тесте на токсины A и B *Clostridium difficile*, в случаях антибиотик-ассоциированных диарей установленной этиологии (382 случая) чаще других в ГБУЗ ИОКБ за период 2008–2011 гг. были выявлены грибы *Candida spp.* 194 (50,8 %). Спектр грибов представлен *Candida albicans* — 116 (59,8 %), *Candida krusei* — 36 (18,6 %), *Candida glabrata* — 35 (18 %), *Candida tropicalis* — 7 (3,6 %). Кроме грибов, в кале чаще других встречались грамположительные микроорганизмы: *E. faecium* (34,2 %), *E. faecalis* (13 %), *S. aureus* (5,3 %), а среди грамотрицательных бактерий *Klebsiella spp.* (22,8 %), *Enterobacter spp.* (5,8 %), *Proteus spp.* (5,6 %), *Pseudomonas spp.* (5 %).

Дисбактериоз выявлен из 382 случаев у 380 (99,5 %).

ЛЕЧЕНИЕ

Ванкомицин как препарат первого выбора применялся для больных с тяжелым течением заболевания для достижения более быстрого эффекта и снижения риска неэффективности лечения. Ванкомицин назначался по 125–500 мг 4 раза в сутки *per os* в течение 7–10 дней.

Метронидазол как препарат тоже первого выбора применялся для лечения легкого варианта течения заболевания для предотвращения возникновения ванкомицин-устойчивых штаммов нозокомиальной *C. difficile* и по фармако-экономической целесообразности. Препарат назначался по 250–500 мг 4 раза в сутки в течение 7–10 дней.

Несмотря на доказанное преимущество, пероральный ванкомицин был непригоден для некоторых больных с фульминантной формой инфекции из-за сопутствующего илеуса или токсического megacolon. В этих ситуациях применялся метронидазол внутривенно по 500 мг 4 раза в сутки вместе с ванкомицином, вводимым через назогастральный зонд или через клизму.

При тяжелой или фульминантной форме ПМК в некоторых случаях проводилась субтотальная колэктомия.

При сопутствующих антибиотик-ассоциированных диареях, вызванных грибами *Candida albicans*, назначался флуконазол по 400 мг 1 раз в сутки в течение 14 дней. При диареях, вызванных *Candida non albicans*, назначался амфотерицин В по 250–500 тыс. МЕ дробно, внутривенно, (для снятия интоксикации) медленно, под защитой глюкокортистероидов (60–120 мг) в течение 5–10 суток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевой задачей эпидемиологического мониторинга и профилактики антибиотик-ассоциированных диарей является применение скринингового иммунохроматографического экспресс-теста выявления токсинов А и В *C. difficile*. Рекомендуется обследовать на *C. difficile* пациентов отделений хирургического профиля, реанимаций, стационаров общего профиля при спорадических и групповых случаях острых кишечных заболеваний, протекающих с симптомокомплексом колита.

Результаты четырехлетнего микробиологического мониторинга подтвердили, что одно из ведущих значений в развитии антибиотик-ассоциированных диарей принадлежит *C. difficile*. Частота встречаемости инфекции, обусловленной *C. difficile*, в многопрофильном стационаре за период 2008–2011 гг. по данным применяемого ИХА экспресс-теста составила 28,7 %.

Основной причиной развития нозокомиальной и антибиотик-ассоциированной диареи является изменение состава микрофлоры кишечника. Дисбактериоз у данной категории больных выявлен нами в 99,5 % случаев.

При отрицательном ИХА экспресс-тесте на токсины А и В *Clostridium difficile* ААД установленной этиологии (382 случая) чаще всего связаны с дисбиотическими изменениями в виде кандидозов (50,8 %). Обращает на себя внимание тенденция к росту грибковой инфекции при антибиотик-ассоциированных диареях (2008 г. — 37,9 %, 2009 г. — 61,2 %, 2010 г. — 51,4 %, 2011 г. — 55 %). Из условно-патогенной микрофлоры в клиническом материале чаще других встречались *E. faecium* (34,2 %), *Klebsiella spp.* (22,8 %).

Препаратами выбора при лечении являются ванкомицин, метронидазол в сочетании с противогрибковыми препаратами (флуконазол, амфотерицин).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Антибактериальную терапию следует проводить по строгим показаниям. Низкие дозы антибиотиков и укороченные курсы антибактериальной терапии индуцируют селекцию резистентных штаммов болезнетворных бактерий, а неоправданно высокие дозы и пролонгированные курсы антибактериальной терапии обуславливают развитие дисбактериоза толстой кишки высоких степеней (3–4 ст.) и возникновение антибиотик-ассоциированных заболеваний, в т.ч. ААД и ПМК.

В стационарах общего профиля при диареях, параллельно с исследованием кала на кишечную группу инфекций — дизентерию, сальмонеллез, условно-патогенную флору, необходимо проводить исследование кала на *C. difficile* и *Candida spp.*

После выписки больных из стационара проводить лечение дисбактериоза на протяжении 1 года.

Врачам-инфекционистам проводить диспансеризацию больных, перенесших *C. difficile* — инфекцию в течение 1 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антибиотик-ассоциированные диареи — тяжелая внутрибольничная патология / С.В. Верещагина [и др.] // Журнал инфекционной патологии. — 2010. — Т. 17, № 4. — С. 35–36.
2. Лемешевская М.В. Клинико-эпидемиологические аспекты *Clostridium difficile*-ассоциированных заболеваний : автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Иркутск, 2003. — 22 с.
3. Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Иванов Г.А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2002. — Т. 4, № 3. — С. 200–232.
4. Муляр Н.Ф. Комплексное лечение дисбактериоза // Журнал инфекционной патологии. — 2003. — Т. 10, № 4. — С. 76–77.
5. Малов В.А., Бондаренко В.М., Пак С.Г. Роль *Clostridium difficile* в патологии человека // Журнал микробиологии. — 1996. — № 1. — С. 91–96.
6. Муляр Н.Ф. Пробиотики в лечении дисбактериоза // Человек и лекарство : XIV Российский национальный конгресс. — Тез. докл. — М., 2007. — С. 568.

7. Спасов Г.П., Спасов С.Г., Верещагина С.А., Каня О.В. Псевдомембранозный колит — тяжелая нозокомиальная патология // Актуальные вопросы интенсивной терапии. — 2009. — № 25. — С. 64—65.
8. Bartlett J.G. Antibiotic-associated diarrhea // Clin. Infect. Dis. — 1992. — Vol. 15. — P. 573—581.
9. Buchner A.M., Sonnenberg A. Medical diagnoses and procedures associated with *Clostridium difficile* colitis // Am. J. Gastroenterol. — 2001. — Vol. 96. — P. 766—772.
10. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis / D.N. Gerding [et al.] // Infect. Control. Hosp. Epidemiol. — 1995. — Vol. 16. — P. 459—477.
11. Decrease in nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea by restricting clindamycin use / S. Pear [et al.] // Ann. Intern. Med. — 1994. — Vol. 120. — P. 272—277.
12. McFarland L.V. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea // Diagn. Dis. — 1998. — Vol. 16. — P. 292—307.
13. Mylonadis E., Ryan E., Calderwood S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea // Arch. Int. Med. — 2001. — Vol. 161. — P. 525—533.
14. Wilkins T., Lysterly D. *Clostridium difficile* testing: After 20 years, still challenging // J. Clin. microbiol. — 2003. — Vol. 41. — P. 531—534.

Сведения об авторах

Муляр Николай Феодосиевич — врач-инфекционист высшей категории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Иркутская Областная ордена «Знак Почета» клиническая больница, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач РФ (664047, г. Иркутск, ул. А. Невского, д. 25, кв. 64. тел. 29-33-07)

Верещагина Светлана Анатольевна — врач-бактериолог высшей категории, заведующая бактериологической лабораторией ГБУЗ ИОКБ, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры эпидемиологии и микробиологии ИГМАПО

Фадеева Татьяна Владимировна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии и гемостаза, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» Сибирское отделение Российской академии медицинских наук ФГБУ «НЦ РВХ» СО РАМН

Спасов Георгий Петрович — врач-реаниматолог, врач высшей категории, заведующий реанимацией гнойно-септического центра ГБУЗ ИОКБ

Каня Олег Витославович — врач-патологоанатом, врач высшей категории, заведующий отделением ГБУЗ «Иркутское областное патологоанатомическое бюро»

Т.П. Павлова

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГРИБКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ
В г. НИЖНЕУДИНСКЕ И НИЖНЕУДИНСКОМ РАЙОНЕ**

ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» (Иркутск)

В работе приведены данные по распространенности грибковых заболеваний кожи в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе за период с 2006 по 2010 гг. Микозы ногтей преимущественно регистрировались у взрослых, при этом чаще у мужчин (38,1–67,4 %), чем у женщин (26,6–33,5 %). Грибковые поражения волосистой части головы наиболее часто выявлялись у детей (41,8–64,8 %). Дерматофития гладкой кожи среди женщин встречалась в 30–51,5 % случаев, среди мужчин – 31,3–38,8 %. С 2007 г. данное заболевание стали чаще диагностировать у детей (30,4–37,8 %) в связи с выполнением плановых медицинских осмотров в отдаленных населенных пунктах Нижнеудинского района в рамках программы «Дети Севера».

Ключевые слова: дерматофитии, Нижнеудинский район, программа «Дети Севера»

**THE PREVALENCE OF FUNGAL SKIN DISEASES
IN NIZHNEUDINSK AND NIZHNEUDINSK DISTRICT**

T.P. Pavlova

Irkutsk State University, Irkutsk

This paper presents data about the prevalence of fungal infections of the skin in Nizhneudinsk and Nizhneudinsk area for the period from 2006 to 2010 years. The nail fungal infections were recorded primarily in adults, with more males (38,1–67,4 %) than women (26,6–33,5 %). Fungal infections of the scalp were most often detected in children (41,8–64,8 %). Dermatophytosis of smooth skin among women was met in 30–51,5 % of cases and among the men it was 31,3–38,8 %. Since 2007 the disease was diagnosed increasingly in children (30,4–37,8 %) in connection with routine in medical examinations in remote locations of Nizhneudinsk under the Program «Children of the North».

Key words: dermatophytosis, Nizhneudinsk district, the program «Children of the North»

Согласно медицинской статистике, в России грибковые заболевания встречаются у каждого пятого человека, в Москве — у каждого четвертого, и у 50 % в возрасте от 70 лет и выше. В странах Европы онихомикозы выявляют у 3–22 % населения, этому заболеванию подвержены до 45 % лиц старше 60 лет, только во Франции ежегодные расходы на лечение осложнений микотической инфекции составляют 2,7 трлн. евро [4].

Цель данной работы заключалась в проведении исследований по встречаемости грибковых заболеваний кожи в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе (за период с 2006 по 2010 гг.).

МЕТОДИКА

Объектами исследования являлись соскобы, взятые с пораженных участков при обследовании пациентов, обратившихся с жалобами в кожно-венерологический диспансер Нижнеудинского района. За период с 2006 по 2010 г. было обследовано 8960 человек.

После взятия патологический материал помещают на середину предметного стекла, капают 20 % едкий натр. Затем стекло подогревают над пламенем горелки до образования белесоватого ободка по краю капли, не доводя до кипения, накрывают одноразовым покровным стеклом и микроскопируют.

В кожно-венерологическом диспансере Нижнеудинского района диагноз грибкового заболевания

ставится на основании сбора анамнеза, осмотра кожных покровов и обнаружения мицелия и спор грибов при микроскопии патологического материала. После установления диагноза назначается соответствующее лечение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что микозы ногтей преимущественно регистрировались у взрослых, при этом чаще у мужчин, чем у женщин. Заболеваемость мужчин за период с 2006 по 2010 гг. составила 38,1–67,4 % в то время как у женщин — 26,6–33,5 %, а у детей — 5,8–32,3 % (табл. 1).

Среди обратившихся мужчин было много рабочих местного железнодорожного локомотивного депо. Они более подвержены травматизации при рабочих манипуляциях, пользуются общими душевыми, что является одним из причинных факторов поражения ногтей рук и ног. Вышесказанное подтверждается и литературными данными. Так, В.М. Руковишникова (2003) отмечает, что заболеваемость микозами стоп рабочих промышленных предприятий колеблется от 33–65 %. На уровень заболеваемости влияли возраст, стаж работы, условия труда. Высокая возможность инфицирования для рабочих цехов определяется использованием душевыми, санитарное состояние которых было крайне неудовлетворительным, а также неблагоприятным воздействием различных производственных факторов: перепады

Таблица 1

Встречаемость микозов ногтей среди населения г. Нижнеудинска и Нижнеудинского района в 2006–2010 гг.

Год	Всего заболевших за год	Женщины		Мужчины		Дети	
		Количество заболевших	%	Количество заболевших	%	Количество заболевших	%
2006	1004	328	32,6	580	57,7	96	9,5
2007	904	303	33,5	468	51,7	133	14,7
2008	976	308	31,5	456	46,7	212	21,7
2009	866	256	29,5	330	38,1	280	32,3
2010	900	240	26,6	607	67,4	53	5,8

температур, повышенная влажность, воздействие химических веществ. Имеют значение физическое напряжение, витаминная недостаточность, необходимость длительного ношения резиновой обуви и связанные с этим гипергидроз, изменение pH кожи в щелочную сторону, нарушение терморегуляционных рефлексов [3].

В период с 2006 по 2010 г. в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе дерматофитии с поражением волос наиболее часто встречались у детей. Заболеваемость детей за указанный период составила от 41,8 до 64,8 %. У женщин грибковые поражения волосистой части головы обнаруживались в 16,2 – 34,5 % случаев, у мужчин – 12,5 – 27,1 % (табл. 2).

Большая заболеваемость детей, например, микроспорией (это наиболее часто встречающееся высококонтагиозное заболевание) связана со следующими факторами:

- переносчиком данного заболевания являются кошки, с которыми очень любят играть дети;
- у детей несовершенны иммунная и эндокринная системы;
- третьей очень важной особенностью является то, что у детей нет в составе волос особых органических фунгистатических кислот, которые присутствуют у взрослых, а эти кислоты препятствуют развитию грибковых заболеваний [3].

Микроспория традиционно считается болезнью детского возраста. В основном (до 65 %) заболеванию подвержены дети 5–12 лет. Однако в настоящее время этим микозом нередко болеют и взрослые. Сказываются, видимо, неблагоприятные социальные и экологические условия, рост нейро-

эндокринных заболеваний и иммунодефицитных состояний. Если в 1932 г. А.М. Ариевич наблюдал микроспорию у 6 взрослых на 6000 пациентов, то сейчас на долю взрослых приходится до 35 % случаев заболевания. Женщины болеют в четыре раза чаще мужчин, за счет того, что имеются эндогенные предрасполагающие факторы: дисфункция половых желез, щитовидной железы, вегетативные и ангиотрофические расстройства, гиповитаминозы и т.п. [3].

По данным Фахретдинова (1999) и Потеева с соавт. (1997) взрослые болеют редко – преимущественно молодые женщины. Редкость заболевания микроспорией взрослых, особенно с поражением волосистой части головы, и обычно наступающее спонтанное выздоровление при начале пубертатного периода объясняется наличием в волосах взрослых людей фунгистатических органических кислот (в частности, ундициленовой кислоты) [1, 5].

При анализе данных по встречаемости дерматофитии гладкой кожи в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе были получены следующие результаты. За период с 2006 по 2010 г. количество заболевших среди мужчин составляло от 31,3 до 38,8 %. Заболеваемость женщин варьировала от 30 до 33,3 %, за исключением 2006 г., когда было зарегистрировано 51,5 % случаев обнаружения микозов (табл. 3).

По данным обследований детей в 2006 г. количество заболевших составляло 9,5 %. Однако уже в 2007 г. процент обнаруженных случаев микозов гладкой кожи повысился до 31,8 % (табл. 3). Это связано с тем, что с 2007 г. в соответствии

Таблица 2

Встречаемость грибковых заболеваний волосистой части головы среди населения г. Нижнеудинска и Нижнеудинского района в 2006–2010 гг.

Год	Всего заболевших за год	Женщины		Мужчины		Дети	
		Количество заболевших	%	Количество заболевших	%	Количество заболевших	%
2006	48	13	27,0	6	12,5	29	60,4
2007	54	10	18,5	12	22,2	32	59,2
2008	37	6	16,2	7	18,9	24	64,8
2009	70	17	24,2	19	27,1	34	48,5
2010	55	19	34,5	13	23,6	23	41,8

Таблица 3

Встречаемость дерматофитии гладкой кожи в г. Нижнеудинске и Нижнеудинском районе в 2006–2010 гг.

Год	Всего заболевших за год	Женщины		Мужчины		Дети	
		Количество заболевших	%	Количество заболевших	%	Количество заболевших	%
2006	911	470	51,5	354	38,8	87	9,5
2007	842	280	33,2	294	34,9	268	31,8
2008	657	219	33,3	238	36,2	200	30,4
2009	870	280	32,1	273	31,3	317	36,4
2010	766	230	30	246	32,1	290	37,8

с приказом Минздрава РФ, РАМН от 14.09.2001 N 357/85 «О реализации мероприятий федеральной целевой программы «Дети Севера» в 2001 – 2002 гг.» стали проводиться плановые медицинские осмотры среди детей в отдаленных населенных пунктах Нижнеудинского района, таких как район Тофаларии [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы. Микозы ногтей наиболее часто регистрировались у мужчин, что, вероятно, связано с тем, что большая часть обратившихся в кожно-венерологический диспансер – это работники железнодорожного локомотивного депо г. Нижнеудинска. Грибковые поражения волосистой части головы, как и следовало ожидать, наиболее часто выявлялись у детей. Дерматофития гладкой кожи практически с одинаковой частотой встречалась как у женщин, так и мужчин. Следует отметить, что с 2007 г. данное

заболевание стали чаще диагностировать у детей в связи с выполнением плановых медицинских осмотров в рамках программы «Дети Севера».

ЛИТЕРАТУРА

1. Потекаев Н.С., Кудрина М.И., Потекаев Н.Н. Грибковые заболевания // Вестн. дерматол. – 1997. – № 5. – С. 69 – 74.
2. Приказ Минздрава РФ, РАМН от 14.09.2001 N 357/85 «О реализации мероприятий федеральной целевой программы «Дети Севера» в 2001 – 2002 гг.»
3. Руковишникова В.М. Микозы стоп. – М. : ЭликсКом, 2003. – 2-е изд., перераб. и доп. – 332 с.
4. Сергеев А.Ю. Грибковые заболевания ногтей. – М. : Медицина для всех, Национальная академия микологии, 2001. – 164 с.
5. Фахретдинова Х.С. Клинико-эпидемиологические особенности современной микроспории : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 26.03.2007. – М., 1999. – 27 с.

Сведения об авторе

Павлова Татьяна Прокопьевна – магистрант биолого-почвенного факультета ИГУ; направление 020400.68 «Биология», профиль «Микробиология и вирусология», фельдшер-лаборант клинико-диагностической лаборатории Муниципального бюджетного учреждения здравоохранения «Нижнеудинская центральная районная больница», 665106 Иркутская область, г. Нижнеудинск, ул. Кашика, 178, тел. 89500567073, e-mail: tatyana.pavlova.1971@bk.ru

В.Г. Пустозеров, Ю.В. Баженова

**ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ОСТЕОПОРТИЧЕСКИХ ПЕРЕЛОМОВ ПОЗВОНКОВ
У ЛИЦ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА****Государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)
Областной гериатрический центр (Иркутск)**

В статье приводятся данные об эпидемиологии остеопоротических повреждений позвонков у лиц пожилого и старческого возраста г. Иркутска. Показано, что частота остеопоротических повреждений позвонков у лиц пожилого и старческого возраста г. Иркутска составила 28 % (33,9 % у женщин и 22,2 % у мужчин), при этом остеопоротические переломы позвонков были выявлены у 23,6 % (у 28,9 % женщин и у 18,3 % мужчин) полуколичественным и у 22,8 % (28,3 % и 17,2 % соответственно) количественным рентгенологическими методами оценки деформаций позвонков.

Ключевые слова: остеопороз, переломы позвонков, эпидемиология

**EPIDEMIOLOGY OF OSTEOPOROTIC FRACTURES OF VERTEBRAS
IN ELDERLY AND SENILE PERSONS**

V.G. Pustozеров, Y.V. Bazhenova

**State Medical Academy of Postgraduate Training, Irkutsk
Regional Geriatric Center, Irkutsk**

The information about epidemiology of osteoporotic injuries of vertebrae among people of elderly and senile age of Irkutsk is provided in the article. It is shown that frequency of these injuries is 28 % (33,9 % in women and 22,2 % in men), and osteoporotic fractures of vertebrae were revealed at 23,6 % (at 28,9 % of women and at 18,3 % of men) semi-quantitative and at 22,8 % (28,3 % and 17,2 % respectively) quantitative by radiological methods of an assessment of deformations of vertebrae.

Key words: osteoporosis, vertebrae fractures, epidemiology

Знания об эпидемиологии остеопороза позвоночника и его осложнений до последнего времени были ограниченными. Это обусловлено тем, что значительная часть переломов позвоночника протекает бессимптомно. Известно, что только 20–25 % людей с остеопоротическими переломами позвонков обращаются за медицинской помощью [12], и только лишь 10 % из них госпитализируются, несмотря на то, что имели выраженный болевой симптом и снижение качества жизни. Единственным способом реальной оценки распространенности остеопоротических переломов позвонков является проведение специально спланированных популяционных исследований.

Данные по эпидемиологии остеопоротических повреждений позвонков за рубежом и в нашей стране отличаются большой вариабельностью. Самая высокая частота остеопоротических переломов позвонков выявлена в Скандинавских странах (Швеция): 27,8 % у женщин и 26,7 % у мужчин. Следующие по показателям распространенности страны Западной Европы (в Бельгии: 27,7 % у женщин и 25,2 % у мужчин; в Германии: 22,9 % и 15,5 % соответственно) и страны Средиземноморья (в Греции — 24,4 % у женщин и 20,4 % у мужчин; в Испании соответственно 26,6 % у женщин и 21,7 % у мужчин). Еще ниже частота остеопоротических переломов позвонков в странах Восточной Европы (в Чехии 18,6 % у женщин и 12,7 % у мужчин; в Польше 19 % у женщин и 17,5 % у мужчин) [11].

Согласно данным Канадского центра исследования остеопороза (CaMos), при исследовании 9424 мужчин и женщин, распространенность остеопоротических переломов позвонков у лиц старше 50 лет была 21,5 % у мужчин и 23,5 % у женщин (по методу Фелсенберга). В возрасте 50–59 лет распространенность переломов позвонков была выше у мужчин, а в возрастной группе старше 80 лет переломы позвонков преобладали у женщин, составляя 45 % против 36 % у мужчин [8].

В США, в штате Пенсильвания в четырех клинических центрах было проведено проспективное исследование 9704 белых женщины в возрасте 65 лет и старше. Распространенность остеопоротических деформаций позвонков отслеживалась в динамике в течение 15 лет. Из 2680 человек (средний возраст в начале исследования составила 68,8 года, в конце 83,8 года), закончивших исследование, переломы позвонков, выявленные полуколичественным методом Н. Genant, обнаружены у 487 пациенток (18,2 %). Причем у 41,4 % исследуемых имелись предшествующие переломы позвонков [4].

Во Франции с помощью метода Н. Genant была проведена оценка рентгенограмм в прямой и боковой проекциях у 745 женщин в возрасте 75 лет и старше (средний возраст — 80, 1 ± 3, 4 года). Остеопоротические деформации позвонков были обнаружены у 170 женщин, что составило 22,8 % [7].

Распространенность переломов позвонков в популяции жителей Ливана 50 лет и старше была

выше у женщин (19,9 % против 12 % у мужчин) и повышалась с возрастом у лиц обоих полов [3].

При рентгеноморфометрическом исследовании стратифицированной по возрасту случайной выборки 762 Рочестерских постменопаузальных женщин 50-ти лет и старше (по методу Фелсенберга), остеопоротические деформации позвонков выявлены у 182 (25,3 %). При этом у 65 % пациенток деформации позвонков клинически диагностированы не были [5].

В Китае распространенность остеопоротических деформаций позвонков у постменопаузальных женщин в возрасте 50-ти лет и старше составила 19,8 % [10].

Десятилетнее когортное исследование в Японии 400 сельских жителей обоих полов в возрасте 40–79 лет показало: частота остеопоротических переломов позвонков составила 12,8 % у мужчин и 21,5 % у женщин, повышалась с возрастом у лиц обоих полов от 2,9 % у мужчин и 2,1 % у женщин в возрастной группе 40–50 лет до 13,2 % и 20,5 % соответственно в возрасте 60–70 лет и была максимальной в возрастной группе 70–80 лет — 25 % и 54,2 % соответственно [9].

В Италии (Овьедо) исследованы 624 пациента обоих полов. Для диагностики переломов позвонков пользовались полуколичественным методом Genant и количественными методами Eastell и McCloskey. Частота переломов позвоночника колебалась от 17,4 % до 24,6 % в зависимости от использованного метода. В целом, частота переломов у женщин была выше, чем у мужчин. Однако в возрастной группе 60–65 лет частота переломов у мужчин превалировала по сравнению с частотой переломов у женщин такого же возраста [6].

В нашей стране распространенность переломов позвоночника у жителей г. Москвы 50 лет и старше, выявленная количественным рентгенологическим методом, составила 11,8 % (14,5 % у мужчин и 10 % у женщин) [2]. Распространенность остеопоротических переломов позвонков в выборке жителей г. Екатеринбурга 50 лет и старше ($n = 498$), по данным рентгеноморфометрического метода Фелсенберга оказалась ниже и составила 7,1 % без статистически значимых различий у мужчин и женщин [1].

Данные, полученные в разных исследованиях, в разных странах, свидетельствуют о том, что у женщин частота переломов позвонков равномерно повышается с возрастом, значительно возрастая после наступления менопаузы. Это согласуется с представлениями о патогенезе остеопороза. При постменопаузальном остеопорозе потеря костной массы происходит, прежде всего, за счет губчатой ткани, которая преобладает в позвонках. Поэтому длительность менопаузы можно рассматривать как фактор риска остеопороза позвоночника.

Зависимость распространенности деформаций позвонков от возраста у мужчин выглядит иначе, чем у женщин. У них с увеличением возраста показатели нарастают медленно, или даже наблюдается некоторое снижение распространенности

деформаций позвонков в какой-либо пятилетний возрастной период от 55 до 70 лет в сравнении с предыдущим. При этом рост показателей распространенности переломов у мужчин показан только в поздний период жизни, как правило, после 70 лет [3, 6, 9].

Таким образом, проведенные эпидемиологические исследования показали, что деформации позвонков имеют высокую частоту, увеличивающуюся пропорционально возрасту. В России частота переломов позвонков изучалась в центральных районах и на Урале. Показатели распространенности переломов позвонков зависят от метода диагностики и критериев перелома. Отчасти поэтому имеется значительная вариабельность данных по частоте переломов позвонков между центрами, что исключает возможность экстраполяции полученных данных. Результаты многих исследований демонстрируют влияние на возникновение деформаций позвонков при остеопорозе не только расы, но и климатогеографических и социальных условий.

Изучение распространенности остеопоротических деформаций позвонков в Приангарье выявило свои особенности.

МЕТОДИКА

Для изучения частоты остеопоротических повреждений позвонков нами была сформирована случайная выборка из 420 жителей г. Иркутска в возрасте 60 лет и старше. С целью одинакового набора мужчин и женщин в 6 возрастных групп провели стратификацию выборки по полу и возрасту: 210 мужчин и 210 женщин по 35 человек в каждой возрастной группе (60–64 года, 65–69 лет, 70–74 года, 75–79 лет, 80–84 года, 85 лет и старше).

Для формирования выборки использовались списки взрослого населения, прикрепленного к городской поликлинике № 1 г. Иркутска. Набор осуществлялся случайным образом путем включения лиц соответствующего пола и возраста. Приглашение на обследование осуществлялось по телефону. В случае неявки после первого звонка, приглашение осуществлялось повторно.

Всего дало согласие на проведение рентгенографии и приняло участие в исследовании 369 человек. Ответаемость выборки составила 87,9 %. Все лица, включенные в исследование, осматривались и обследовались однократно.

Всем исследуемым (369 человек: 184 женщины и 185 мужчин) на рентгенографическом аппарате фирмы «PHILIPS» было проведено рентгенологическое исследование по стандартной методике. Средний возраст у женщин составил $73,01 \pm 7,1$ года, у мужчин — $72,5 \pm 8,7$ года. Статистическая обработка материала проводилась с применением пакета статистических программ: «Biostat», «Statistica 6,0 for Windows».

Согласно дизайну исследования, спондилограммы 369 человек (184 женщин и 185 мужчины) были оценены полуколичественным рентгенологическим Н. Genant и количественным рентгено-

морфометрическим D. Felsenberg методами оценки остеопоротических деформаций позвонков. Средний возраст у женщин составил $73,01 \pm 7,1$ года, у мужчин — $72,5 \pm 8,7$ года.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении полуколичественной визуальной оценки спондилограмм по методу Н. Genant проанализированы 4522 позвонка, что составило 98,8 % от общего количества исследуемых позвонков (145 позвонков не участвовали в анализе из-за выраженных проекционных изменений).

Снижение любой из высот тел позвонка на 20 % выявлены у 94 человек (у 40 мужчин и 54 женщин), что составило 25,5 % (21,6 % — у мужчин и 29,3 % — у женщин). У женщин деформации позвонков встречались в 1,4 раза чаще, чем у мужчин ($p < 0,05$).

У каждого из 94 человек, имеющих повреждение позвонков, была проведена дифференциальная диагностика между остеопорозом и заболеваниями другой этиологии, сопровождающимися изменениями формы позвонков. После исключения из дальнейшего исследования 9 человек (5 мужчин и 4 женщины), имеющих деформации позвонков иной, чем остеопороз природы, общее количество исследуемых составило 360 человек (180 мужчин и 180 женщин).

Частота остеопоротических переломов позвонков, выявленная методом полуколичественной визуальной оценки Genant у лиц обоего пола приведена в таблице 1.

Средний возраст лиц в группе с остеопоротическими деформациями позвонков был выше, чем в группе без деформаций, как у женщин ($79,8 \pm 5,81$ в группе с переломами и $71,4 \pm 6,9$ в группе без переломов), так и у мужчин ($79,2 \pm 6,08$ и $72,5 \pm 7,03$ соответственно), $p < 0,05$. Статистически значимых различий между средним возрастом у мужчин и у женщин в группах с переломами позвонков и без переломов выявлено не было ($p > 0,05$).

Остеопоротические деформации позвонков были определены у 85 (23,6 %) человек, составив у мужчин — 18,3 %, у женщин — 28,9 % ($p < 0,01$).

Распространенность переломов позвонков повышалась с возрастом. Так в возрасте 60 — 64 лет частота остеопоротических переломов составила 6,7 % у женщин и 3,4 % у мужчин. В возрастной группе 65 — 69 лет: 10 % и 6,7 %, в группе 70 — 74 лет: 19,4 % и 13,3 %, в группе 75 — 79 лет: 33,3 % и 19,4 % и в возрасте 80 — 84 лет: 46,7 % и 30 % соответственно. Максимальная частота переломов определялась у лиц 85 лет и старше — деформации позвонков имели 58,6 % женщин и 36,7 % мужчин.

Во всех возрастных группах частота остеопоротических переломов позвонков была больше у женщин, чем у мужчин, $p < 0,05$. Соотношение мужчины/женщины составило 1:1,5.

В группе лиц с переломами 30 % (10 мужчин и 20 женщин) имели переломы более чем одного позвонка, что составило 35,2 % (30,3 % у мужчин и 38,5 % у женщин), $p > 0,05$.

При этом множественные переломы позвонков (три и более) выявлены у 26 человек (9 мужчин и 17 женщин), что соответствовало 30,6 % (27,3 % у мужчин и 32,7 % у женщин). Частота множественных остеопоротических переломов позвонков в популяции жителей Иркутска была в 1,2 раза выше у женщин, чем у мужчин, без статистически значимой разницы ($p > 0,05$).

На следующем этапе спондилограммы 360 человек (180 женщин и 180 мужчин) исследовали с помощью количественного морфометрического метода Фелсенберга.

Провели количественную оценку формы 4522 позвонков. У 101 (28 %) пациента: 61 (33,9 %) женщины и 40 (22,2 %) мужчин было выявлено 226 деформированных позвонков (134 у женщин и 92 у мужчин).

Общее количество деформированных позвонков колебалось от 1 до 4 у мужчин и от 1 до 7 у женщин. Отмечена положительная связь числа деформированных позвонков с возрастом как у женщин ($r_s = 0,98$, $p < 0,01$), так и у мужчин ($r_s = 0,88$, $p = 0,05$).

Статистически значимой зависимости количества деформированных позвонков от пола выявлено не было, ($p > 0,05$). Выраженность деформаций колебалась от минимальной степени (снижение

Таблица 1
Частота остеопоротических переломов позвонков у жителей г. Иркутска в зависимости от возраста (метод Genant)

Возраст (годы)	Женщины			Мужчины			Оба пола		
	Число исслед-х лиц	Число лиц с переломами		Число исслед-х лиц	Число лиц с переломами		Число исслед-х лиц	Число лиц с переломами	
		Абс.	%		Абс.	%		Абс.	%
60–64	30	2	6,7	29	1	3,4	59	3	5
65–69	30	3	10	30	2	6,7	60	5	8,3
70–74	31	6	19,4	30	4	13,3	61	10	16,4
75–79	30	10	33,3	31	6	19,4	61	16	26,2
80–84	30	14	46,7	30	9	30	60	23	38,3
85 и >	29	17	58,6	30	11	36,7	59	28	47,5
Всего	180	52	28,9	180	33	18,3	360	85	23,6

любого из индексов до 85 %) до «краш» перелома — значительного уменьшения всех размеров тела позвонка (табл. 2).

Минимальные деформации тел позвонков, деформации позвонков 1 и 2 степеней в общей сложности определены у 19 (5,3 %) исследуемых лиц. Самым частым видом повреждений являлись деформации позвонков 3 степени, которые имели место у 25,5 % женщин и 15,5 % мужчин. Деформации тел позвонков 4 степени в 1,6 раз чаще обнаруживались у женщин, чем у мужчин (2,8 % против 1,7 %, $p < 0,05$).

Из 101 пациента (61 женщины и 40 мужчин), имеющих изменения формы тел позвонков, деформации соответствующие диагнозу перелом (снижение любого из индексов на 75 % и более, т.е. деформации позвонков 3 и 4 ст.) были выявлены у 82 человек (51 женщина и 31 мужчина), составив 22,8 % (28,3 % у женщин и 17,2 % у мужчин).

Частота остеопоротических переломов позвонков повышалась с возрастом как у женщин, так и у мужчин. В возрасте 60–64 лет частота переломов позвонков составила 10 % у женщин и 3,3 % у мужчин. В возрастной группе 65–69 лет: 13,3 % и 3,3 %, в 70–74 года: 23,3 % и 16,7 %, в группе 75–79 лет: 33,3 % и 20 % и в возрасте 80–84 года: 40 % и 23,3 % соответственно.

Максимальная частота переломов определялась у лиц 85 лет и старше — переломы позвонков имели 50 % женщин и 36,7 % мужчин.

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена выявил высокую степень зависимости частоты переломов позвонков от возраста как у мужчин ($k = 0,97$; $p < 0,02$), так и у женщин ($k = 1,0$; $p < 0,01$).

Во всех возрастных группах частота остеопоротических переломов позвонков была больше у женщин, чем у мужчин, но статистически достоверная разница определялась только в группах пациентов от 75 лет и старше (рис. 1).

Соотношение мужчины/женщины составило 1:1,6.

Множественные переломы позвонков (три и более) определялись у 24 (6,7 %) исследуемых лиц пожилого и старческого возраста, т.е. у каждого третьего пациента с переломами позвонков. Часте встречались у женщин — 17 (9,4 %) против 7 (3,9 %) у мужчин ($p < 0,05$).

Распределение двух самых частых типов деформаций позвонков (клиновидной и двояковогнутой) по локализациям у женщин и мужчин носило бимодальный характер с пиками в среднегрудном (Th_7 , Th_8) и грудопоясничном (Th_{12} , L_1 , L_2) отделах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение эпидемиологии остеопоротических переломов позвонков у жителей Иркутска пожилого и старческого возраста выявило высокие показатели у лиц обоего пола (22,8 % по методу Felsenberg и 23,6 % по методу Genant).

Таблица 2
Частота остеопоротических повреждений позвонков у лиц пожилого и старческого возраста г. Иркутска (метод D. Felsenberg)

Степень деформаций позвонков	Женщины (n = 180)	Мужчины (n = 180)	Оба пола (n = 360)
Min степень (99–85 %)	3 (1,7%)	2 (1,1%)	5 (1,4%)
1 степень (84–80 %)	4 (2,2%)	3 (1,7%)	7 (1,9%)
2 степень (79–75 %)	3 (1,7%)	4 (2,2%)	7 (1,4%)
3 степень (< 75 %) – перелом	46 (25,5%)	28 (15,5%)	74 (20,6%)
4 степень – «краш» перелом	5 (2,8%)	3 (1,7%)	8 (2,2%)
Всего	61 (33,9%)	40 (22,2%)	101 (28%)

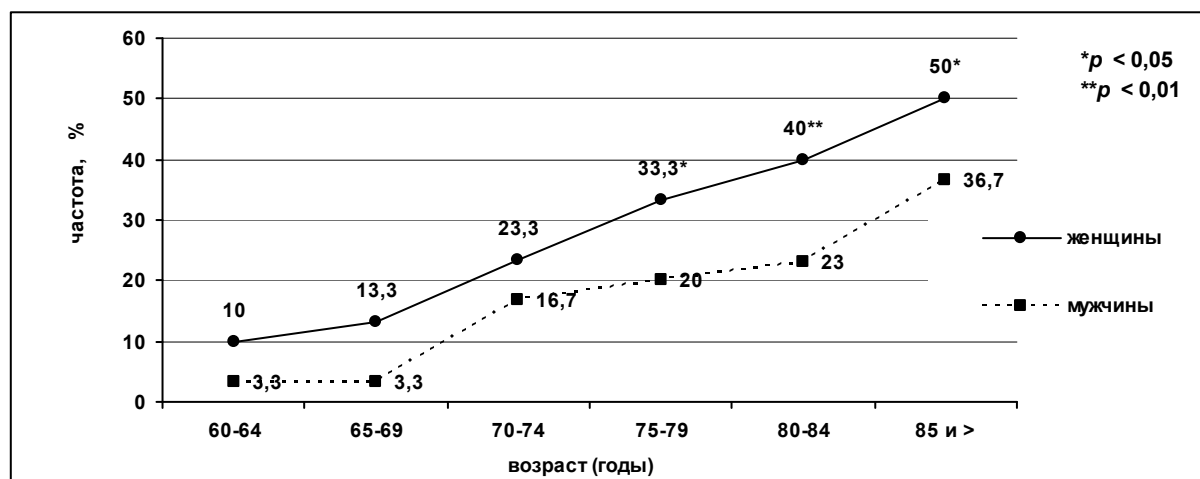


Рис. 1. Частота остеопоротических переломов позвонков в различных возрастных группах у жителей г. Иркутска (метод Felsenberg).

Частота переломов позвонков у мужчин составила 17,2 % по методу Felsenberg и 18,3 % по методу Genant, у женщин 28,3 % и 28,9 % соответственно.

Преобладание остеопоротических позвонков у женщин, по сравнению с мужчинами, наблюдалось во всех возрастных группах ($p < 0,05$). Соотношение мужчины/женщины в среднем составило 1:1,5.

Отмечен статистически достоверный рост частоты переломов позвонков с возрастом у лиц обоего пола. У представительниц слабого пола наблюдалось преобладание как общего числа деформированных позвонков (33,9 % у женщин против 22,2 % у мужчин), так и переломов позвонков более тяжелой степени у мужчин (2,8 % против 1,7 % соответственно).

Множественные переломы позвонков (три и более) определялись у 24 (6,7 %) исследуемых лиц пожилого и старческого возраста (у каждого третьего пациента с переломами позвонков). Чаще встречались у женщин — 17 (9,4 %) против 7 (3,9 %) у мужчин.

Проведение дифференциальной диагностики показало, что удельный вес деформаций позвонков иной, чем остеопороз природы, составляет 9,6 % (13,1 % у мужчин и 7,1 % у женщин).

Анализ различных типов остеопоротических деформаций позвонков показал явное преобладание клиновидных переломов (76,9 %) как у мужчин, так и у женщин ($p < 0,05$).

Распределение переломов позвонков по локализации ($Th_4 - L_4$) у лиц обоего пола имеет бимодальный характер с пиками в среднегрудном (Th_7, Th_8) и грудопоясничном (Th_{12}, L_1, L_2) отделах. Отмечена хорошая диагностическая сопоставимость двух рентгенологических методов диагностики (полуколичественного Н. Genant и количественного D. Felsenberg), что делает возможным применение более простого из них, полуколичественного метода Н. Genant в широкой практической деятельности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евстигнеева Л.П. Эпидемиологическое исследование остеопоротических деформаций

позвонков у жителей города Екатеринбурга старших возрастных групп: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Екатеринбург, 2002. — 25 с.

2. Михайлов Е.Е. Эпидемиологическая характеристика остеопороза в популяционной выборке городского населения : автореф. дис. ... докт. мед. наук // М., 2002. — 38 с.

3. Baddoura R. Vertebral fracture risk and impact of database selection on identifying elderly Lebanese with osteoporosis // Bone. — 2007. — Vol. 40, N 4. — P. 1066 — 1072.

4. Cauley J.A. Long-term risk of incident vertebral fractures // JAMA. — 2007. — Vol. 19, N 23. — P. 2761 — 2770.

5. Cockerrill W. Does location of vertebral deformities within the spine influence back pain and disability? // Ann. Rheum. Dis. — 2000. — N 3. — P. 368 — 371.

6. Diaz Lopez J. Prevalence de fracture vertebral en poblacion asturiana mayor de 50 anos de acuerdo con diferentes criterios radiologicos // Med. clin. — 2000. — N 5. — P. 326 — 331.

7. Grados F. Prevalence of vertebral fractures in French women older than 75 years from the EPIDOS study // Bone. — 2004. — Vol. 34, N 2. — P. 362 — 367.

8. Jackson S.A. Vertebral Fracture Definition from Population: Preliminary Results from the Canadian Multicenter Osteoporosis Study (CaMos) // Osteoporos. Int. — 2000. — Vol. 11, N 6. — P. 680 — 687.

9. Kitazawa A. Prevalence of vertebral fractures in a population-based sample in Japan // Bone Miner. Res. — 2001. — Vol. 19, N 2. — P. 115 — 118.

10. Ling X. Vertebral fractures in Beijing, China // J. Bone Miner. Res. — 2000. — Vol. 15, N 10. — P. 2019 — 2025.

11. O' Neill T.W. The European Vertebral Osteoporosis Study Group: EVOS-study // Rheumatol. Eur. — 2008. — Vol. 24, N 1. — P. 75 — 81.

12. Shen M. Osteoporotic vertebral compression fractures: a review of current surgical management techniques // Am. J. Orthop. — 2007. — Vol. 36, N 5. — P. 241 — 248.

Сведения об авторах

Пустозеров Виктор Георгиевич — главный врач областного гериатрического центра, кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой геронтологии и гериатрии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования, 664047, г. Иркутск, м-он Юбилейный, 100, тел. 8(3952) 24-12-86, сот 660-414, e-mail: Dr.Pystozеров@bk.ru
Баженова Юлия Викторовна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры лучевой диагностики Иркутской государственной академии последипломного образования, 664047, г. Иркутск, м-он Юбилейный, 100, тел. 8(3952)46-53-44, e-mail: rg.dr@mail.ru

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

УДК 371

О.В. Галазий

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ ФИЗИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ У ДЕТЕЙ СТАРШЕГО ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА С ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ОСНОВ ЗДОРОВОГО ОБРАЗА ЖИЗНИ В УСЛОВИЯХ ДЕТСКОГО ДОШКОЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ

Институт повышения квалификации работников образования (Иркутск)

В условиях детского дошкольного учреждения применение методов физической культуры способствует повышению статуса здоровья детей, ослабленных туберкулезной интоксикацией, нормализует психо-эмоциональное состояние ребенка, способствует формированию основ здорового образа жизни.

Ключевые слова: дети дошкольного возраста, туберкулезная интоксикация, методы физической культуры, формирование основ здорового образа жизни

THE USE OF PHYSICAL CULTURE METHODS IN PRESCHOOL CHILDREN WITH TUBERCULOUS INTOXICATION IN THE PROCESS OF THE BASIS FORMATION OF HEALTHY LIFESTYLE IN THE CHILDREN'S PRE-SCHOOL ESTABLISHMENT

O.V. Galaziy

The Institute of advanced training of the educators qualification, Irkutsk

The use of the physical culture methods in the children's pre-school establishment promote health status improving in children with tuberculosis intoxication, normalizes the psycho-emotional condition of the children, promote of the basis formation of the healthy lifestyle.

Key words: pre-school children, tuberculosis intoxication, physical culture methods, basis formation of the healthy lifestyle

АКТУАЛЬНОСТЬ

Туберкулез является социально значимым заболеванием. На фоне сложного экономического положения многих семей, невысокого социально-культурного уровня отдельных граждан и неблагоприятной экологической обстановки в ряде городов и населенных пунктов Иркутской области существует угроза заражения взрослого и детского населения туберкулезом, что позволяет считать эпидемиологическую ситуацию в регионе напряженной. Решать задачи, связанные с профилактикой заражения туберкулезом важно разными путями. Один из них — это повышение резистентности организма ребенка методами физической культуры и формирование мотивации к ведению здорового образа жизни (ЗОЖ).

МЕТОДИКА

Для выполнения данной задачи на базе муниципального дошкольного образовательного учреждения детский сад присмотра и оздоровления № 72 г. Ангарска была проведена работа с целью изучения влияния физкультурных занятий на формирование представлений о здоровом образе жизни у детей старшего дошкольного возраста с туберкулезной интоксикацией. Объектом иссле-

дования являлись представления детей старшего дошкольного возраста о ЗОЖ. Предметом исследования явился процесс формирования представлений о ЗОЖ у детей старшего дошкольного возраста на физкультурных занятиях. За основу взяты теоретические положения психологии о закономерностях формирования знаний у детей дошкольного возраста, теория о деятельностном подходе к развитию ребенка, которая признает главенствующую роль деятельности в развитии ребенка (ведущий вид деятельности дошкольника — игра) и учение И.М. Сеченова, И.П. Павлова о роли первой и второй сигнальной систем высшей нервной деятельности человека в образовании условно-рефлекторных связей.

В качестве методической основы использовали методику развивающей педагогики оздоровления В.Т. Кудрявцева, Б.Б. Егорова [5] и методику занятий дыхательной гимнастикой с детьми дошкольного возраста Б.Б. Кочетковой [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что формирование основ ЗОЖ и появление предпосылок мотивации к сохранению и развитию собственного здоровья у детей в экспериментальных группах значительно отличались

от контрольной. Индекс здоровья воспитанников старшего дошкольного возраста в группах наблюдения увеличился на 2,2 %. Показатели общей заболеваемости изменились в сторону снижения (с 1650 в 2009 г. до 1478 в 2010 г.), наметилась положительная динамика перевода детей из III во II группу здоровья (с 24 % в 2009 г. до 28,5 % 2010 г.). Сравнительные показатели сформированности представления у детей старшего дошкольного возраста в группах наблюдения об основах здорового образа жизни также претерпели значительные изменения (в 2,5 раза увеличилось количество детей со средним уровнем сформированности представления о ЗОЖ (с 20 до 50 %) и уменьшилось с 80 до 30 % — с низким уровнем).

Результаты исследований показали, что использование различных методов физической культуры дают более высокий результат, поскольку опираются на психо-физиологические особенности детей дошкольного возраста [1, 6]. В этот период развития происходит не только рост и развитие организма, увеличивается объем легких [7], чему также способствуют физические упражнения и специальная дыхательная гимнастика, но также у ребенка в этот период ведущей деятельностью является биологическая потребность в движении. Эта потребность проявляется в единстве с потребностью получения удовольствия от участия в двигательной деятельности, она сочетается с новой потребностью ребенка — в самоутверждении. Поэтому реализация биологической потребности в движении в условиях детского сада и может являться наиболее перспективным направлением в решении задач профилактики заболевания туберкулезом. Формирование основ ЗОЖ также важно строить на интересе детей к занятиям физическими

упражнениями. Это позволяет формировать умения и навыки обеспечения здоровой жизнедеятельности; мотивацию на здоровье, что подразумевает высокую сопротивляемость организма к неблагоприятным факторам. Физическая и спортивная культура ребенка — это тот фундамент, на котором формируется и здоровая жизнедеятельность и здоровый стиль жизни [2].

Таким образом, эффективным дополнением к традиционным способам профилактики и лечения туберкулезной интоксикации является использование методов физической культуры, способствующих формированию основ здорового образа жизни и культуры здоровья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Здоровьеформирующее физическое развитие: Развивающие двигательные программы для детей 5—6 лет: пособие для педагогов дошкольных учреждений. — М., 2001. — 336 с.
2. Исакова Е., Смородина Т. Формирование у детей навыков ЗОЖ // Дошкольное воспитание. — 2004. — № 3. — С. 13—16.
3. Кенеман А.В., Хухлаева Д.В. Теория и методика физического воспитания детей дошкольного возраста. — М., 1972. — 271 с.
4. Кочеткова Л.В. Оздоровление детей в условиях детского сада. — М., 2005. — 105 с.
5. Кудрявцев В.Т., Егоров Б.Б. Развивающая педагогика оздоровления: Программно-методическое пособие. — М., 2000. — 296 с.
6. Рунова М.А. Двигательная активность ребенка в детском саду. — М., 2004. — 256 с.
7. Чабовская А.П., Голубев В.В., Егорова Т.И. Основы педиатрии и гигиены детей дошкольного возраста. — М., 1987. — 272 с.

Сведения об авторе

Галазий Ольга Владимировна — к.м.н., доцент кафедры начальных ступеней развития ребенка Иркутского института повышения квалификации работников образования (664007, г. Иркутск, ул. 1-я Красноказачья, 10А, сот. тел 8-950-120-22-75)

Т.В. Зверева, Н.С. Гордейко

**ВОЗМОЖНОСТЬ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ
ПО ИНФЕКЦИЯМ, ПЕРЕДАВАЕМЫМ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ,
НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О ЧИСЛЕННОСТИ И АКТИВНОСТИ ПЕРЕНОСЧИКА****ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора (Уссурийск, Находка)**

В статье проведен графический и статистический анализ двенадцатилетних данных по заболеваемости инфекциями, передаваемыми иксодовыми клещами, их численности и активности на территории юга Приморского края. Установлено наличие достоверной связи между заболеваемостью и уровнем активности переносчиков, а так же наличие обратной зависимости между активностью клещей и заболеваемостью клещевым энцефалитом и болезнью Лайма.

Ключевые слова: иксодовые клещи, активность, численность, заболеваемость

**ABILITY TO ASSESS THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF INFECTIONS
TRANSMITTED BY IXODES TICKS ON THE BASIS OF THE NUMBER AND ACTIVITY
OF THE VECTOR**

T.V. Zvereva, N.S. Gordeyko

«Primorskaya antiplague station», Ussuriysk, Nakhodka

We performed graphic and statistical analysis of twelve-year data concerning the incidence of infections transmitted by Ixodes ticks, their abundance and activity in the south of Primorye territory. We found significant correlation between the incidence and level of vectors activity, as well as inverse relationships between activity of ticks and tick-borne encephalitis incidence and Lyme disease.

Key words: ticks, activity, incidence, disease

В Приморском крае сохраняется высокий уровень заболеваемости населения инфекциями, передаваемыми иксодовыми клещами, особенно клещевым вирусным энцефалитом (КЭ), иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) и риккетсиозами (КР). Кроме того, регистрируются более редкие и менее изученные заболевания человека: моноцитарный эрлихиоз, гранулоцитарный анаплазмоз, бабезиоз и др. [1, 4, 5]. В структуре краевой заболеваемости преобладают ИКБ, а наиболее редок КЭ [3]. Тем не менее, среднепогодный показатель проявления заболеваемости КЭ в Приморском крае за первое десятилетие XXI века составил 3,79 случаев на 100 тыс. населения, что выше показателя по России ($2,96^{0/}_{0000}$). Все это обуславливает необходимость всестороннего изучения популяций переносчика как одной из причин сохранения эпидемиологической напряженности.

На территории Приморского края зарегистрировано 17 видов иксодовых клещей [2], из которых массовыми являются: *Ixodes persulcatus* Schulze, *Haemophysalis concinna* Koch, *Haemophysalis japonica* Nutall et Warburton, *Dermacentor silvarum* Olevin. Показателями, которые обычно применяют для характеристики эпидемиологической обстановки по инфекциям, передаваемым клещами, помимо непосредственно заболеваемости, служат относительная численность и активность переносчика. Последнюю оценивают по данным об обращаемости населения в медицинские учреждения с укусами клещами.

Цель работы — оценить возможность использования данных по изменению численности и активности иксодовых клещей для прогноза тенден-

ций изменения эпидемиологической ситуации по инфекциям, передаваемым ими, в южных районах Приморского края.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные о численности иксодовых клещей получены в ходе эпизоотологического обследования прибрежных (Находкинский городской округ и Партизанский район в 2000 — 2011 гг.) и континентальных территорий (Уссурийский городской округ, Уссурийский, Михайловский и Октябрьский районы в 2007 — 2011 гг.) юга Приморского края.

Сбор имаго осуществляли по стандартной методике на флаг с растений и одновременно на учетчика [7]. В работе приведены суммарные показатели обилия массовых видов голодных особей иксодовых клещей в период их максимальной сезонной активности. Всего в прибрежной зоне отработано 689,5 флагов-часов и собрано 24222 клеща, а в континентальной — 123 флагов-часа и 5170 имаго.

Для анализа обращаемости населения по количеству укусов клещами использованы данные Находкинского противочумного отделения за 2000 — 2011 гг. Всего за этот период зафиксировано 2051 обращение. Данные по заболеваемости предоставлены филиалами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае» по г. Находке и г. Уссурийску.

Результаты обработаны с помощью стандартных методов биометрии [6] в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основу работы положены более длинные временные ряды наблюдений за эпизоотологической

обстановкой, полученные в прибрежной части Приморского края. Данные по континентальной части использованы для уточнения выявленных тенденций.

Визуальный анализ динамики показателей численности и активности клещей за 12 лет (рис. 1) показывает синхронный характер их изменения, что наглядно проявляется при рассмотрении линий трендов.

За анализируемый период локальные минимумы исследуемых показателей в прибрежной части юга Приморского края приходились на 2001 и 2008 гг. (рис. 1). Пик обилия иксодовых клещей наблюдался в 2009 г., а максимум укусов населения — годом позже. Суммарная численность иксодид в 2010 г. составила 25 экз. на флаго-час (рис. 1). Однако резкое снижение обилия имаго в 2010 г. объясняется обследованием в этот сезон преимущественно не кедрово-широколиственных лесов, а зон дубняков и луго-кустарниковых биотопов, где численность наиболее массового вида и основного переносчика возбудителей болезней — *I. persulcatus* всегда значительно ниже. Поэтому показатель численности в 2010 г. при дальнейших расчетах заменен нами значением средней арифметической за 2009 и 2011 гг. Сравнение характера изменения обилия иксодовых клещей и данных по обращаемости населения по поводу присасывания имаго на прибрежных территориях выявило достоверную корреляцию двух показателей ($r = 0,589$; $p < 0,05$).

Аналогичный анализ изменения показателей численности и активности иксодовых клещей, проведенный на материалах более коротких временных рядов, характеризующих континентальную зону, подтверждает выявленную между ними связь ($r = 0,727$). Однако в силу небольшого числа наблюдений коэффициент корреляции в этом случае не значим ($p > 0,05$). Этот пример наглядно отражает необходимость осторожного подхода при интерпретации материалов, полученных на основе анализа данных за короткие временные интервалы.

Учитывая оговоренную выше возможность изменения обследуемых районов при проведении ежегодных учетов численности иксодовых клещей, и, соответственно, смещения оценок их обилия,

считаем, что использование данных по активности переносчика, позволяет более объективно оценить эпидемиологическую обстановку по трансмиссивным зоонозам. Вывод о большей целесообразности применения показателя активности клещей, по сравнению с данными об их численности, для прогноза эпидемиологической обстановки, содержится в работах и других авторов [1, 6–9].

Оценивая изменение уровня заболеваемости населения Приморского края клещевым энцефалитом, клещевыми боррелиозами и риккетсиозами, необходимо отметить, что в последнее десятилетие отмечается уменьшение количества случаев по всем трем нозологическим формам [10]. Динамика суммарной заболеваемости представлена на рисунке 2. Анализ связи между активностью иксодовых клещей и уровнем заболеваемости населения зоонозными трансмиссивными инфекциями выявил отрицательные значения коэффициентов корреляции: с КЭ $r = -0,768$ ($p < 0,01$); с ИКБ $r = -0,851$ ($p < 0,001$); с КР $r = -0,509$ ($p > 0,05$). Одной из причин этого может быть возрастающая настороженность населения, которое все чаще обращается в медицинские учреждения после контактов с иксодовыми клещами. Так как проявление клинических форм болезней наблюдается преимущественно у не прошедших курс профилактики, т.е. не обратившихся в медицинские учреждения [1], то увеличение выявляемости контактов, в конечном итоге, должно вызвать снижение заболеваемости. Возможно также, что отрицательные корреляции отражают разнонаправленность в реакции паразитарной системы в зоне воздействия прибрежного климата на определенные абиотические факторы (например, температуру, влажность, количество осадков и др.), приводящих к диаметрально противоположным изменениям в популяциях переносчика и возбудителя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного анализа связи между эпидемиологической обстановкой по заболеваемости населения юга Приморского края инфекциями, передаваемыми клещами, а также показателями численности и

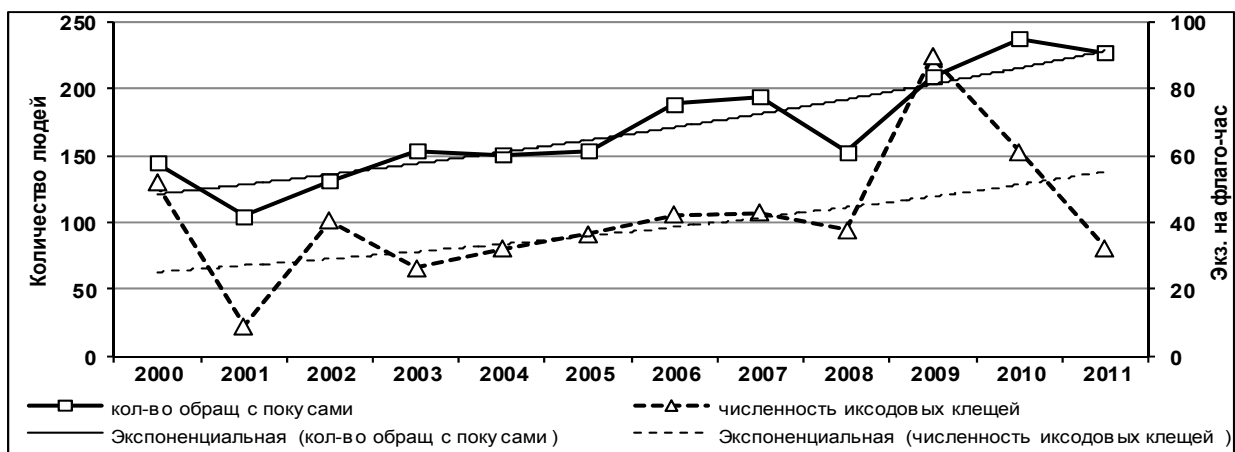


Рис. 1. Динамика численности и активности иксодовых клещей в прибрежных районах юга Приморского края.

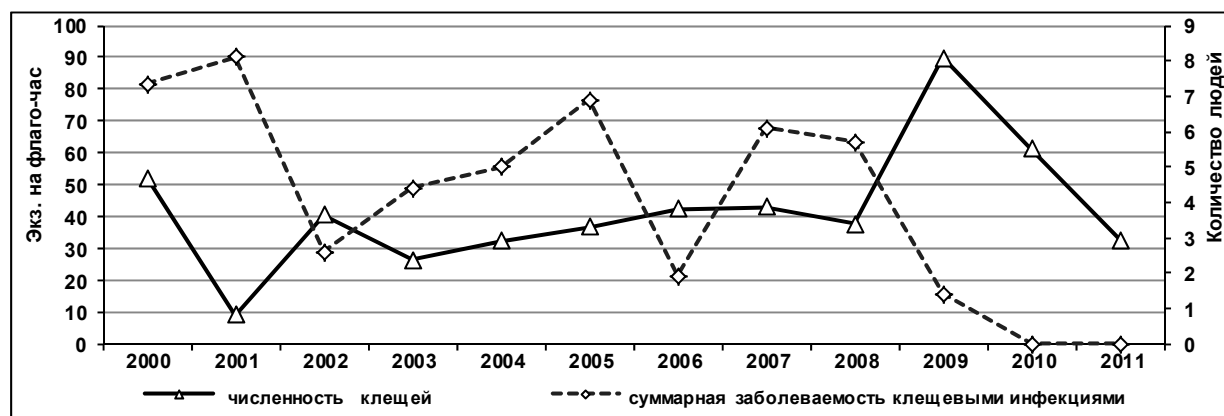


Рис. 2. Динамика суммарной заболеваемости населения инфекциями (число случаев на 100 тыс. населения), передаваемыми клещами, и активности иксодовых клещей.

активности переносчика, установлена достоверная положительная связь между двумя последними переменными. Вместе с тем, все три нозологические формы в первом десятилетии XXI века отрицательно коррелировали с численностью и активностью иксодовых клещей, причем для КЭ и ИКБ на статистически значимом уровне.

Одной из возможных причин не выявления функциональной связи обилия переносчика и уровня заболеваемости населения, может быть отклонение в регулярности и объеме мониторинга численности иксодовых клещей от оптимальной схемы, в качестве которой признан подекадный учет. При невозможности соблюдения такой схемы учетных работ для более точной оценки эпидемиологической обстановки по инфекциям, передаваемым клещами, лучше использовать показатель активности иксодовых клещей. Еще одной причиной может являться разнонаправленное действие на изучаемые показатели со стороны факторов внешней среды.

Полученные данные позволяют признать: а) следует осторожно относиться к применению показателей, характеризующих численность и активность иксодовых клещей в качестве предикторов эпидемиологической обстановки по инфекциям, передаваемым этими переносчиками; б) при оценке эпидемиологической ситуации повышенное внимание следует уделять изучению причин и закономерностей изменения состояния популяций возбудителей зоонозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болотин Е.И., Ананьев В.Ю., Бурухина Е.Г. Некоторые особенности экологии клещевых инфекций в Приморском крае // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2009. — № 3 (38). — С. 63–65.
2. Болотин Е.И. Зоогеографический анализ фауны иксодовых клещей (PARASITIFORMIS, IXODIDAE) // *Чтения памяти А.И. Куренцова :*

материалы науч. конф. — Владивосток : Дальнаука, 2000. — Вып. 9. — С. 65–90.

3. Захарова Г.А., Радченко Л.П. О состоянии заболеваемости природно-очаговыми трансмиссивными инфекциями в Приморском крае // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2010. — № 1–2 (41–42). — С. 133–137.

4. Захарова Г.А. Состояние паразитарной системы в очагах клещевого энцефалита // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2011. — № 3 (46). — С. 33–36.

5. Коренберг Э.И., Юркова Е.В. Проблема прогнозирования эпидемического проявления природных очагов болезней человека // *Мед. паразитол.* — 1983. — № 3. — С. 3–10.

6. Никитин А.Я., Антонова А.М. Учеты, прогнозирование и регуляция численности таежного клеща в рекреационной зоне г. Иркутска. — Иркутск : Изд-во Иркутского ун-та, 2005. — 116 с.

7. Никитин А.Я., Козлова Ю.А., Погодаева М.В. Изменения численности клещей и заболеваемости населения клещевым энцефалитом в пригородах Иркутска // *Пест-менеджмент.* — 2010. — № 3. — С. 30–34.

8. Погодаева М.В., Сосунова И.А., Никитин А.Я. Базовые методы статистического анализа : учеб.-метод. пособие. — Иркутск : Изд-во Иркутского лингвистического ун-та, 2007. — 30 с.

9. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих — переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций: Методические указания МУ 3.1.1027-01. — М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. — 55 с.

10. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Приморском крае / В.М. Воронок [и др.] // *Здоровье. Медицинская экология. Наука.* — 2009. — № 1–2 (41–42). — С. 122–124.

Сведения об авторах

Зверева Татьяна Викторовна — зоолог ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора (г. Находка) (692913, Приморский край, г. Находка, ул. Пограничная, д. 98«А»; тел. 8 (4236)629526; E-mail: tat3081@yandex.ru)
Гордейко Наталья Станиславовна — зоолог ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора (г. Уссурийск) (692512, Приморский край, г. Уссурийск, ул. Дзержинского, д. 46, тел. 8(4234)343085)

Н.И. Зюбина, Г.И. Бишарова

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ДЕТСКОГО НАСЕЛЕНИЯ
ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ****Читинский филиал Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Чита)**

В статье представлены результаты исследования состояния здоровья детского населения Забайкальского края. Показана распространенность отдельных нозологических форм хронической патологии в зависимости от возраста и места проживания, выявлены причины формирования той или иной патологии.

Ключевые слова: хроническая патология, дети, школьники

EVALUATION OF CHILD HEALTH IN TRANSBAIKAL REGION

N.I. Zyubina, G.I. Bisharova

Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Chita

The paper presents the results of health status study in pediatric population of the Transbaikal region. It was shown the prevalence of some forms of chronic diseases in dependence on age and residence. In addition, we revealed factors influencing to pathology development.

Key words: chronic pathology, children, students

ВВЕДЕНИЕ

За последние два десятилетия одним из последствий неблагоприятных изменений в различных сферах жизнедеятельности общества стало ухудшение здоровья детей, в том числе рост хронических форм соматической патологии и психических расстройств, повышение частоты врожденных пороков развития, «возрождение» старых инфекций (туберкулез, инфекции, передаваемые половым путем), распространение алкоголизма, наркомании, снижение показателей физического развития [1]. Несмотря на принимаемые меры, показатели детского здоровья остаются неудовлетворительными. По данным, представленным на XVII съезде педиатров России (2010 г.), 40 % детей рождаются больными или заболевают в период новорожденности, ежегодно на 5–6 % растет общая заболеваемость детей всех возрастов, более чем у 50 % подростков диагностированы заболевания, которые в дальнейшем могут отрицательно повлиять на репродуктивную функцию, ежегодно 30 % юношей в возрасте 17 лет признаются негодными к военной службе по состоянию здоровья [4, 5].

В Российской Федерации до 60 % детского населения страдает различными соматическими заболеваниями, причем заболеваемость среди детского населения продолжает расти [4].

По данным официальной статистической отчетности распространенность патологии и заболеваемость среди детей в возрасте от 3 до 17 лет включительно, ежегодно увеличивается на 4–5 % [1, 3]. Результаты выборочных научных исследований свидетельствуют о том, что в настоящее время не более 10 % детей старшего дошкольного и не более 5 % детей старшего подросткового возраста можно считать абсолютно здоровыми. Почти у 60 % детей выявляются хронические заболевания. Преимуще-

ственный рост за последнее десятилетие патологии костно-мышечной системы, органов пищеварения, болезней системы кровообращения, эндокринной системы и расстройств питания определил произошедшее изменение структуры выявляемой у детей патологии. Данные клинико-эпидемиологических исследований свидетельствуют о значительном увеличении распространенности тяжелых форм заболеваний, об изменении клинической картины их течения [2, 3].

Целью нашего исследования было проследить распространенность наиболее часто встречающихся хронических форм соматической патологии среди детского населения в зависимости от возраста и места проживания.

Задачи исследования:

- провести анализ распространенности хронической патологии в зависимости от места проживания;
- провести анализ рангового распределения хронической патологии;
- выявить факторы, влияющие на развитие той или иной хронической патологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследования проводились на базе Краевого детского консультативного диагностического центра (гл. врач проф., д.м.н. Г.И. Бишарова), а также непосредственно в районах Забайкальского края (Газимуро-Заводском, Каларском, Тунгокоченском, Шелопугинском).

Все дети были разделены на группы в зависимости от места проживания (табл. 1).

1 группа — жители г. Читы (учащиеся МОУ СОШ № 9) — 1061 человек. Из них с хронической патологией 547 (51,6 %);

2 группа — жители Северных районов Забайкальского края (Каларский, Тунгокоченский

Таблица 1

Распределение детей по группам в зависимости от возраста и места проживания

	7–10 лет		11–14 лет		15–17 лет	
	всего осмотрено	из них с патологией	всего осмотрено	из них с патологией	всего осмотрено	из них с патологией
1 группа	390	171 (44 %)	446	240 (54 %)	225	136 (60,5 %)
2 группа	224	96 (43 %)	388	217 (56 %)	196	101 (51,5 %)
3 группа	291	124 (43 %)	327	175 (53,5 %)	313	137 (44 %)

районы) — 838 человек. Из них с хронической патологией 414 (49 %);

3 группа — жители Южных районов Забайкальского края (Газимуро-Заводский, Шелопугинский) — 931 человек. Из них с хронической патологией 436 (47 %).

По возрастам все дети также были разделены на 3 группы:

7–10 лет — младший школьный возраст;

11–14 лет — средний школьный возраст;

15–17 лет — старшие школьники.

Из таблицы 1 видно, что количество детей с хронической патологией увеличивается по мере увеличения возраста, независимо от места проживания. Обращает на себя внимание, что рост хронической патологии по мере взросления более выражен среди городских школьников 15–17 лет (на 6–9 %) по сравнению с сельскими жителями.

По нозологическим формам распределение следующее: основные 3 ранговых места занимает эндокринная патология, патология желудочно-кишечного тракта и патология мочевой системы. Среди патологии эндокринной системы основными являются: диффузный эндемический зоб, который составил 320, 213, 351 случаев на 1000 в данных возрастных группах соответственно, ожирение или избыток массы тела (139, 82, 97 на 1000 соответственно) и задержка физического развития (83, 172, 145 на 1000).

Диффузные изменения со стороны щитовидной железы наиболее выражены среди школьников, проживающих в Южных районах края и городских школьников, тогда как избыточная масса тела преобладает среди младших и старших школьников, проживающих в городе, а дефицит массы тела и задержки физического развития наиболее выражены у школьников, проживающих в Северных районах Забайкальского края (рис. 1–3).

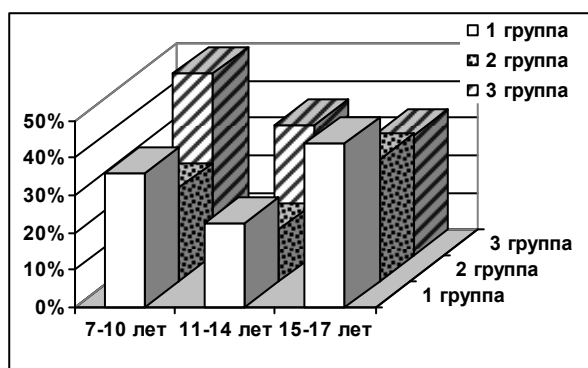


Рис. 1. Диффузный эндемический зоб.

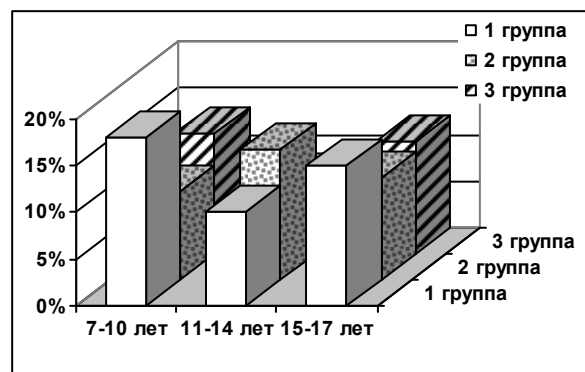


Рис. 2. Ожирение, избыток массы тела.

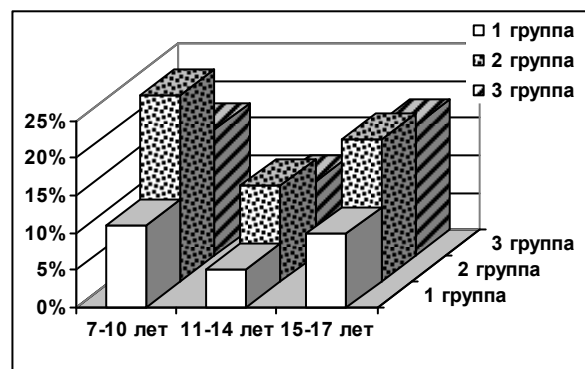


Рис. 3. Задержка физического развития, дефицит массы тела.

ПАТОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Из патологии желудочно-кишечного тракта мы выделили дисфункции билиарного тракта (207, 290, 234 на 1000 случаев хронической патологии по группам соответственно) и хронический поверхностный гастрит (55, 73, 113 на 1000 случаев).

Хроническая патология желудочно-кишечного тракта наиболее выражена у детей, жителей районов, причем среди детей, жителей Севера она представлена как в виде дисфункций билиарного тракта, так и в виде хронических гастритов (рис. 4–5). Обращает на себя внимание значительно увеличивающееся с возрастом количество хронических гастритов среди школьников, проживающих в Южных районах края и городских школьников, что, очевидно связано с особенностями питания подростков (сухоедение, фаст-фуды).

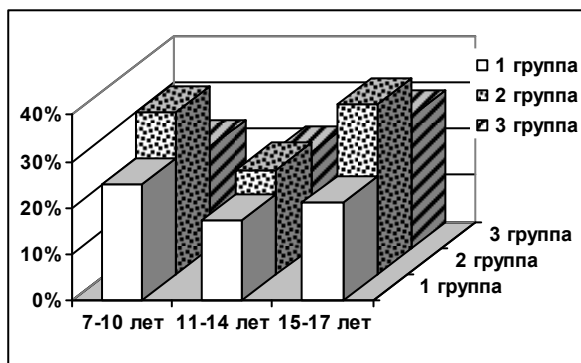


Рис. 4. Дисфункции билиарного тракта.

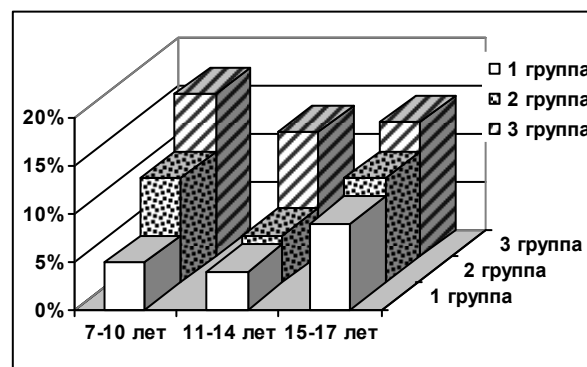


Рис. 7. Хронический пиелонефрит в стадии ремиссии.

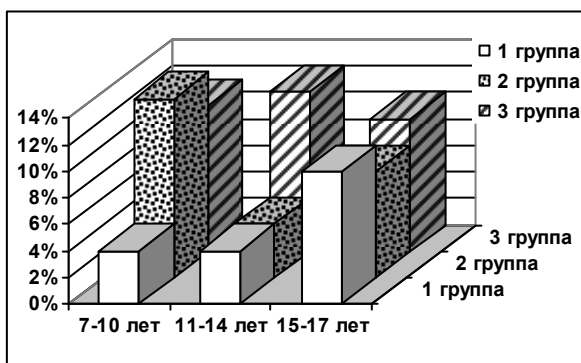


Рис. 5. Хронический гастрит в стадии ремиссии.

ПАТОЛОГИЯ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ

Патология мочевой системы представлена в большинстве случаев дисметаболическими нефропатиями (190, 237, 287 случаев на 1000 хронической патологии) и хроническим пиелонефритом в стадии ремиссии (57, 80, 145 на 1000 случаев хронической патологии по группам соответственно).

Патология мочевой системы наиболее выражена у жителей Южных районов Забайкальского края, что может свидетельствовать о неблагоприятной экологической обстановке в данных районах (рис. 6–7).

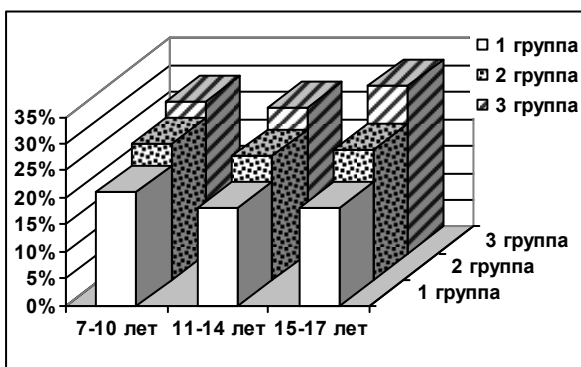


Рис. 6. Дисметаболические нефропатии.

ВЫВОДЫ

Основные ранговые места среди хронической патологии у детей школьного возраста приходятся на эндокринную патологию, патологию желудочно-кишечного тракта и патологию мочевой системы. Среди детей, жителей города, преобладающей патологией является диффузный эндемический зоб и избыточная масса тела, тогда как у школьников, жителей Северных районов, преобладает задержка физического развития.

Патология желудочно-кишечного тракта также наиболее выражена у детей, проживающих в Северных районах, тогда как дисметаболические нарушения со стороны мочевой системы наиболее часто встречаются у детей, проживающих на юге Забайкальского края.

Исходя из структуры хронической патологии, можно сделать выводы, что основными факторами, влияющими на ее развитие являются: проживание в районах, эндемичных по содержанию микроэлементов, нерациональное питание, неправильно организованный режим питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный доклад о состоянии здоровья населения Российской Федерации в 2006 г. — М., 2007 — 247 с.
2. Концепция демографической политики Российской Федерации до 2025 г. — 2007.
3. Курс на оздоровление. Европейская стратегия профилактики и борьбы с неинфекционными заболеваниями. — ВОЗ (Копенгаген), 2006. — 66 с.
4. Медико-демографические показатели Российской Федерации 2006 год. Статистические материалы. — 2007. — 179 с.
5. Новые возможности профилактической медицины в решении проблем здоровья детей и подростков России / А.А. Баранов [и др.]. — М. : ГЭОТАР — Медиа, 2009. — 176 с.

Сведения об авторах

Зюбина Наталья Ивановна — заместитель главного врача по лечебной работе, врач аллерголог-иммунолог высшей категории
Бишарова Галина Ивановна — директор Читинского филиала ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный врач РФ, врач педиатр высшей категории, врач аллерголог-иммунолог высшей категории (ГУЗ КДКДЦ, г. Чита) e-mail: nii_pediatri@mail.ru)

Н.М. Корецкая, А.А. Чушкина, А.Н. Наркевич

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОМОРФОЗА ТУБЕРКУЛЕЗА В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
(Красноярск)

Эпидемиологическим проявлением патоморфоза туберкулеза в современных условиях кроме роста показателей заболеваемости и смертности являются изменения биологических свойств возбудителя. В период с 2003 по 2011 гг. лекарственная устойчивость микобактерий у впервые выявленных больных с наиболее часто встречающейся формой туберкулезного процесса — инфильтративной, не только возросла в 1,4 раза, но и претерпела выраженные качественные изменения в виде увеличения доли множественной лекарственной устойчивости и учащения сочетания последней с устойчивостью к препаратам резервного ряда. Параллельно с этим возросла массивность бактериовыделения, замедлилась скорость роста микобактерий, что доказывает наличие взаимосвязи между двумя их биологическими свойствами — лекарственной устойчивостью и жизнеспособностью.

Ключевые слова: туберкулез, патоморфоз, микобактерии, лекарственная устойчивость, жизнеспособность

EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF THE TUBERCULOSIS PATHOMORPHISM IN MODERN CONDITIONS

N.M. Koretskaya, A.A. Chushkina, A.N. Narkevich

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk

Not only the growth of the death rate and the morbidity rate can be considered as epidemiological manifestation of the tuberculosis pathomorphism in modern conditions but also the changes of biological properties of the activator.

Since 2003 till 2011 mycobacterium drug resistance with the patients with the newly diagnosed infiltrative tuberculosis which is of the most frequent occurrence has increased 1,4 times. The mycobacterium drug resistance has undergone the apparent qualitative changes. The percent of multidrug resistance has also increased. The combination of multidrug resistance and rescue therapy drug resistance has become more often. At the same time bacterioexcretion has become more profuse, mycobacterium growth rate has become slower and the fact proves there is an interaction between two their biological properties — drug resistance and growing power.

Key words: tuberculosis, pathomorphism, mycobacterium, drug resistance, vital capacity

Учение о патоморфозе туберкулеза относится к одному из фундаментальных положений фтизиатрии и общей патологии [7]. Современный патоморфоз туберкулеза обусловлен не только изменением социально-экономических условий в стране, но и изменением биологических свойств возбудителя туберкулеза, появлением форм заболевания с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и сверхустойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ) [8]. Конец XX и начало XXI века ознаменовались патоморфозом туберкулеза с различными его аспектами: эпидемиологическими, морфологическими, клиническими и функциональными [1], в связи с чем их необходимо изучать и учитывать в процессе клинической и патоморфологической практики [6].

Количественные и качественные динамические изменения лекарственной устойчивости (ЛУ) МБТ, как одного из биологических свойств возбудителя, подробно освещены в литературе [3,4,9].

Менее изучены изменения другого биологического свойства МБТ, а именно жизнеспособности по скорости и массивности роста, которая имеет важное прогностическое значение [2], определяя тяжесть течения, характеристику процесса и эффективность его лечения [10,11]. Особую значимость приобретает тот факт, что установлено

наличие связи лекарственной устойчивости МБТ и их жизнеспособности с основными эпидемиологическими параметрами (заболеваемость, смертность, эффективность лечения и др.) [5].

В этой связи изучение изменения биологических свойств МБТ (лекарственной устойчивости и жизнеспособности) является актуальной проблемой, ибо оно позволяет не только оценить адекватность применяемых в настоящее время режимов химиотерапии, но и внести в них соответствующие коррективы.

Цель работы: проанализировать изменения лекарственной устойчивости и жизнеспособности МБТ на примере наиболее часто встречающейся формы туберкулезного процесса — инфильтративной, произошедшие с 2003 по 2011 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выкопированы данные из историй болезни 256 больных инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ), в возрасте от 16 до 70 лет, находившихся на стационарном лечении в Красноярском краевом противотуберкулезном диспансере № 1: в 2003 году — 128 больных (I-я группа) и в 2011 году — 128 больных (II-я группа). Все больные были впервые выявлены, являлись бактериовыделителями. Бактериовыделение установлено путем посева мокро-

ты на питательную среду Левенштейна-Йенсена. Исследование лекарственной чувствительности штаммов МБТ проводили стандартным непрямим методом абсолютных концентраций. Определялась частота лекарственной устойчивости, ее структура и спектр. Изучалась лекарственная чувствительность к противотуберкулезным препаратам (ПТП) основного и резервного ряда: изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, этионамиду, канамицину, а во II-й группе и к офлоксацину. В структуре ЛУ МБТ учитывалась монорезистентность, полирезистентность (устойчивость к двум препаратам и более, за исключением одновременной устойчивости к изониазиду и рифампицину), множественная лекарственная устойчивость — устойчивость по крайней мере к изониазиду и рифампицину.

Жизнеспособность культур МБТ, выделенных из мокроты больных до начала лечения, оценивалась по критериям скорости и массивности роста: при росте МБТ менее 20 колоний со скоростью более 30 суток жизнеспособность считали низкой, при росте более 100 колоний со скоростью менее 30 суток — высокой.

Результаты исследования были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа. Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию *t* Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенного бактериологического метода исследования, в I-й группе первичная ЛУ МБТ имела место в $33,6 \pm 4,2 \%$, во II-й — в $48,4 \pm 4,4 \%$, то есть ее показатели с 2003 по 2011 гг. возросли в 1,4 раза.

Изучение спектра ЛУ установило, что наиболее высокие ее показатели наблюдались как в I-й, так и во II-й группах к стрептомицину, изониазиду и рифампицину, то есть к ПТП основного ряда (соответственно $88,4 \pm 4,9$ и $95,2 \pm 2,7 \%$; $74,4 \pm 6,7$ и $85,5 \pm 4,5 \%$; $39,5 \pm 7,5$ и $74,2 \pm 5,5 \%$). Также следует отметить тот факт, что в динамике произошел рост ЛУ к этамбутолу с $7,0 \pm 3,9$ до $62,9 \pm 6,1 \%$, то есть в 9 раз ($p < 0,001$).

Резко возросла и частота ЛУ к ПТП резервного ряда: так, если к этионамиду в 2003 году она состав-

ляла $9,3 \pm 4,4 \%$, то в 2011 — $25,8 \pm 5,5 \%$ ($p < 0,05$). Еще более показателен рост ЛУ МБТ к канамицину с $4,7 \pm 3,2 \%$ в I-й группе до $24,2 \pm 3,6 \%$ во II-й ($p < 0,001$).

Удельный вес монорезистентности не изменился ($8,6 \pm 2,5$ и $7,0 \pm 2,3 \%$; $p > 0,05$), доля ЛУ к двум ПТП снизилась с $12,5 \pm 2,9$ до $3,9 \pm 1,7 \%$ ($p < 0,05$), а к трем — осталась без изменений ($8,6 \pm 2,5$ и $8,6 \pm 2,5 \%$; $p > 0,05$).

Во II-й группе больных резко возросла доля МБТ, имеющих ЛУ к четырем ПТП: с $3,9 \pm 1,7$ до $12,5 \pm 2,9 \%$ ($p < 0,05$). Однако особого внимания заслуживает появление ЛУ во II-й группе к пяти, шести и семи ПТП: соответственно $7,8 \pm 2,4$, $5,4 \pm 2,0$, $3,1 \pm 1,5 \%$. Следовательно, рост ЛУ МБТ к ПТП произошел на фоне утяжеления ее структуры, а именно в настоящее время значительно возросло количество ПТП, к которым имеется ЛУ МБТ.

Обращает на себя внимание резко возросший (в 3,3 раза) удельный вес МЛУ МБТ составивший по группам соответственно $10,2 \pm 2,7$ и $33,6 \pm 4,2 \%$.

Среди штаммов с МЛУ в I-й группе преобладало сочетание последней с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам (76,9 %); сочетание множественной лекарственной устойчивости с устойчивостью к основным и резервным препаратам встречалось в 3,4 раза реже (23,1 %). Во II-й группе соответствующие показатели составили 53,5 и 46,5 %, т.е. лечение больных этой группы по IV режиму химиотерапии, включающему препараты резервного ряда, у каждого второго вызывало значительные трудности из-за невозможности применения их полного набора.

Изучение другого биологического свойства МБТ, а именно жизнеспособности по скорости и массивности роста показало динамическое изменение этих параметров. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, в динамике увеличился удельный вес обильного роста МБТ с $27,3 \pm 3,9 \%$ в I-й группе до $40,6 \pm 4,3 \%$ во II-й, то есть в 1,5 раза ($p < 0,05$) и снизился скудного (с $58,6 \pm 4,4$ до $28,9 \pm 4,0 \%$; $p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о возросшей массивности бактериовыделения у больных инфильтративным туберкулезом в современных условиях.

Таблица 1
Скорость и массивность роста МБТ у больных ИТЛ I-й и II-й групп (абс, %; $M \pm m$)

Характер роста	Скудный		Умеренный		Обильный		Всего	
	I-я группа	II-я группа	I-я группа	II-я группа	I-я группа	II-я группа	I-я группа	II-я группа
Быстрый	40 $31,3 \pm 4,1$	5 $3,9 \pm 1,7$	14 $10,9 \pm 2,8$	10 $7,9 \pm 2,4$	35 $27,3 \pm 3,9$	36 $28,1 \pm 4,0$	89 $69,5 \pm 4,1$	51 $39,8 \pm 4,3$
p_{I-II}	$p < 0,001$		$p > 0,05$		$p > 0,05$		$p < 0,001$	
Замедленный	35 $27,3 \pm 3,9$	32 $25,0 \pm 3,8$	4 $3,1 \pm 1,5$	29 $22,6 \pm 3,7$	—	16 $12,5 \pm 2,9$	39 $30,5 \pm 4,1$	77 $60,2 \pm 4,3$
p_{I-II}	$p > 0,05$		$p < 0,001$		$p < 0,001$		$p < 0,001$	
Итого	75 $58,6 \pm 4,4$	37 $28,9 \pm 4,0$	18 $14,1 \pm 3,1$	39 $30,4 \pm 4,1$	35 $27,3 \pm 3,9$	52 $40,6 \pm 4,3$	128 100,0	128 100,0
p_{I-II}	$p < 0,001$		$p < 0,01$		$p < 0,05$			

Кроме этого во II-й группе, по сравнению с I-й, снизилась доля МБТ с быстрым ростом с $69,5 \pm 4,1$ до $39,8 \pm 4,3$ % ($p < 0,001$) и возросла — замедленного с $30,5 \pm 4,1$ до $60,2 \pm 4,3$ % ($p < 0,001$). Следовательно, рост ЛУ МБТ в 1,4 раза, привел к росту массивности бактериовыделения в 1,5 раза с одновременным замедлением скорости роста МБТ. Так, если средняя скорость роста МБТ в I-й группе составила $28,3 \pm 1,0$ день, а во II-й — $33,7 \pm 0,9$ дня ($p < 0,001$), что требует применения ускоренных методов определения ЛУ МБТ. Несмотря на изменение скорости и массивности роста МБТ степень их жизнеспособности не изменилась: в I-й группе высокой жизнеспособностью обладали $27,3 \pm 3,9$ % штаммов, во II-й — $28,1 \pm 4,0$ % ($p > 0,05$); низкой — соответственно $27,3 \pm 3,9$ и $25,0 \pm 3,8$ % ($p > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи лекарственной устойчивости и жизнеспособности МБТ: лекарственноустойчивые штаммы возбудителя отличаются обильным ростом и замедленной его скоростью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшим звеном эпидемиологической составляющей патоморфоза туберкулеза в современных условиях является изменение биологических свойств возбудителя не только в виде утяжеления количественных и качественных показателей ЛУ, но и изменения проявлений его жизнеспособности (увеличение доли обильного роста с одновременным замедлением его скорости). Полученные данные свидетельствуют, во-первых, о взаимосвязи ЛУ и жизнеспособности МБТ, во-вторых, - о необходимости применения ускоренных методов определения их лекарственной чувствительности, в-третьих, - о возросшей эпидемиологической опасности впервые выявленных больных туберкулезом легких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Браженко Н.А., Супрун Т.Ю., Браженко И.Н. Современные проблемы туберкулеза и туберкулез-ассоциированной патологии // Туберкулез: проблемы диагностики, лечения и профилактики: Труды Всероссийской научно-практической конференции. — СПб., 2003. — С. 90—93.
2. Вишневский Б.И., Нарвская О.В., Васильева С.Н. и др. Вирулентность микобактерий тубер-

кулеза // Пробл. туберкулеза. — 2002. — № 10. — С. 33—36.

3. Вишневский Б.И., Стеклова Л.Н. Частота и структура лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при различных локализациях заболевания // Пробл. туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 12. — С. 5—8.

4. Воробьева О.А., Семечкина В.С., Чимитдоржиев Б.Ц. Множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза на территории г. Иркутска и Иркутской области // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2011. — № 2 (78). — С. 26—29.

5. Гращенкова О.В., Васильев А.В. Совершенствование эпидемиологического анализа при туберкулезной инфекции // Пробл. туберкулеза. — 2000. — № 6. — С. 33—36.

6. Гринберг Л.М. Актуальные вопросы патологии во фтизиатрии // Актуальные вопросы лечения туберкулеза различных локализаций: Научные труды Всероссийской научно-практической конференции. — СПб., 2008. — С. 224—226.

7. Гринберг Л.М. Туберкулез сегодня — негативная фаза патоморфоза или реверсия? // Туберкулез: проблемы диагностики, лечения и профилактики: Труды Всероссийской научно-практической конференции. — СПб., 2003. — С. 284.

8. Ерохин В.Р., Гедымин Л.Е., Земскова З.С. и др. Патолого-анатомическая диагностика основных форм туберкулеза (по данным секционных исследований) // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 7. — С. 54—64.

9. Исакова Ж.Т., Гончарова З.К., Алдашев А.А. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин-резистентных штаммов *M. tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам первого ряда // Пробл. туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 11. — С. 39—41.

10. Маничева О.А., Ласунская Е.Б., Журавлев В.Ю. и др. Лекарственная чувствительность *Mycobacterium tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания // Пробл. туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 12. — С. 18—22.

11. Сапожникова Н.В. Особенности течения туберкулеза легких в зависимости от биологических свойств возбудителя: Автореф. дис. ...канд. мед.наук. — СПб., 2003.

Сведения об авторах

Корецкая Наталья Михайловна — зав. кафедрой туберкулеза с курсом ПО, профессор; Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб. 8(391) 261-76-82, факс (391) 228-08-60, e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Чушкина Анна Александровна — ассистент кафедры туберкулеза с курсом ПО; Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб. 8(391) 261-76-82, факс (391) 228-08-60, e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Наркевич Артем Николаевич — клинический ординатор кафедры туберкулеза с курсом ПО; Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб. 8(391) 261-76-82, факс (391) 228-08-60, e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Н.А. Кравченко, О.Н. Яковенко

РОЛЬ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ В ПРИЧИНАХ СМЕРТНОСТИ НАСЕЛЕНИЯ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

В статье представлены материалы по оценке особенностей и тенденций смертности населения Иркутской области в 1992–2009 гг. от заболеваний дыхательной системы в сравнении с показателями по Сибирскому Федеральному округу и по РФ в целом. Выявлено, что бронхо-легочная патология занимает первое место в структуре смертности от злокачественных новообразований и инфекционных заболеваний органов дыхания. А также установлен рост заболеваемости и смертности от пневмонии населения Иркутской области в последние годы.

Ключевые слова: болезни органов дыхания, смертность, эпидемиология

THE ROLE OF RESPIRATORY DISEASE IN CAUSES OF MORTALITY IN THE IRKUTSK REGION

N.A. Kravchenko, O.N. Yakovenko

Irkutsk State Medical University, Irkutsk

We present the results of assessment of mortality key elements and trends concerning respiratory diseases in the Irkutsk region in comparison with Siberian District and whole Russian Federation during 1992–2009 years. It was found that the bronchial-pulmonary pathology is ranked first in the pattern of mortality from cancer and infectious diseases. Also it was established that in recent years morbidity and mortality from pneumonia of the population of the Irkutsk region increased.

Key words: respiratory diseases, mortality, epidemiology

Антропогенное нарушение экологического равновесия в наши дни в наибольшей степени отражается на основной среде обитания человека — атмосфере. Техногенные воздействия на атмосферу стали причиной глобальных изменений биосферы, таких как: парниковый эффект, разрушение озонового слоя, выпадение кислотных дождей и радиоактивных осадков. В настоящее время скорость развития техногенных изменений атмосферы опережает адаптационные механизмы организма человека. Кроме того, изменился вклад каждого (ингаляционного, алиментарного, водно-алиментарного) из возможных путей поступления в организм ксенобиотиков в суммарную поглощенную дозу вредных веществ. Дело в том, что на всем протяжении эволюции основными воротами проникновения в организм чужеродных веществ являлся желудочно-кишечный тракт. В ходе эволюции для обезвреживания ксенобиотиков, попавших в организм водно-алиментарным или алиментарным путем из кишечника в кровь, у живых существ сформировалась печень. Этот мощный «химический завод» обеспечивал постоянство внутренней среды организма. Сейчас ситуация кардинально изменилась. Во вдыхаемом воздухе постоянно присутствуют вредные химические вещества, источниками которых, в основном, являются предприятия различных отраслей промышленности и транспортные средства всех видов назначения. В связи с чем основная доля ксенобиотиков стала поступать в организм человека через органы дыхания, за которыми своего химического заслона нет. По этой причине человеческий ор-

ганизм более чувствителен к токсическим веществам, проникающим через легкие, чем через желудочно-кишечный тракт. Об этом свидетельствует большое различие в величине таких показателей, как нормативная величина содержания (С_{lim}) и предельно-допустимой концентрации (ПДК), одного и того же вещества в атмосферном воздухе и воде. Например, чувствительность организма к фтору, проникающему через легкие в 10 раз выше, чем к поступающему с водой. Среди всех выбросов в атмосферный воздух приоритетная роль сегодня принадлежит взвешенным частицам. Доказано, что подъемы среднесуточных концентраций взвешенных веществ в атмосферном воздухе населенных мест, даже не превышающие ПДК, могут сопровождаться увеличением смертности населения и обострением респираторной симптоматики у детей [1].

Проникновение в организм большого количества вредных веществ ингаляционным путем привело в наше время к росту бронхо-легочной патологии среди населения. Несмотря на то, что последние 3 года в Иркутской области наблюдается естественный прирост населения, смертность от болезней органов дыхания растет. Анализ данных официальной медицинской статистики [2,3] за 1992–2009 гг. показал, что в Иркутской области показатель смертности от болезней органов дыхания в среднем в 1,5 раза выше, чем по Российской Федерации ($83,72 \pm 0,3$ и $55,6 \pm 0,2$ на 100 тыс. населения соответственно). Выявлено, что смертность от болезней органов дыхания в Иркутской области носит циклический характер и характеризуется 4 периодами продолжительностью 4–6 лет. Годами

максимума являются 1995, 2003 и 2009 (показатель смертности составил 107,2, 96,0 и 89,6 на 100 тыс. населения соответственно). Наименьший показатель смертности от болезней органов дыхания зарегистрирован в 2001 г., он составил 72,8 на 100 тыс. населения.

В структуре смертности населения РФ от болезней органов дыхания первое место занимают пневмонии и составляют 49,8 % по среднемноголетним данным, на втором месте находятся хронические обструктивные заболевания легких (38,4 %), на третьем — пневмокониозы (4,5 %). Пневмонии также являются ведущей причиной смерти населения Иркутской области от болезней органов дыхания. При этом, необходимо отметить, что в нашем регионе показатель смертности от пневмонии в среднем в 2,2 раза выше, чем по Российской Федерации ($58,5 \pm 0,2$ и $27,5 \pm 0,1$ на 100 тыс. населения соответственно) и в 1,3 раза по сравнению с показателями Сибирского Федерального округа. В структуре смертности населения Иркутской области от новообразований злокачественные новообразования органов дыхания и грудной клетки стоят на первом месте и составляют 30 % по среднемноголетним данным.

Сведения об авторах

Кравченко Наталья Александровна — аспирант кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» (666035, г. Шелехов Иркутской области, 1 микрорайон, дом 15, кв. 39; тел. 89834013686)

Яковенко Ольга Николаевна — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»

Мужчины умирают от болезней органов дыхания чаще женщин. Причем, разница в показателях по полу в Иркутской области составляет 2 раза, в Сибирском Федеральном округе — 2,5 раза, по РФ в целом — 3 раза. Показатель смертности женщин в Иркутской области в 2 раза превышает средний по России.

Перечисленные обстоятельства настораживают и вызывают тревогу за судьбу будущих поколений. Необходимо обратить более пристальное внимание на проблему патологии дыхательной системы в Иркутской области, разработать, усовершенствовать и внедрить в работу лечебно-профилактических организаций меры по надзору и профилактике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Величковский Б.Т. Экологическая пульмонология (роль свободнорадикальных процессов). — Екатеринбург, 2001. — 86 с.
2. Государственный доклад «Медико-демографические показатели Иркутской области» за 1992 — 2010 гг.
3. Статистические материалы ФГУ «ЦНИИОИЗ» «Заболеваемость населения России» за 2007 — 2010 гг.

О.В. Лисак ¹, И.В. Козлова ¹, О.В. Сунцова ¹, О.Л. Богомазова ², Е.К. Дорощенко ¹,
И.Г. Чумаченко ³, О.О. Черноиванова ¹, А.О. Ревизор ⁴

СОВРЕМЕННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В ОТНОШЕНИИ ТРАНСМИССИВНЫХ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В СЕВЕРНЫХ РАЙОНАХ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области (Иркутск)

³ Управление Роспотребнадзора по Иркутской области (Иркутск)

⁴ Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

Проведен вирусолого-микробиологический мониторинг семи северных районов Иркутской области. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют об изменении эпидемиологической ситуации в отношении клещевых инфекций на территории данных районов. Отмечается продвижение природных очагов на север. На территории северных районов выявлены сочетанные очаги клещевых инфекций, в том числе обнаружена циркуляция новых для Восточной Сибири патогенов — *E. muris*, *A. phagocytophilum*, *B. miyamotoi*.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, иксодовый клещевой боррелиоз, моноцитарный эрлихиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека

MODERN EPIDEMIOLOGY OF VECTOR-BORNE TICK-BORNE INFECTIONS IN NORTHERN DISTRICTS OF THE IRKUTSK REGION

O.V. Lysak ¹, I.V. Kozlova ¹, O.V. Suntsova ¹, O.L. Bogomazova ², E.K. Doroshchenko ¹,
I.G. Chumachenko ³, O.O. Chernoiivanova ¹, A.O. Revisor ⁴

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Center for Hygiene and Epidemiology in Irkutsk region, Irkutsk

³ Department of Rospotrebnadzor in Irkutsk region, Irkutsk

⁴ Irkutsk State Medical University, Irkutsk

A virological and microbiological monitoring was conducted in seven northern districts of the Irkutsk region. The findings of the study suggest changes in epidemiology of tick-borne infections in these areas. There is the promotion of natural foci to the north. Combined foci of tick-borne infections in the northern areas identified, including founded circulation of the new for Eastern Siberia pathogens — *E. muris*, *A. phagocytophilum*, *B. miyamotoi*.

Key words: spring-summer tick-borne encephalitis, Ixodes tick borreliosis, monocytic ehrlichiosis, human granulocytic anaplasmosis

ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия характеризуются потеплением климата, расширением границ обитания клещей, увеличением количества эндемичных территорий. В Иркутской области в список эндемичных территорий по клещевым инфекциям пока не включены северные районы — Катангский, Киренский, Нижне-Илимский, Мамско-Чуйский, Бодайбинский, Усть-Кутский. Однако, в последние годы эпидемиологическая ситуация в этих районах стремительно меняется [1]. Отмечается высокая численность таежных клещей, увеличивается количество обращений населения по поводу укусов переносчиков, зарегистрированы первые случаи заболеваний иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ). При лабораторном исследовании иксодовых клещей выявлены особи, зараженные вирусом клещевого энцефалита (КЭ) и боррелиями, а также новыми для региона патогенами — эрлихиями, анаплазмами, *Borrelia miyamotoi*. Все это указывает на необходимость изучения эпидемиологической обстановки в отношении клещевых инфекций, сложившейся в данных районах.

Цель исследования: характеристика современной эпидемиологической ситуации в отношении трансмиссивных клещевых инфекций на территории северных районов Иркутской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе проведенного мониторинга было исследовано 1038 экземпляров клещей *I. persulcatus*. Для оценки их зараженности вирусом клещевого энцефалита (КЭ), боррелиями, эрлихиями и анаплазмами использовали комплекс методов: ПЦР, ИФА (тест-системы НПО «Микроген», Томск), светлоскопическая микроскопия фиксированных препаратов содержимого кишечника клеща. Выделение РНК вируса КЭ и ДНК боррелий, риккетсий, эрлихий и анаплазм проводили с помощью коммерческих наборов «РИБО-преп» («АмплиСенс» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Детекцию РНК вируса КЭ осуществляли с помощью ОТ-ПЦР как описано в [7]. Определение ДНК боррелий, риккетсий, эрлихий и анаплазм проводили с помощью двухраундовой ПЦР [4, 8, 10, 12]. Тест-системы для исследования любезно предоставлены сотрудниками

Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) В.А. Рар, С.Е. Ткачевым, Н.В. Фоменко и Я.П. Иголкиной. В некоторых случаях для выявления боррелий наряду с ПЦР применяли метод светлопольной микроскопии фиксированных препаратов содержимого кишечника клеща.

При анализе эпидемиологической ситуации по клещевым инфекциям использовали данные статистических отчетных форм ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» за 2005–2008 гг. и данные литературы [1, 2, 9, 11]. Для определения численности клещей в природных биотопах проведено 19 учетов клещей (стандартным методом — на флаг).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2004 г. было проведено ландшафтно-эпидемиологическое районирование Иркутской области по зооантропонозам с природной очаговостью, в том числе по КЭ, ИКБ и клещевому риккетсиозу (КР), определен риск заражения возбудителями клещевых инфекций, а также предложены мероприятия по их профилактике [1]. Согласно данному районированию северные территории (Катангский, Киренский, Нижне-Илимский, Мамско-Чуйский, Бодайбинский, Усть-Кутский районы) были отнесены к зонам, безопасным по ИКБ, и минимального риска заражения вирусом КЭ. Рост количества обращений населения по поводу укусов клещей и регистрация в последние годы случаев ИКБ на северных территориях Иркутской области, ранее благополучных по клещевым инфекциям, указывают на необходимость проведения вирусолого-микробиологического мониторинга с оценкой сложившейся там эпидемиологической ситуации.

В северных районах Иркутской области основным переносчиком возбудителей клещевых инфекций является таежный клещ — *I. persulcatus*. Результаты проведенного мониторинга показали, что, несмотря на близость географического расположения, каждая из шести исследованных нами территорий имела свои особенности.

Самые суровые климатические условия, неблагоприятные для существования таежных клещей, отмечаются на территории **Катангского района**. Территория данного района лежит в пределах Средне-Сибирского плоскогорья и простирается с севера на юг от 58° до 64° с.ш., с запада на восток — от 104° до 110° в.д. На севере и северо-западе Катангский район граничит с Красноярским краем, на северо-востоке — с Якутией, на юге — с Усть-Кутским, Нижнеилимским, Киренским районами Иркутской области. Рельеф района представляет плоскую возвышенность, слабоволнистое плато. Речная сеть представлена бассейном Нижней Тунгуски с притоками, в районе которой встречаются скальные образования в форме каменных сопков, гряд, хребтов. Климат Катанги резко континентальный с длинной морозной зимой (с ноября по апрель) и коротким жарким летом (июнь, июль). В декабре температура достигает –60 °С, летом

+40 °С (среднегодовая амплитуда температурных колебаний составляет 80 °С). Снег выпадает в сентябре, сходит в мае. Годовое количество осадков невелико и колеблется в разные годы в пределах 300 мм в год, распределяясь по временам года неравномерно: бывают малоснежные зимы и очень дождливое лето, и наоборот [3, 6]. Наличие вечной мерзлоты, обусловленной недостатком тепла, неблагоприятно влияет на существование таежных клещей.

На территории Катангского района зафиксирована самая низкая из обследованных районов численность клещей *I. persulcatus* — 1–1,5 экз. на флаг/км² [5]. Данный район является единственной территорией Иркутской области, где не зарегистрированы случаи присасывания клещей. Заболеваемость КЭ и ИКБ отсутствует. При проведении ландшафтно-эпидемиологического районирования в образцах сыворотки крови людей, проживающих в поселках Ербогачен и Непя, были обнаружены специфические антитела к вирусу КЭ, при этом иммунная прослойка населения составила менее 5 % [1]. Комплементфиксирующие антитела к вирусу КЭ ранее были обнаружены у 2–5 % обследованных сельскохозяйственных животных [2].

В настоящее время Катангский район может быть отнесен к зоне, безопасной по ИКБ, и минимального риска заражения КЭ, что, безусловно, не исключает необходимости дальнейшего изучения эпидемиологической ситуации в данном районе.

Киренский район расположен в северо-восточной части Иркутской области и граничит на востоке с Мамско-Чуйским, на северо-западе с Катангским, на севере с республикой Якутия (Саха), на западе с Усть-Кутским, на юге с Казачинско-Ленским районом и Республикой Бурятия. Территория района относится к Киренско-Ленскому агроклиматическому округу. Для нее характерен резко континентальный климат. Преобладание ясной и холодной погоды зимой и жаркой, сухой — летом, обуславливается антициклонами. Амплитуда колебаний среднемесячной температуры самого холодного и самого жаркого месяца составляет 45,9 °С. Число теплых дней колеблется от 160 до 165, заморозки наступают раньше, а заканчиваются позже по сравнению с другими районами области. Глубина снежного покрова по среднемноголетним данным колеблется в пределах 45–50 см, а в отдельные годы достигает 80–90 см, устойчивый снежный покров образуется в октябре-ноябре и лежит обычно до апреля-мая [3, 6].

В отдельных биотопах Киренского района отмечается высокая численность клещей, которая достигает 73–98 экз. на флаг/час. В последние годы на территории района растет количество зарегистрированных случаев присасываний клещей. Так, за период с 2005 по 2008 гг. их количество увеличилось в 3,6 раза. Случаи заболеваний КЭ не отмечены, хотя у людей, проживающих на данной территории, обнаружено наличие специфических антител к вирусу КЭ. При проведенном нами лабораторном исследовании 211 экз. *I. persulcatus*,

собранных в природных биотопах Киренского района, вирусофорность клещей составила 5,6 %, зараженность боррелиями — 24 %. Кроме того, нами были обнаружены новые для района возбудители — *Ehrlichia muris* (предполагаемый этиологический агент моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ)) и *Borrelia miyamotoi* (из группы клещевых возвратных лихорадок). Зараженность исследованных нами клещей *E. muris* составила 18 %. В четырех переносчиках обнаружена ДНК *B. miyamotoi*. Обнаружены следующие варианты микст-инфицирования клещей: *Borrelia garinii* + *E. muris*, *B. miyamotoi* + *E. muris*, вирус КЭ + *E. muris*. Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза человека — *Anaplasma phagocytophilum* не обнаружен.

На основании проведенных исследований данный район может быть отнесен к потенциально опасным в плане заражения возбудителями клещевых инфекций.

Мамско-Чуйский район расположен в пределах Северо-Байкальского нагорья. На севере Мамско-Чуйский район граничит с Республикой Саха (Якутия), на юге — с Республикой Бурятия, восточный сосед Мамско-Чуйского района — Бодайбинский район, западный — Киренский район. Координаты района — 58° 35' с.ш. и 115° 30' в.д. Рельеф местности гористый с перепадами высот между вершинами гольцов и долинами рек 800—900 м, максимальные абсолютные отметки гольцов достигают 1500 м. Склоны гольцов крутые, поросшие лесом, часто скалистые, в северо-западной части района — в бассейне реки Малая Чуя — рельеф более спокойный, с обширными лесными массивами. Климат района резко континентальный, с морозной (до — 55° — 60°С) зимой и коротким теплым (до + 39°С) летом. Среднемесячная температура января — 28,9°С, июля + 17,9°С. Среднегодовое количество осадков составляет 390—550 мм, причем 60—70 % приходится на летние месяцы. Ледяной покров на реках устанавливается в октябре-ноябре и сходит в мае-июне. Снежный покров в долинах рек держится с октября до июня, на вершинах гольцов — более продолжительное время. В районе в значительной степени распространена вечная мерзлота, главным образом, на северных склонах гольцов. Рельеф местности гористый с перепадами высот между вершинами гольцов и долинами рек 800—900 м, максимальные абсолютные отметки гольцов достигают 1500 м. Склоны гольцов крутые, поросшие лесом, часто скалистые, в северо-западной части района — в бассейне реки Малая Чуя — рельеф более спокойный, с обширными лесными массивами. Растительность района относится к горно-таежному типу. Вершины гольцов чаще лишены древесной растительности, северные и верхние части южных склонов покрыты зарослями кедрового стланника, карликовой березы и лиственниц, ниже по склону видовой состав растительности значительно расширяется и представлен хвойными, лиственными и смешанными массивами леса [3].

Заболееваемость КЭ и ИКБ на территории Мамско-Чуйского района отсутствует. Однако за период с 2005 по 2008 гг. число зарегистрированных случаев укусов клещей здесь увеличилось в 4,3 раза. При анализе 15 экз. таежных клещей, отловленных в природных биотопах, в одном образце обнаружен антиген вируса КЭ. Отмечены случаи находок у людей специфических антител к вирусу КЭ. Эти данные дают основание считать Мамско-Чуйский район потенциально опасным в отношении заражения КЭ. На территории данного района необходимо проведение углубленного мониторинга с оценкой зараженности клещей новыми для региона патогенами.

Бодайбинский район расположен на Витимо-Патомском нагорье в северо-восточной части Иркутской области. На севере и северо-востоке граничит с Якутией, на юге и юго-востоке — с Буртией и Читинской областью, на западе — с Мамско-Чуйским районом. Географические координаты: широта — 58° 30', долгота — 116° 00'. Климат резко континентальный. Зимние температуры могут достигать — 55°С, а летние до + 45°С. Среднегодовая температура воздуха составляет — 6,5°С [3]. Условия для выживания *I. persulcatus* относительно других районов Иркутской области более благоприятные. За период с 2005 по 2008 гг. число зарегистрированных случаев укусов клещей увеличилось в 7,1 раза. Заболееваемость КЭ и ИКБ отсутствует. Результаты исследования 173 экз. клещей, снятых с людей (2009—2010 гг.) в Бодайбинском районе, показали, что 1,1 % переносчиков инфицированы вирусом КЭ, 19,1 % — боррелиями, ДНК *E. muris* выявлена в 4 % случаев, *A. phagocytophilum* — 0,5 %. Проведенные рекогносцировочные исследования по поиску на территории Бодайбинского района бабезий показали отрицательные результаты.

Нижне-Илимский район граничит с Братским, Усть-Кутским, Усть-Илимским и Усть-Удинским районами. Географические координаты — 56.816° с.ш. и 103.794° в.д. В Нижне-Илимском районе обнаружена невысокая численность клещей — до 7 экз. на флажок/км². За период с 2005 по 2008 гг. число зафиксированных случаев укусов клещей увеличилось в 3,3 раза. Начиная с 2007 г. в районе регистрируется заболееваемость ИКБ (2007 г. — один случай, 2008 — два). В 1991 г. был зафиксирован случай КЭ. Индекс эндемичности за период с 1979 по 2008 гг. составил 0,03. Несмотря на то, что количество проанализированных нами клещей, собранных с растительности в 2010 г., было невелико — всего 31 экземпляр, в пяти из них был обнаружен вирус КЭ, в двух — боррелии, в 12 — *E. muris*, в одном — *A. phagocytophilum*. ДНК бабезий не выявлена. В микст-инфицированных клещах были обнаружены следующие сочетания патогенов — вирус КЭ + *E. muris*, *E. muris* + *A. phagocytophilum*. Эти данные свидетельствуют в пользу необходимости дальнейшего всестороннего изучения очагов клещевых инфекций на данной территории.

Усть-Кутский район расположен в центральной части Иркутской области на территории Лено-

Ангарского плато Среднесибирского плоскогорья. На севере район граничит с Катангским и Усть-Илимским районами, на востоке — с Киренским и Казачинско-Ленским, на юге — с Жигаловским и Усть-Удинским, на западе — с Нижнее-Илимским районами. Большую часть территории занимает тайга. Рельеф гористый, сильно расчлененный. Климат района резко континентальный. Средняя температура января -25°C , июля $+17^{\circ}\text{C}$. Минимальная температура достигает -54°C , максимальная — $+38^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая температура до 2007 г. держалась стабильно на отметке -4°C , в 2007 г. около 0°C , в 2008 г. — $-1,2^{\circ}\text{C}$. Годовое количество осадков 350 мм [3].

В 1988 и 1990 гг. в районе были зафиксированы случаи КЭ, за период с 1979 по 2007 гг. индекс эндемичности по КЭ составил 0,1.

На территории района имеются локальные участки с численностью иксодовых клещей до 31–104 экз. флагов/ч. За период с 2005 по 2008 гг. число зафиксированных случаев укусов клещей увеличилось на 9,7 % и достигло в 2008 г. 207 случаев. Заболеваемость КЭ отсутствует, однако с 1994 г. регистрируется заболеваемость ИКБ.

При лабораторном исследовании 395 экз. таежных клещей из Усть-Кутского района вирусофорность составила 0,5 %, зараженность боррелиями — 13,9 %. Новые для региона патогены пока не обнаружены.

Данные лабораторного исследования клещей позволяют сделать вывод об опасности территории Усть-Кутского района в отношении КЭ и ИКБ.

Казачинско-Ленский район относится к группе Приленских районов, приравненных к статусу районов Крайнего Севера. На востоке Казачинско-Ленский район граничит с республикой Бурятия, на севере — с Киренским, на западе — с Усть-Кутским и Жигаловским, на юге — с Качугским районами Иркутской области. Казачинско-Ленский район занимает большую часть Предбайкальской впадины и северную часть Байкальского хребта (1200—2000 метров над уровнем моря). Основная природная зона — тайга. Основной водной артерией является река Киренга. На территории района много озер и болот. Климат района резко континентальный. Среднегодовая температура равна $-3,7^{\circ}\text{C}$. Амплитуда температурных колебаний — $89,5^{\circ}\text{C}$, годовое количество осадков — 368 мм, выпадают в основном в июле-августе. Снег держится в среднем 190 дней и сходит в конце апреля — начале мая [3].

На территории района в 2001, 2002 и 2005 гг. были зафиксированы случаи заболеваний КЭ. При лабораторном исследовании 213 экземпляров *I. persulcatus* в 2009 г. инфицированность вирусом КЭ составила 4,7 %, боррелиями — 8,8 %. ДНК *E. muris* обнаружена в 8,2 % проанализированных клещей.

Случаев клещевого риккетсиоза (КР) на всех вышеуказанных территориях официально не зарегистрировано. Так как основные переносчики КР — клещи рода *Dermacentor* в этих районах

почти не встречаются, то вопрос о существовании природных очагов и риска заражения КР требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен вирусолого-микробиологический мониторинг семи северных районов Иркутской области. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют об изменении эпидемиологической ситуации в отношении клещевых инфекций на территории северных районов Иркутской области. Отмечается продвижение природных очагов на север. На территории северных районов выявлены сочетанные очаги клещевых инфекций, в том числе новых для Восточной Сибири. На территории Киренского района выявлена циркуляция вируса КЭ, *B. garinii*, *E. muris*, *B. miyamotoi*; в Бодайбинском и Нижне-Илимском районах — вируса КЭ, боррелий, *E. muris*, *A. phagocytophilum*, в Усть-Кутском — вируса КЭ и боррелий, в Казачинско-Ленском — вируса КЭ, боррелий и *E. muris*. В связи с этим необходимо продолжение мониторинговых исследований, адекватная оценка сложившейся эпидситуации, составление прогноза состояния и дальнейшего развития природных очагов. Рост количества обращений населения по поводу укусов клещей и регистрация в последние годы случаев ИКБ на территориях, ранее благополучных по этой инфекции, указывают на необходимость проведения противоэпидемических мероприятий с учетом современной эпидемиологической ситуации и выявленного спектра возбудителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атлас. Иркутская область: Экономические условия развития. — М. — Иркутск, 2004. — 90 с.
2. Васенин А.А., Рященко С.В. К характеристике природных очагов КЭ в Иркутской области // Материалы науч. конф. — Иркутск, 1967. — С. 3–7.
3. Веб-сайт «Иркутская область. Города и районы» — Режим доступа: <http://www.pribaikal.ru>.
4. Выявление различных видов риккетсий у иксодовых клещей, в крови людей и мелких млекопитающих на юге Западной Сибири и на Урале / Я.П. Иголкина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. — 2006. — Т. 5, Приложение 1. — С. 121–125.
5. Злобин В.И., Горин О.З. Клещевой энцефалит: Этиология. Эпидемиология и профилактика в Сибири. — Новосибирск: Наука, 1996. — 177 с.
6. Иркутская область (природные условия административных районов) / И.С. Беркин [и др.]. — Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1993. — 304 с.
7. Исследование генетической структуры популяции вируса клещевого энцефалита, выявленного на территории Лесопарковой зоны Новосибирского научного центра / С.Е. Ткачев [и др.] // Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе / отв. ред. В.В. Власов, В.Е. Репин; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т хим. биол. и фонд. медицины (Интеграционные проекты СО

РАН; вып. 30). — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. — С. 108—117.

8. Разнообразие паразитарных систем с участием мелких млекопитающих и *Ixodes persulcatus* Shculze на Северном Урале / Н.Н. Ливанова [и др.] // Сиб. экол. журн. — 2005. — Т. 10, № 5. — С. 1079—1084.

9. Сунцова О.В. Эколого-паразитологическая характеристика природных очагов клещевого боррелиоза в Прибайкалье : автореф. дис. ... к.б.н. — Иркутск, 2004. — 18 с.

10. Фоменко Н.В., Епихина Т.И., Черноусова Н.Я. Выявление *Borrelia miyamotoi* в крови людей, заболевших в весенне-летний эпидемиологический период // Молекулярная медицина. — 2010. — № 3. — С. 28—31.

11. Черногор Л.И. Эпидемиологические особенности клещевого боррелиоза в Предбайкалье: автореф. дис. ... к.б.н. — Иркутск, 1999. — 24 с.

12. Tick-borne pathogen detection, Western Siberia, Russia / V.A. Rar [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 11. — P. 1708—1715.

Сведения об авторах

Лисак Оксана Васильевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (т. (3952) 33-39-51, e-mail: lisak.lisa@rambler.ru)

Козлова Ирина Валерьевна — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (т. (3952) 33-39-51, e-mail: diwerhoz@rambler.ru)

Сунцова Ольга Владимировна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (т. (3952) 33-39-51, e-mail: Olga_syntsova@list.ru)

Богомазова Ольга Леонидовна — паразитолог ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» (т. (3952) 20-31-42)

Дорощенко Елена Константиновна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (т. (3952) 33-39-51, e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru)

Чумаченко Ирина Георгиевна — главный специалист эпидемиологического отдела Управления Роспотребнадзора по Иркутской области

Черноиванова Ольга Олеговна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (e-mail: na_sviasi@mail.ru)

Ревизор Александр Олегович — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ (e-mail: alexandrrev@rambler.ru)

О.В. Мельникова, Е.А. Вершинин, Е.А. Сидорова, Е.И. Андаев

**ОСОБЕННОСТИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩЕВЫМИ
БОРРЕЛИОЗАМИ ЖИТЕЛЕЙ г. ИРКУТСКА В ЗАВИСИМОСТИ
ОТ ГЕОГРАФИЧЕСКОГО МЕСТА ЗАРАЖЕНИЯ***Иркутский научно-исследовательский противочумный институт (Иркутск)*

Проанализировано 693 случая заболевания иксодовыми клещевыми боррелиозами жителей г. Иркутска за 17-летний период (1995–2011 гг.). Выявлено, что наибольший риск заражения ИКБ существует при посещении с конца мая до первых чисел июля местностей, прилегающих к Байкальскому, Голоустненскому и Мельничному трактам, равно как и зеленых зон на территории самого областного центра. Болеют преимущественно лица старше 40 лет независимо от пола. Эритема отмечается более чем у 80 % пациентов. Характерным местом присасывания клещей на взрослых людях является туловище, на детях — голова.

Ключевые слова: иксодовые клещевые боррелиозы, случаи заболевания, риск инфицирования

**PEQUILIARITIES OF IXODID TICK-BORNE BORRELIOSIS MORBIDITY WITHIN IRKUTSK
RESIDENTS DEPENDING ON GEOGRAPHICAL PLACE OF INFECTION**

O.V. Melnikova, E.A. Vershinin, E.A. Sidorova, E.I. Andayev

Scientific Research Antiplague Institute, Irkutsk

Six hundred and ninety three cases of ixodid tick-borne borreliosis in Irkutsk city residents during 17-year period (1995–2011) have been analyzed. It was revealed that the most risk of *Borrelia burgdorferi* infection is for visitors of zones along Baikalsky, Goloustnensky and Melnichny routes as well as green zones in Irkutsk from the end of May up to the beginning of July. Individuals older than 40 years of both sexes suffer from the disease more often. Erythema is marked in more than 80 % of patients. Body is character place of the tick's bite for adults, head — in children.

Key words: ixodid tick-borne borreliosis, disease cases, infection risk

В процессе исследования мумии Тирольского Айсмана — 5300-летнего индивидуума из медного века, найденного в 1991 г. в итальянской части Альп, немецкими и итальянскими учеными были обнаружены последовательности, соответствующие приблизительно 60 % генома *Borrelia burgdorferi* [15]. Несмотря на столь древнее происхождение этой инфекции, *B. burgdorferi* как патоген, вызывающий Лайм-боррелиоз, был открыт лишь в 1982 [14], а официальная регистрация иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) в России началась на десятилетие позже. Истинную картину динамики заболеваемости ИКБ как по стране в целом, так и по отдельным регионам пока трудно оценить, поскольку в течение 20 лет использовались разные методы лабораторной диагностики — от темнопольной микроскопии в конце 80-х — начале 90-х годов прошедшего столетия [3, 9] до современных молекулярно-диагностических методов [9, 16]. Эпидемиологический анализ заболеваемости ИКБ в разных регионах говорит о ее существенных особенностях, и изменении процесса как во времени, так и в пространстве [1, 2, 3, 5–7, 9, 11, 13].

Мы проанализировали случаи заболевания ИКБ жителей г. Иркутска за период с 1995 по 2011 гг. в зависимости от предполагаемого места встречи с инфицированным клещом с целью выделения наиболее значимых по степени риска заражения этой инфекцией территорий и выявления эпидемиологических особенностей заболеваемости ИКБ у иркутян, если таковые имеются.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы архивные материалы Управления Роспотребнадзора по Иркутской области о случаях заболеваний ИКБ в г. Иркутске за последние 16 лет (всего 693 случая). При анализе данных мы предполагали, что случай заболевания ИКБ, зафиксированный в карте данного больного, связан с указанным им в анамнезе местом вероятного заражения. Статистическую обработку данных проводили стандартными методами [10] с применением программного приложения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе архивных материалов нами создана База данных ГИС «Заболеваемость клещевым боррелиозом в Иркутске», в которую внесен каждый зафиксированный в архивных материалах случай заболевания ИКБ по г. Иркутску с 1995 по 2011 гг. со следующими данными: ФИО, возраст, занятость и профессия, дата укуса, дата заболевания, дата обращения за медицинской помощью, дата постановки диагноза, инкубационный период, форма заболевания, место присасывания клеща, место заражения и его географические координаты. Используя достаточно точную привязку к местности, мы выделили несколько условных районов и направлений, где происходило, со слов пострадавших, нападение и присасывание клещей инфицированных боррелиями. Это Александровский, Байкальский, Голоустненский, Качутский, Култукский, Московский

тракты и дорога в Мельничную Падь, г. Иркутск, Иркутский р-н (некоторые населенные пункты, не укладывающиеся в вышеуказанные направления: Плишкино, Никольск, Большие Коты), Слюдянский район Иркутской области, Усть-Ордынский Бурятский округ (УОБО) и Ольхонский район, северные районы области (Балаганский, Братский, Жигаловский, Заларинский, Куйтунский, Нижнеудинский, Нижне-Илимский, Тайшетский, Тулунский, Усть-Удинский, Чунский) и Республика Бурятия. С севера на юг эта территория ограничивается $56^{\circ} 53'$ и $50^{\circ} 25'$ с.ш., а с запада на восток — $98^{\circ} 20'$ и $110^{\circ} 9'$ в.д., что составляет огромную площадь с разнообразными ландшафтными, климатическими и социально-экономическими условиями.

Количество случаев заболеваний ИКБ по этой территории распределялось неравномерно (табл. 1). Четвертая их часть ($25,0 \pm 1,68$ %) приходилась на рекреационные зоны и населенные пункты, прилегающие к Байкальскому тракту, традиционно лидирующему по риску заражения как клещевым энцефалитом [12], так и ИКБ [8]. И.В. Козлова [8] сопоставила количество обращений людей за помощью по поводу присасывания клеща в Центр экстренной диагностики и профилактики трансмиссивных клещевых инфекций с 1995 по 2004 гг. и результаты исследования клещей на зараженность боррелиями за тот же период с разных территорий. Оказалось, что риск

подвергнуться нападению клеща, инфицированного боррелиями, кроме Байкальского тракта, наиболее высок в Мельничной Пади, на железнодорожном направлении Иркутск — Слюдянка (в нашем исследовании соответствует Култукскому тракту) и по Голоустненскому тракту. В нашем исследовании второе место по количеству случаев вероятного заражения ИКБ занимает сам город Иркутск ($14,6 \pm 1,37$ %), за ним следует Голоустненский тракт ($11,1 \pm 1,22$ %) и Мельничная Падь ($9,2 \pm 1,12$ %). Большой процент людей, заразившихся трансмиссивными клещевыми инфекциями в зеленых зонах крупных городов, отмечают исследователи из Ярославля [2]. Непосредственно на территории города встретились с инфицированным боррелиями клещом 33,6 % заболевших ИКБ томичей [13].

Самые ранние случаи нападения клещей в исследуемой выборке имели место в середине апреля в Мельничной Пади, самый поздний — в конце сентября на Байкальском тракте. По датам сезон нападения клещей и заболеваний ИКБ начинался в Мельничной пади, а заканчивался в Слюдянском районе и на территории Республики Бурятия. Минимальная и максимальная продолжительность инкубационного периода была менее суток и 99 дней соответственно, в среднем составив $11,0 \pm 0,38$ суток, и по территориям существенно не различалась (табл. 1). Такие же сроки инкубации приводят исследователи из других регионов [1, 4, 6].

Таблица 1
Структура заболеваемости иксодовыми клещевыми боррелиозами жителей г. Иркутска (1995–2011 гг.) в зависимости от места заражения

Места заражения	Всего заболевших		Средний возраст (лет)	Доля мужчин среди заболевших (%)	Незанятое население (%)	Эритемная форма (%)	Длительность инкубационного периода (дни)	Пик нападения клещей	Пик случаев заболеваний
	абс.	%							
Александровский тракт	29	$4,4 \pm 0,79$	$44,5 \pm 3,27$	$48,3 \pm 9,28$	$34,5 \pm 8,83$	$100,0 \pm 19,36$	$12,6 \pm 2,45$	1 дек. июня	2–3 дек. июня
Байкальский тракт	166	$25,0 \pm 1,68$	$42,2 \pm 1,67$	$51,2 \pm 3,88$	$29,5 \pm 3,54$	$91,1 \pm 4,24$	$10,3 \pm 0,63$	1–2 дек. июня	2–3 дек. июня
Голоустненский тракт	74	$11,1 \pm 1,22$	$45,0 \pm 2,24$	$62,2 \pm 5,64$	$31,1 \pm 5,38$	$78,9 \pm 9,35$	$10,8 \pm 0,87$	1–2 дек. июня	2–3 дек. июня
Черта г. Иркутска	97	$14,6 \pm 1,37$	$35,2 \pm 2,51$	$48,5 \pm 5,07$	$36,1 \pm 4,88$	$50,0 \pm 15,81$	$9,7 \pm 0,90$	1–2 дек. июня	3 дек. июня
Иркутский район	10	$1,5 \pm 0,52$	$32,9 \pm 7,16$	$40,0 \pm 15,49$	$50,0 \pm 15,81$	$100,0 \pm 19,36$	$11,1 \pm 2,35$	1 дек. июня	2 дек. июня
Качугский тракт	22	$3,3 \pm 0,69$	$39,7 \pm 5,05$	$59,1 \pm 10,48$	$31,8 \pm 9,93$	$57,1 \pm 18,70$	$12,4 \pm 1,93$	1–2 дек. июня	2–3 дек. июня
Култукский тракт	56	$8,4 \pm 1,07$	$45,6 \pm 2,81$	$60,7 \pm 6,53$	$33,9 \pm 6,33$	$84,6 \pm 10,01$	$12,8 \pm 2,04$	2–3 дек. июня	1 дек. июля
Мельничная Падь	61	$9,2 \pm 1,12$	$44,4 \pm 3,04$	$50,8 \pm 6,40$	$37,7 \pm 6,21$	$90,0 \pm 6,71$	$12,4 \pm 1,33$	3 дек. мая – 1 дек. июня	1–2 дек. июня
Московский тракт	35	$5,3 \pm 0,87$	$48,8 \pm 3,37$	$51,4 \pm 8,45$	$48,6 \pm 8,45$	$83,3 \pm 10,76$	$12,6 \pm 2,12$	2 дек. июня	3 дек. июня – 1 дек. июля
Слюдянский район	26	$3,9 \pm 0,75$	$38,9 \pm 2,90$	$69,2 \pm 9,05$	$11,5 \pm 6,27$	$80,0 \pm 12,65$	$9,4 \pm 1,17$	3 дек. июня – 1 дек. июля	1–2 дек. июля
Северные районы Иркутской области	22	$3,3 \pm 0,69$	$42,5 \pm 3,80$	$81,8 \pm 8,22$	$31,8 \pm 9,93$	$90,0 \pm 9,49$	$10,5 \pm 2,03$	2 дек. июня	3 дек. июня – 1 дек. июля
УОБО+Ольхонский район	45	$6,8 \pm 0,97$	$35,4 \pm 3,44$	$62,2 \pm 7,23$	$33,3 \pm 7,03$	$73,7 \pm 10,10$	$9,7 \pm 1,45$	3 дек. июня	1 дек. июля
Республика Бурятия	22	$3,3 \pm 0,69$	$37,4 \pm 4,21$	$68,2 \pm 9,93$	$13,6 \pm 7,32$	$50,0 \pm 20,41$	$13,3 \pm 1,65$	1–2 дек. июля	2–3 дек. июля
В целом	665	100	$41,5 \pm 0,85$	$55,8 \pm 1,93$	$32,5 \pm 1,82$	$81,3 \pm 2,94$	$11,0 \pm 0,38$	2 дек. июня	3 дек. июня – 1 дек. июля

Возраст больных ИКБ колебался от 1 г. 2 мес. до 86 лет и в среднем оказался равен $41,5 \pm 0,85$ году. При этом существенно моложе были лица, заразившиеся в черте г. Иркутска ($35,2 \pm 2,51$ лет), а старше — в рекреационных зонах вдоль Московского тракта ($48,8 \pm 3,37$ лет). Чаще всего болели люди старше 50 лет (44,0 %), большая доля (17,3 %) приходится на возрастную группу 40–49 лет и 7–14 лет (11,6 %). Меньше всего среди больных ИКБ оказалось подростков от 15 до 19 лет (2,4 %). С небольшими вариациями такое соотношение сохранялось для всех территорий, на которых произошло инфицирование (табл. 1). Преобладание среди больных лиц старше 40 лет отмечается во всех аналитических исследованиях по заболеваемости ИКБ [2, 5–7, 9, 13].

Среди больных ИКБ иркутян мужчины преобладали незначительно ($55,8 \pm 1,93$ %), хотя в группе заразившихся в северных районах их доля существенно выше ($81,8 \pm 8,22$ %). Примерно равное соотношение полов среди больных ИКБ отмечено в Украине [11], Краснодарском крае [7], Челябинской области [9] и Приморье [5]. В Кировской области [6] и Перми [4] мужчины болели чаще. Многие исследователи [6, 9, 13] отмечают среди больных ИКБ большую долю пенсионеров и неработающих — от 35 до 50 %. Относительное количество незанятого населения в исследуемой нами выборке в среднем составило почти треть ($32,5 \pm 1,82$ %), в большинстве — женщины пенсионного возраста. Среди заболевших ИКБ иркутян, выезжавших на природу достаточно далеко от Иркутска, в места, связанные с экстремальным туризмом (Слюдянский р-н Иркутской области и Республика Бурятия), пенсионеров и безработных было существенно меньше (табл. 1).

На теле человека клещи, инфицированные боррелиями, отдавали предпочтение туловищу: $38,1 \pm 2,16$ % от всех присасываний. Та же закономерность отмечена в Перми [4] и Приморском крае [5]. На голову, верхние и нижние конечности «укусов» приходилось примерно поровну: $20,6 \pm 1,80$, $20,6 \pm 1,80$ и $18,7 \pm 1,73$ % соответственно. О множественных «укусах» сообщили около двух процентов пострадавших. Обращает на себя внимание тот факт, что излюбленные места присасывания иксодид зависят от возраста «жертвы»: от 63 до 73 % пострадавших детей до 14 лет были «укушены» в разные отделы головы, в то же время люди старше 50 лет достоверно реже отмечали присасывание клещей к этой части тела ($p < 0,001$). Анализ историй болезней детей в возрасте 3–13 лет в Красноярске также показал, что «укусы» клещей локализовались чаще всего в области головы, реже — на туловище и конечностях [1].

Мигрирующая эритема является одним из основных клинических диагностических признаков ИКБ. В нашей выборке ее наличие отмечалось у $81,3 \pm 2,94$ % больных. За немногими исключениями [13] и по данным других авторов эритема наблюдается в большинстве случаев ИКБ (от 70 до 100 %) [1, 6, 7, 9, 11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для жителей Иркутска наибольший риск заражения ИКБ существует при посещении с конца мая до первых чисел июля местностей, прилегающих к Байкальскому, Голоустненскому и Мельничному трактам, равно как и зеленых зон на территории самого областного центра. Преимущественно болеют лица старше 40 лет независимо от пола. Наличие эритемы отмечено более чем у 80 % заболевших ИКБ. Характерным местом присасывания клещей на взрослых людях является туловище, на детях — голова. Простые меры профилактики, такие как недопущение заползания клещей под одежду, само- и взаимоосмотры во время посещения природных очагов ИКБ помогут предотвратить заболевание.

Благодарность: авторы искренне признательны сотрудникам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» А.М. Антоновой, В.М. Кривошеину и И.Г. Чумаченко за любезное предоставление разработок по заболеваемости ИКБ в г. Иркутске.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боброва Л.В., Базилевская Т.Н. Клиника и течение болезни Лайма у детей города Красноярска // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. — 1999. — № 1. — С. 13–15.
2. Иксодовые клещевые боррелиозы в Ярославской области: эпидемиологические аспекты / Т.А. Дружинина [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. — 2002. — № 6. — С. 25–27.
3. Кисленко Г.С., Коротков Ю.С. Лесной клещ *Ixodes ricinus* (Ixodidae) в очагах иксодовых клещевых боррелиозов северо-запада Подмосковья // Паразитология. — 2002. — Т. 36, вып. 6. — С. 447–456.
4. Клинико-морфологические особенности проявлений мигрирующей эритемы у больных иксодовым клещевым боррелиозом / Зюзя Ю.Р., Ефимова Н.С., Воробьева Н.Н. [и др.] // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни — 1999. — № 4. — С. 36–41.
5. Клинико-эпидемиологические аспекты иксодовых клещевых боррелиозов в Приморском крае / Г.Н. Леонова [и др.] // Эпидемиология и инфекц. болезни. — 2002. — № 1. — С. 49–53.
6. Клинико-эпидемиологические и лабораторные особенности раннего периода Лайм-боррелиоза в Кировской области / А.А. Бондаренко [и др.] // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни — 1997. — № 4. — С. 18–21.
7. Клинико-эпидемиологический анализ клещевого боррелиоза в Краснодарском крае / Г.В. Гальцева [и др.] // Современные аспекты природной очаговости болезней: матер. Всеросс. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природноочаговых инфекций» Роспотребнадзора (1–2 ноября 2011 г., Омск) / Отв. ред. Н.В. Рудаков, В.К. Ястребов. — Омск : ИЦ «Омский научный вестник», 2011. — С. 97.
8. Козлова И.В. Научное обоснование и пути совершенствования экстренной диагностики и профилактики трансмиссивных клещевых инфек-

ций в условиях сочетанности природных очагов : дис. ... докт. мед. наук. — Иркутск, 2008. — 307 с.

9. Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И.. Современные эпидемиологические и клинические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в южноуральском регионе России // Современные аспекты природной очаговости болезней : матер. Всеросс. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природноочаговых инфекций» Роспотребнадзора (1–2 ноября 2011 г., Омск) / Отв. ред. Н.В. Рудаков, В.К. Ястребов. — Омск : ИЦ «Омский научный вестник», 2011. — С. 29.

10. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. — Минск : «Вышэйш. школа», 1973. — Изд. 3-е, испр. — 320 с.

11. Современная эпидемиологическая ситуация по лайм-боррелиозу в Украине / Г.В. Белецкая [и др.] // Актуал. проблемы природной очаговости болезней. — Омск, 2009. — С. 70–71.

12. Современные особенности эпидемиологии клещевого энцефалита в Иркутской области / О.З. Горин [и др.] // Этиология, эпидемиология и диагностика инфекционных заболеваний Восточной Сибири. — Иркутск, 1992. — С. 33–43.

13. Эпидемиологическая ситуация по иксодовым клещевым боррелиозам в г. Томске / В.Г. Кондратьев [и др.] // Актуал. пробл. инфектол. и паразитол. — Томск, 2001. — С. 111.

14. Lyme disease — a tick-borne spirochetosis? / W. Burgdorfer [et al.] // Science. — 1982. — № 216 (4552). — P. 1317–1319.

15. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing / A. Keller [et al.] // Nat. Commun. — 2012. — Vol. 28, № 3. — P. 698. — doi: 10.1038/ncomms1701.

16. Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy / G. Capelli [et al.] // Parasit Vectors. — 2012. — Vol. 27, № 5 (1). — P. 61.

Сведения об авторах

Мельникова Ольга Витальевна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории природноочаговых инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (664075, Иркутск, ул. Байкальская, д. 243, кв. 8; тел. 89501200533; E-mail: melnikovaovit@gmail.com)

Вершинин Евгений Александрович — к.б.н., научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Иркутск, ул. Декабрьских Событий, д. 87, кв. 6)

Сидорова Елена Александровна — младший научный сотрудник лаборатории природноочаговых инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Иркутск, ул. Воровского, 17А, кв. 8)

Андаев Евгений Иванович — д.м.н., заместитель директора общим вопросам и организационно-методической работе, зав. лабораторией природноочаговых вирусных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (Иркутск, ул. Баррикад, 54 «О»)

**Р.С. Мусагалиева, Б.Б. Атшабар, У.А. Сагымбек, А.Ж. Жолшоринов, З.Б. Жумадилова,
З.А. Сагиев, А.К. Касенова, А.О. Исмаилова, Г.С. Жунусова, А.С. Жолдасбекова,
Р.С. Сайлаубек, К.Р. Рахимов, Л.М. Атовулдаева, Д.С. Алиев, Ж.Б. Медетов**

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ХОЛЕРЕ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН ЗА 2011 Г.

**Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. Масгута Айкимбаева (г. Алматы,
Республика Казахстан)**

Анализ зарегистрированных случаев холеры за 1993–2008 гг. показал, что все случаи эпидемической холеры в Казахстане имеют завозной характер. Токсигенные холерные вибрионы были изолированы из открытых водоемов, берущих начало из соседней страны. Пространственное распределение нетоксигенных холерных вибрионов в объектах открытых водоемов республики имеет выраженный территориальный характер. На распространение холерного вибриона на территории республики влияют климатогеографические и антропогенные факторы. Результаты анализа показали, что при эпидемиологическом мониторинге за холерой необходим комплексный подход в решении данной проблемы.

Ключевые слова: холерный вибрион, штаммы, климатогеографический фактор, вариабельность

THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION ON CHOLERA IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN IN 2011

**R.S. Musagaliyeva, B.B. Atshabar, U.A. Sagymbek, A.Zh. Zholshorinov, Z.B. Zhumadilova,
Z.A. Sagiyeu, A.K. Kasenova, A.O. Ismailova, G.S. Zhunusova, A.S. Zholdasbekov,
R.S. Sailaubek, K.R. Rahimov, L.M. Atovulayeva, D.S. Aliyev, Zh.B. Medetov**

**M. Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Almaty, Republic
of Kazakhstan**

The analysis of registered cholera cases that occurred during 1993–2008 showed that all epidemic cases of cholera in Kazakhstan were imported. The toxigenic cholera microbes were isolated from the water reservoirs which started in the neighbor country. The spatial distribution of non-toxic cholera vibrio has the regional features. The climatic and anthropogenic factors affect the distribution of the cholera vibrio in the Kazakhstan. The results of the analysis show that the complex approach has to be used for cholera epidemiological monitoring.

Key words: vibrio cholerae, strain, climatic geographic factor, variability

Территория Казахстана не является эндемичной по токсигенной холере. Эколого-географический анализ распространения холеры показывает, что Казахстан является территорией риска для проникновения возбудителя и развития эпидемических проявлений различной интенсивности.

Анализ наблюдений за развитием эпидемического процесса в 1993–2008 гг. показал, что все эпидемические осложнения в Казахстане связаны с завозом инфекций извне. Холеру 12 раз завозили из дальнего зарубежья и 10 раз — из ближнего.

В настоящее время в Казахстане отмечаются активные миграционные процессы, в связи с чем, предстоит развивать все необходимые направления для контроля здоровья путешествующих людей и мигрантов. С этой целью необходимо улучшить материально-техническую базу существующих санитарно-карантинных пунктов, внедрить ускоренную диагностику инфекции, активизировать выполнение договоров о взаимодействии и взаимной информации с санитарно-карантинными службами ряда приграничных стран [1].

По результатам анализа за 2000–2011 гг. продолжительность периода обнаружения холерных вибрионов О1 серогруппы в водоемах находится в прямой зависимости от климатогеографических

особенностей территории. Наличие холерных вибрионов в водной среде регистрировались с мая по сентябрь. Существуют определенные для каждой территории интервалы обнаружения вибрионов, повторяющиеся из года в год: в Южно-Казахстанской — этот интервал находится в июне — октябре, а в Западно — Казахстанской, Мангистауской области — в июле и августе — сентябре. Среди областей по неблагоприятным показателям выделялись: Южно-Казахстанская, Мангистауская, Алматинская, Атырауская, Западно-Казахстанская области [2].

Эпидемиологическая обстановка по холере в Республике Казахстан за 2011 г. в целом была благополучной, за исключением Южно-Казахстанской области.

За этот период было зарегистрировано 3 случая заболевания людей неэпидемической холерой, обусловленные холерным вибрионом *non O1* серогруппы в Западно-Казахстанской области.

Из объектов внешней среды было выделено 7 штаммов холерного вибриона О1 серогруппы. Из них 3 штамма Эльтор Огава (токсигенные) были изолированы в Южно-Казахстанской области из открытых водоемов и 4 нетоксигенных штамма Эльтор Инаба были выделены из воды пруда с. Шыбынды Казталовского района Западно-Казахстанской

области, эти штаммы были гемолизположительны, гена токсигенности *ctxAB* не имеют. Два штамма из 4-х чувствительны к фагу эльтор в диагностическом титре, степень чувствительности к другим фагам различна: 3 штамма лизировались фагом ТЭПВ-6, из них два до титра, один цельным; фагами ХДФ 3, 4 лизировались 2 штамма, один до ДРТ, второй цельным; фагом ДДФ лизировались 2 штамма. Чувствительных к фагам С, ctx +, ctx – и ХДФ 5 не выявлено. Штаммы чувствительны к тетрациклину, левомецитину, гентамицину, ципрофлоксацину.

Лабораториями противочумных станций за год из объектов внешней среды был выделен 1331 штамм холерного вибриона *non* O1 серогруппы.

Южно-Казахстанская область, по комплексу факторов, обуславливающих эпидемическую опасность по холере (уровень заболеваемости ОКИ, обеспечение населения качественной питьевой водой, климатогеографические особенности и др.), отнесена к наиболее эпидемиологически важными – первому типу территории, и обстановка по группе острых кишечных инфекций по области остается крайне напряженной в жаркий период года.

В целом по области в 2011 г. наблюдается тенденция к снижению заболеваемости острыми кишечными инфекциями (далее – ОКИ) по сравнению с 2010 г. (табл. 1). Например, если показатель заболеваемости ОКИ за 9 месяцев 2010 г. составлял 154, то за этот же период 2011 г. – 126 на 100 тыс. населения (снижение на 17,9 %).

Однако в ряде районов области отмечена тенденция к росту заболеваемости ОКИ в Сарыагашском, Ордабасинском и Арысском районах.

В 2011 г. в начале сентября из открытых водоемов Сарыагашского района были выделены 3 культуры холерных вибрионов O1 серогруппы Эльтор Огава, гемолиз отрицательные, эпидемически значимые, устойчивые к левомецитину, умеренно

устойчивые к тетрациклину, имеющие ген токсигенности *ctxAB*. Токсигенные штаммы холерного вибриона были обнаружены из воды каналов, берущих начало из соседней республики (Северо-Ташкентский, Восточно-Ташкентский, р. Келес).

В Сарыагашском районе обеспеченность центральным водоснабжением только на 58 %, высокая плотность населения (население района составляет более 290 000 человек), что могло способствовать осложнению эпидемической ситуации по холере в области.

С целью предупреждения распространения холеры среди населения с конца августа и весь сентябрь в Сарыагашском и Махтааральском районах проводились профилактические и противоэпидемические мероприятия по холере, по обеспечению населения качественной питьевой водой, проведению дезинфекционных, противомушинных (надворных туалетов, мусора) и санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на недопущение распространения холеры среди населения.

В связи с создавшейся ситуацией в Южно-Казахстанской области, с учетом детекции в сентябре 2011 г. вирулентных штаммов холерного вибриона из воды каналов, впадающих в местные водоемы (р. Келес, Шардаринское водохранилище), в рамках эпидемиологического мониторинга за холерой в области необходимо акцентировать внимание на приграничные районы (Сарыагашский, Казыгуртский, Махтааральский, Шардаринский), где имеются предпосылки к распространению холеры при заносе: высокая плотность населения, недостаточное обеспечение населения качественной питьевой водой, высокий уровень миграции, а также, важным фактором является то, что большинство водоемов, используемые населением для хозяйственно-бытовых и питьевых нужд берут начало из соседней страны.

Таблица 1

Данные по заболеваемости острыми кишечными инфекциями и неэпидемической холерой по Южно-Казахстанской области за 5 лет

Годы	ОКИ		
	Абс. число	Заболеваемость на 100 тыс. населения	Рост / снижения
2007	5551	231,2	+18,6 %
2008	6948	281,5	+18,8 %
2009	5581	222,7	–20,9 %
2010	5329	208,4	–6,5 %
2011	4370	165,76	–19 %
Годы	Холера неэпидемическая		
	Абс. число	Заболеваемость на 100 тыс. населения	Рост / снижения
2007	6	0,3	+2
2008	4	0,2	–2
2009	3	0,1	–1
2010	6	0,3	+3
2011	–	–	–

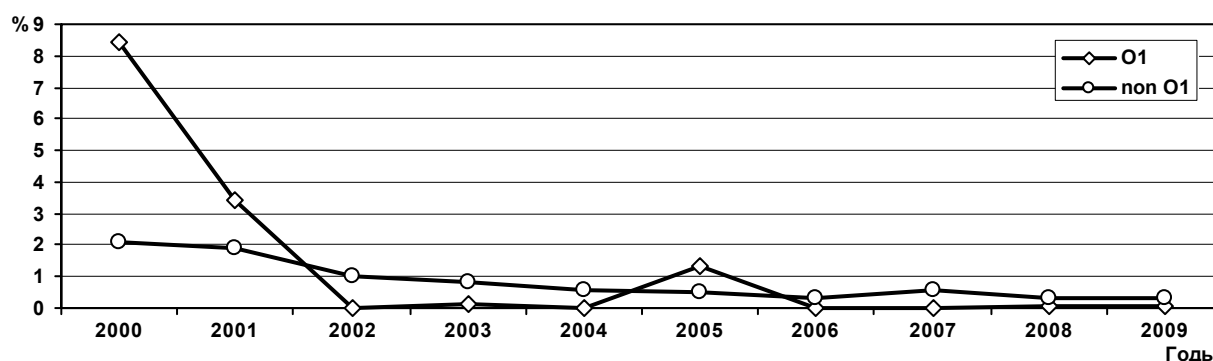


Рис. 1. Процент проб из объектов окружающей среды с выделением холерного вибриона O1 и non O1 серогруппы по Южно-Казахстанской области.

По данным анализа за последние десять лет из объектов окружающей среды на территории Южно-Казахстанской области нетоксигенные холерные вибрионы O1 и non O1 серогруппы выделяются с мая по сентябрь, с наибольшей частотой в июле — 52,0 % и в августе — 25 % (рис. 1). Вибрионы отличаются значительной изменчивостью по многим фенотипическим признакам (по агглютинабельности, фаголизависимости, антибиотикочувствительности и т.д.).

Была характерна и вариабельность по признаку чувствительности к антибиотикам, причем это касалось и штаммов, выделенных от людей. Группой антибиотиков для эффективного лечения холеры являются фторхинолоны, и их бесконтрольное назначение для экстренной профилактики может привести к резистентности штаммов холерного вибриона к ним. Об этом свидетельствует то, что с 1993 г. чувствительность выделяемых холерных вибрионов к некоторым фторхинолонам заметно снизилась. Такая ситуация может создать в будущем проблемы при лечении холеры.

Ежегодная регистрация в Южно-Казахстанской области антибиотикорезистентных штаммов

холерных вибрионов в окружающей среде демонстрирует циркуляцию возбудителя нетоксигенной холеры между водными объектами и людской популяцией, включая выделение из воды водоемов и от людей штаммов, близких по свойствам, употребление населением небезопасной питьевой воды, дают основание предполагать, что неэпидемическая холера имеет местный или эндемичный характер и требует постоянной настороженности, нельзя исключать возможность завоза холеры с последующим распространением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мусагалиева Р.С. Пути завоза и распространения холеры за 1993 — 2008 гг. // Батыс Қазақстан медицина журналы. — Ақтобе, 2010. — № 1(25) — С. 78.
2. Эпидемиологические и экологические предпосылки распространения холеры / Р.С. Мусагалиева [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Здоровье 2012», г. Ашхабад (Туркменская Республика), 19 — 21 августа 2012 г. — С. 713.

Сведения об авторах

Мусагалиева Райхан Сафаровна — начальник отдела организации консультативно-методической помощи Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева (КНЦКЗИ) (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; тел. +7727 251-0293; e-mail: rmussagaliyeva@kscqzd.kz)

Атшабар Бахыт Бахияулы — директор КНЦКЗИ (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: batshabar@kscqzd.kz)

Сагымбек Улан Арипжанулы — главный научный сотрудник КНЦКЗИ (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: usagimbek@kscqzd.kz)

Жолшоринов Айтмагамбет Жедибаевич — комитет Госсанэпиднадзора МЗ РК (e-mail: zhazh@gov.kz)

Жумадилова Заурещ Бапановна — комитет Госсанэпиднадзора МЗ РК (e-mail: zzb@gov.kz)

Сагиев Заурбек Акимханович — зав. лабораторией холеры КНЦКЗИ (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: zsagiyev@kscqzd.kz)

Касенова Алтынай Камеловна — м.н.с., референс-лаборатория КНЦКЗИ (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: akasenova@kscqzd.kz)

Исмаилова Акерке Оразалиевна — м.н.с., лаборатории холеры (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: erke777@mail.ru)

Жунусова Гульнур Сагындыковна — м.н.с., лаборатории холеры (Республика Казахстан, Алматы, Капальская, 14, КНЦКЗИ; e-mail: gzhunusova@kscqzd.kz)

Жолдасбекова Айымгуль — ЦСЭЭ по Мангистауской области (e-mail: aiyimgul54@mail.ru)

Сайлаубек Ратбек Сайлаубекович — начальник Шымкентской противочумной станции

Рахимов Коңдрат Рахимович — Шымкентская противочумная станция (e-mail: lilya2001@mail.ru)

Атовуллаева Лилия Мадарисовна — Шымкентская противочумная станция (e-mail: lilya2001@mail.ru)

Алиев Даулет — Департамент Комитета Госсанэпиднадзора по ЮКО (e-mail: lilya2001@mail.ru)

Медетов Жумагул — Департамент Комитета Госсанэпиднадзора по ЮКО (e-mail: lilya2001@mail.ru)

Н.В. Рудаков, С.Н. Шпынов, В.К. Ястребов, И.Е. Самойленко, Л.В. Кумпан, Т.А. Решетникова,
Н.В. Абрамова, А.Н. Коломеец

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ РИККЕТСИОЗОВ В РОССИИ И НОВЫЕ ПОДХОДЫ К КЛАССИФИКАЦИИ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ РИККЕТСИЯМИ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ

Омский НИИ природно-очаговых инфекций (Омск)
Омская государственная медицинская академия (Омск)

Достигнутый прогресс в изучении риккетсий связан с совершенствованием методов их выявления и изоляции — использованием живых биотехнологических систем (культивированием в чувствительных линиях эукариотических клеток и экспериментальных линиях клещей) в сочетании с методами генотипирования и классическими риккетсиологическими методами. Разработка и использование новых методологических подходов к изучению риккетсий и других клещевых альфа-протеобактерий привело к существенному пересмотру представлений о генетическом разнообразии, гетерогенности антигенных и биологических свойств, экологии и вкладе в инфекционную патологию различных представителей порядка *Rickettsiales* в России и в мире. Требуется пересмотра официальная регистрация заболеваний в соответствии с МКБ-10 и современными данными по распространению риккетсий и риккетсиозов в России.

Ключевые слова: риккетсии и риккетсиозы, альфа-протеобактерии, клещевой риккетсиоз, природные очаги

THE PRESENT STATE OF THE PROBLEM OF RICKETTSIOSES IN RUSSIA AND NEW APPROACHES TO THE CLASSIFICATION OF DISEASES CAUSED BY SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAE

N.V. Rudakov, S.N. Shpynov, V.K. Yastrebov, I.E. Samoylenko, L.V. Kumpan,
T.A. Reshetnikova, N.V. Abramova, A.N. Kolomeyetz

Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk
Omsk State Medical Academy, Omsk

The paper presents analysis of the development and the current status of the doctrine about rickettsia and rickettsiosis. Progress in the study of *Rickettsia* is associated with improved methods for their detection and isolation — using live biotechnological systems (cultivation in the experimental lines of ticks-sensitive lines of eukaryotic cells) in combination with methods of genotyping and classical rickettsial methods. The development and use of new methodological approaches to the study of tick-borne rickettsiae and other alpha-proteobacteria led to an important revision of ideas about genetic diversity, heterogeneity of antigenic and biological characteristics, ecology and contribution to the infectious pathology of various representatives of the order *Rickettsiales* in Russia.

Key words: rickettsiae and rickettsioses, α -Proteobacteria, tick-borne rickettsiosis, natural foci

ВВЕДЕНИЕ

Порядок *Rickettsiales* объединяет α 1 протеобактерии семейств *Rickettsiaceae* (рода *Rickettsia* и *Orientia*) и *Anaplasmataceae* (рода *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*) [20]. В составе рода *Rickettsia* выделяли две группы — клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и сыпного тифа (СТ). Stothard and Fuerst [26] на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена предложили выделить предковую или «ancestral» группу, предшествующую разделению риккетсий на группы КПЛ и СТ.

В соответствии с критериями идентификации новых риккетсий [16], в настоящее время **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature — Genus *Rickettsia*** включает 27 видов риккетсий (<http://www.bacterio.cict.fr/qr/rickettsia.html>). За последние 20 лет этот список дополнили 14 риккетсий, которые получили официальный статус вида: *R. aeschlimannii* (1997), *R. africae* (1996), *R. asiatica* (2006), *R. felis* (2001), *R. heilongjiangensis* (2006), *R. helvetica* (1993), *R. honei* (1998), *R. hoogstraalii* (2010), *R. ja-*

ponica (1992), *R. massiliae* (1993), *R. peacockii* (1997), *R. raoultii* (2008), *R. slovaca* (1998), *R. tamurae* (2006).

К риккетсиям группы СТ отнесены два вида риккетсий — *Rickettsia prowazekii* и *R. typhi*, к группе предшественников — *R. canadensis*, *R. bellii* и *Candidatus R. tarasevichiae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положены результаты многолетних наблюдений за очагами клещевого риккетсиоза в азиатской части России. Использован комплекс лабораторных и экспериментальных методов изучения риккетсий преимущественно группы клещевой пятнистой лихорадки. Выделение штаммов риккетсий осуществляли на морских свинках, развивающихся куриных эмбрионах, с применением культур клеток Vero и клещевых моделей. Генотипирование риккетсий осуществляли с помощью комплекса молекулярно-биологических методов (ПЦР-рестрикционный анализ, ПЦР-секвенирование). Серологические исследования выполняли с применением ИФА, МФА и РСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашей работы была оптимизация методических и методологических подходов к изоляции и изучению представителей порядка *Rickettsiales* и выявление спектра и распространения клещевых альфа1-протеобактерий и вызываемых ими заболеваний на изучаемых территориях России и Казахстана.

Широкое использование в последние годы современных методов изоляции и идентификации риккетсий привело к существенному пересмотру представлений о таксономии риккетсий, распространении и эпидемическом проявлении очагов клещевых риккетсиозов (пятнистой лихорадки), как они обозначены в МКБ-10 (A77). В настоящее время формой № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» предусмотрено представление статистической отчетности по инфекциям, относящимся, в соответствии с МКБ-10, к риккетсиозам (A75-A79) следующих нозоформ: эпидемический сыпной тиф (A75.0), болезнь Брилла (A75.1), лихорадка Ку (A78), сибирский клещевой тиф (A77.2).

Шифр МКБ A77.2 «Пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia sibirica*, включает два названия: «североазиатская клещевая лихорадка» и «сибирский клещевой тиф». Эти названия являются синонимами одного и того же заболевания. Название инфекции «сибирский клещевой тиф» было дано в начальном периоде его изучения в 30-годах прошлого столетия.

Прогресс в изучении видового состава риккетсий группы КПА, который отмечается в последние десятилетия, меняет представление о клещевых риккетсиозах. Если раньше считалось, что имеется один патоген — *Rickettsia sibirica*, вызывающий клещевой риккетсиоз под названием «сибирский клещевой тиф» (A77.2), то сейчас выделено еще 6 видов патогенных для человека риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами.

Кроме того название инфекции, вызываемой *Rickettsia sibirica* — «сибирский клещевой тиф» не отражает истинного территориального распространения заболевания, т.к. оно регистрируется не только в Сибири, но и на Дальнем Востоке, в Зауралье, и за пределами Российской Федерации — в Казахстане, Монголии, Китае. К тому же термин «тиф» неприемлем к этой инфекции, т.к. тифозное состояние при ней не наблюдается.

На территории России выявляют также заболевания астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ) [9, 27], однако эта нозологическая форма отсутствует в форме № 2 Росстата «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»).

К новым риккетсиям, вызывающим клещевые риккетсиозы, относятся *R. conorii subsp. caspiensis*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *R. slovaca*, *R. raoultii*.

В связи с этим назрела необходимость пересмотра номенклатуры заболеваний, регистрируемых по форме № 2. Предлагаем в соответствии с МКБ-10 заболевания, вызываемые перечисленной группой

риккетсий, именовать под обобщенным термином «клещевые риккетсиозы», шифр A77, отдельными строчками:

в т.ч. A 77.1 Пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia conorii (subsp. caspiensis)* — астраханская пятнистая лихорадка;

в т.ч. A77.2 Пятнистая лихорадка, вызываемая *Rickettsia sibirica* — североазиатский или сибирский клещевой риккетсиоз.

Уже в первый период изучения клещевого риккетсиоза (КР) возникали вопросы об отличиях возбудителя на различных территориях. В связи с этим Е.Н. Павловский указывал на существование на Дальнем Востоке России нескольких форм клещевых «сыпнотифозных лихорадок» [5].

Наряду с классическим генотипом — *R. sibirica sensu stricto*, широко распространенным в нозоареале КР, на Дальнем Востоке РФ и в Северном Китае в клещах *Dermacentor silvarum* выявляют генотип *R. sibirica BJ-90*. Штамм «Приморье-32/84» *R. sibirica subsp. BJ-90* выделен из клещей *D. silvarum* в нашей лаборатории Т.А. Решетниковой за шесть лет до изоляции первых китайских штаммов этой риккетсии (1990 г.) [2].

R. heilongjiangensis описан как новый вид в 2003 г. [16]. Случаи инфекции, вызванные *R. heilongjiangensis*, выявлены ретроспективно в Хабаровском крае [11]. *R. heilongjiangensis* выявлена в «пятнах» *H. concinna* в пределах нозоареала КР на Дальнем Востоке (Приморский край, клещи *H. concinna*), а также в Алтайском (*H. concinna*) и Красноярском (*H. concinna*, *D. nuttalli*) краях [7, 6, 14].

Штаммы *R. heilongjiangensis* были изолированы в Омском НИИ природноочаговых инфекций раньше первых «китайских» штаммов, однако идентифицированы в последние годы. Первый штамм нового вида риккетсий выделил В.К. Ястребов в 1966 году из клещей *H. concinna*, собранных в Алтайском крае. Еще два штамма *R. heilongjiangensis*, выделенные из клещей *H. concinna* из Приморского края, хранятся в нашей коллекции [7, 25].

R. helvetica широко распространена в странах Европы в клещах *Ixodes ricinus*. С этим видом риккетсий связывают лихорадочные заболевания, сопровождающиеся поражением кровеносных сосудов и развитием перикардитов. Методами генотипирования получены данные, свидетельствующие о возможной этиологической роли *R. helvetica* в развитии острых лихорадочных заболеваний после присасывания клещей в Пермском крае [4]. Ранее риккетсии, генетически близкие *R. helvetica*, выявлены нами в клещах *Ixodes persulcatus* в Омской области [2]. Полученные данные свидетельствуют о вероятности распространения *R. helvetica* — подвидных риккетсий в ареале клещей *I. persulcatus* — комплекса в России. *R. helvetica* и близкие к *R. helvetica* виды риккетсий — *R. asiatica sp.nov.* и *R. tamurae sp.nov.* выявлены в клещах родов *Ixodes* и *Amblyomma* в Японии [17, 23, 21].

На ряде территорий Европы установлено распространение *R. slovaca* [12, 24, 28]. В 2001 г. *R. slovaca* генотипирована нами в иксодовых клещах

рода *Dermacentor* на двух административных территориях Европейской части России — в Воронежской области и Ставропольском крае [8]. Недавно идентифицирован штамм *R. slovaca*, выделенный в Мокроусовском районе Курганской области (Зауралье) в 1969 г. д.м.н. М.С. Шайманом из клещей *D. marginatus* [25]. Он является единственным штаммом *R. slovaca*, выделенным в России.

Патогенная для человека *R. aeschlimannii* генотипирована нами в клещах *Haemaphysalis punctata* из Алма-Атинской области Казахстана, где в предыдущие десятилетия зарегистрированы случаи «КР» [14]. В дальнейшем эта риккетсия была выявлена в Ставропольском крае в клещах *Hyalomma marginatum marginatum* [1].

Три новых, тесно генетически связанных генотипа риккетсий (*R.sp.RpA4*, *R.sp.DnS14*, *R.sp.DnS28*) впервые описанных в Астраханской области (*R.sp.RpA4*) и в республике Алтай (*R.sp.DnS14*, *R.sp.DnS28*) Е.Б.Рыдкиной с нашим участием [19], были выявлены нами в клещах рода *Dermacentor* в очагах КР и на свободных от этой инфекции территориях России и Казахстана [2, 14]. Выяснено не только широкое распространение этих риккетсий в Европе, но и их вероятная роль в возникновении синдрома TIBOLA. Девять штаммов этих генотипов риккетсий, описанных к настоящему времени как новый вид риккетсий группы КПЛ *Rickettsia raoultii* sp.nov. [22], депонировано нами во Всероссийском музее риккетсиальных культур [18].

Впервые описана *R. tarasevichiae*, отнесенная нами к группе предшественников и выявлена высокая инфицированность клещей *I. persulcatus* этой риккетсией в России [10]. Изолировано на культурах клеток Vero 14 штаммов, восемь из них депонированы во Всероссийском музее риккетсиальных культур [18].

Показано распространение в клещах *I. persulcatus* на территориях Сибири и Дальнего Востока *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophila*, «Schotti variant», в *H. concinna* на Дальнем Востоке — *A. bovis*, с использованием культур клеток изолирован штамм возбудителя анаплазмоза крупного рогатого скота — *Anaplasma sp.Omsk*. Наиболее распространенным заболеванием, вызываемым представителями семейства *Anaplasmataceae* (*Anaplasma phagocytophilum*), оказался ГАЧ, серологически верифицируемый в России в ареалах распространения клещей *Ixodes ricinus* — *Ixodes persulcatus* с помощью ИФА.

В соответствии с классическими подходами к изучению риккетсий предусмотрено их выделение на морских свинках и куриных эмбрионах, что не позволяет изучить весь спектр микроорганизмов порядка *Rickettsiales* (выявляются преимущественно патогенные риккетсии, оценка патогенности).

Применение только молекулярно-генетических методов исследования позволяет выявлять спектр «клещевых» микроорганизмов, при небольших объемах ПЦР-секвенирования выявляет преимущественно «массовые виды» (в клещах рода *Dermacentor* — *Rickettsia raoultii*, в клещах

рода *Ixodes* — *R. tarasevichiae*). При этом создается представление об отсутствии на обследованных территориях патогенных риккетсий. Выявление *Rickettsia* sp. не позволяет определить эпидемическую опасность территорий и риск заражения при нападении содержащих риккетсии клещей.

Метод культур клеток — наиболее чувствительный метод изоляции риккетсий, однако малопродуктивный, требует не менее 4–5 пассажей для выделения штаммов. Использование клещевой экспериментальной модели (воспроизведение естественного метаморфоза переносчиков) позволяет в течение длительного времени поддерживать риккетсии в лабораторных условиях, оценивать их адаптацию к определенным видам переносчиков.

С учетом этого считаем обязательным и используем в работе сочетание классических риккетсиологических и дополнительных методов с использованием живых биотехнологических систем (культур клеток, экспериментальных линий переносчиков) с современными молекулярно — биологическими методами идентификации риккетсий.

В зависимости от задач исследования и объема исследуемого материала используется несколько схем культивирования и идентификации риккетсий. Разработаны новые диагностические подходы, основанные на применении ИФА- и ПЦР-технологий. Разработанная нами методика ПЦР-рестрикционного анализа может быть использована для дифференциации основных видов риккетсий, выявляемых в природных очагах Западной Сибири. Применение рестрикционного анализа с использованием эндонуклеаз (*RsaI* и *PstI*) позволило четко дифференцировать две группы риккетсий: *R. sibirica* и *R. sibirica* subsp. *BJ-90* (патогенных для человека) от геновариантов *R. raoultii* с неустановленной патогенностью на эндемичных и неэндемичных по клещевому риккетсиозу территориях.

Использование иммуноферментного анализа на основе коммерческого диагностикума риккетсиозного Сибирика сухого для РСК позволяет почти вдвое, в сравнении с РСК, повысить эффективность верификации диагноза «клещевой риккетсиоз» за счет повышения чувствительности предложенного теста. Применение одной схемы постановки ИФА с двумя различными конъюгатами позволяет выявлять антитела классов М и G, в отличие от РСК, которая выявляет только суммарные антитела без дифференцирования по классам иммуноглобулинов.

На основе использования указанных методов был разработан алгоритм детекции и идентификации риккетсий группы КПЛ в клиническом и полевом материале, что способствует более ранней и эффективной верификации диагнозов и более раннему и целенаправленному лечению больных инфекциями, передающимися иксодовыми клещами. С учетом имеющихся на сегодня фактических данных для выделения преобладающих в клещах риккетсий видов *R. raoultii* и *R. tarasevichiae* наиболее приемлемы культуры клеток Vero, для вы-

деления основных патогенных видов риккетсий (*R. sibirica*, *R. conorii*, *R. heilongjiangensis*) — биопроба на морских свинках и (или) куриных эмбрионах.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований получены новые научные данные, свидетельствующие о широком распространении в Сибири и на Дальнем Востоке новых видов арбориккетсий (риккетсий, экологически связанных с иксодовыми клещами).

2. Установлено, что наряду с традиционно известным видом риккетсий группы КПЛ — *Rickettsia sibirica* — возбудителем клещевого риккетсиоза, в России и Казахстане с иксодовыми клещами связаны новые для науки виды риккетсий: *Rickettsia tarasevichiae*, *R. raoultii*, новые для России и указанных регионов виды: *R. slovacae*, *R. heilongjiangensis*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, а также новые представители порядка *Rickettsiales* — *Anaplasma phagocytophila* (возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза — ГАЧ), *Ehrlichia muris* (предполагаемый агент моноцитарного эрлихиоза человека — МЭЧ), *Anaplasma sp. Omsk* и *Anaplasma bovis* (агенты анаплазмоза крупного рогатого скота).

3. Анализ распространения риккетсий группы КПЛ показал их тесные экологические связи с определенными видами переносчиков. В целом выявлено распространение на территориях России и Казахстана более 15 клещевых альфа1-протеобактерий. Выделены с помощью культур клеток Vero и клещевых моделей, идентифицированы и депонированы во Всероссийском музее риккетсиальных культур уникальные штаммы *Rickettsiales* новых генотипов.

4. На Дальнем Востоке РФ в ареале *R. sibirica* ретроспективно выявлены заболевания, вызванные *R. heilongjiangensis*, в Пермском крае — *R. helvetica*. На одних и тех же территориях выявляют несколько видов патогенных риккетсий — на Дальнем Востоке, в Алтайском и Красноярском краях — *R. sibirica*, *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii*, в западной части нозоареала КР — *R. sibirica*, *R. slovacae*, *R. raoultii*, на юге (Ставропольский край, Астраханская область — *Rickettsia conorii subsp. caspiensis*, *R. slovacae*, *R. raoultii*, *R. aeschlimannii*.

5. Полученные результаты являются обоснованием необходимости организации дифференциальной лабораторной диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в условиях сочетанности природных очагов, для оптимизации этиотропной терапии, а так же упорядочения регистрации заболеваний в статистических формах отчетности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Выявление геноварианта *R. aeschlimannii* в клещах *Hyalomma marginatum marginatum*, собранных в очаге Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Ставропольском крае / С.Н. Шпынов [и др.] // Омский научный вестник. — 2006. — № 1 (35). — С. 101 — 103.

2. Выявление новых генотипов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки на юге Урала, в Сибири, на Дальнем Востоке и в Казахстане / С.Н. Шпынов [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2005. — № 1. — С. 23 — 27.

3. Генетическая идентификация риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки, изолированных в очагах клещевого риккетсиоза / С.Н. Шпынов [и др.] // Журн. микробиол. — 2004. — № 5. — С. 43 — 48.

4. Микроорганизмы порядка *Rickettsiales* у таежного клеща (*Ixodes persulcatus* sch.) в Предуралье / В.В. Нефедова [и др.] // Вестник РАМН, 2008. — № 7. — С. 47 — 50.

5. Павловский Е.Н. Работы по паразитологии в ВИЭМ (К 50-летию Всесоюзного института экспериментальной медицины им. А.М. Горького) // Мед. паразитол. — 1941. — Т. 10, № 1. — С. 137 — 138.

6. Первое выявление *Rickettsia heilongjiangensis* в клещах *Haemaphysalis concinna* в России / С.Н. Шпынов [и др.] // ЗНиСО. — 2003. — № 12 (129). — С. 16 — 20.

7. Рудаков Н.В., Решетникова Т.А., Шпынов С.Н. М.С. Шайман — основатель Омской школы риккетсиологов // Актуальные вопросы здоровья населения Сибири: гиг. и эпид. аспекты (материалы 6 межрег. научно-практ. конф.). — Омск, 2006. — С. 10 — 13.

8. С.Н. Шпынов [и др.] Новые данные о распространении *Rickettsia slovacae* в Евразии // Природноочаговые болезни человека: Республ. сб. научных работ, посвященный 80-летию Омского НИИПИ. — Омск, 2001. — С. 80 — 83.

9. Тарасевич И.В. Астраханская пятнистая лихорадка. — М.: Медицина, 2002. — 176 с.

10. «Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*» in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia / S. Shpynov [et al.] // Ann. NY Acad. Sci., 2003. — Vol. 990. — *Rickettsiology: present and future directions*. — P. 162 — 172.

11. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far / O. Medianikov [et al.] // East. Emerg. Infect. Dis. — 2004. — Vol. 10 (5). — P. 810 — 817.

12. Brezina R.J., Rehacek J., Majorska M. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification // Acta virol. — 1969. — Vol. 13. — P. 142 — 145.

13. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia / S. Shpynov [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1078 century of rickettsiology (emerging, reemerging rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses). — P. 378 — 383.

14. Detection of *Rickettsia* Closely Related to *Rickettsia aeschlimannii*, «*Rickettsia heilongjiangensis*», *Rickettsia sp.* Strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in Ticks Collected in Russia and Kazakhstan / S. Shpynov

[et al.] // Journal of Clinical microbiology. — 2004. — Vol. 42, N 5. — P. 2221 — 2223.

15. Ecology and molecular epidemiology of tick-borne rickettsioses with natural foci in Russia and Kazakhstan / N. Rudakov [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 1078: century of rickettsiology (emerging, reemerging rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses). — P. 299 — 304.

16. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of Rickettsia heilongjiangensis sp. nov. / P.-E. Fournier [et al.] // J. Clin. Microbiol., 2003. — Vol. 41, N 12. — P. 5456 — 5465.

17. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan / P.E. Fournier [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Jun; Vol. 40 (6). — P. 2176 — 2181.

18. Methods of isolation and cultivation of rickettsiae of «new genotypes» from nozoarea of the north asian tick typhus in Siberia / I.E. Samoylenko [et al.] // 4th int. conf. on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Logrono (La Rioja), Spain. — 2005. — P. 185.

19. New Rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union / E. Rydkina [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 1999. — Vol. 5. — P. 811 — 814.

20. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia, and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila / J.S. Dumler [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — Vol. 51. — P. 2145 — 2165.

21. Rickettsia asiatica sp. nov., isolated in Japan / H. Fujita [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006. — Oct; Vol. 56 (Pt 10). — P. 2365 — 2368.

22. Rickettsia raoultii sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with Dermacentor ticks in Europe and Russia / O. Mediannikov [et al.] // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2008. — Vol. 58. — P. 1635 — 1639.

23. Rickettsia tamurae sp. nov., isolated from Amblyomma testudinarium ticks / P.E. Fournier [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006. — Jul; Vol. 56 (Pt 7). — P. 1673 — 1675.

24. Rickettsioses studies. Natural foci of rickettsioses in the Armenian Soviet Socialist Republic / I.V. Tarasevich [et al.] // Bull. World Hlth. Org. — 1976. — Vol. 53, N 1. — P. 25 — 30.

25. Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia / S.N. Shpynov [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2006. — Vol. 74 (3). — P. 440 — 443.

26. Stothard D.R., Fuerst P.A. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of Rickettsia using 16S rRNA gene sequences // Syst. Appl. Microbiol. — 1998. — Vol. 18. — P. 52 — 61.

27. Studies of a «new» rickettsiosis «Astraktan» spotted fever / I.V. Tarasevich [et al.] // Eur. J. Epidemiol. — 1991. — Vol. 7. — P. 294 — 298.

28. Tarasevich I.V., Makarova V.A., Plotnikova L.F. Studies of the antigenic of the newly isolated strains of Rickettsiae and their relation to spotted fever group // Folia microbiol. — 1976. — Vol. 21, N 6. — P. 503 — 504.

Сведения об авторах

Рудаков Николай Викторович — д.м.н., профессор, директор ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Омской государственной медицинской академии (644080, г. Омск, проспект Мира, 9; e-mail: rickettsia@mail.ru)

Шпынов Станислав Николаевич — д.м.н., ученый секретарь, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (644080, г. Омск, проспект Мира, 7; тел. (3812) 62-93-29, факс 65-16-33; e-mail: stan63@inbox.ru)

Ястребов Владимир Константинович — д.м.н., заместитель директора по научной работе, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Самойленко Ирина Евгеньевна — к.м.н., в.н.с. лаборатории зоонозных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (e-mail: irinasam59@mail.ru)

Кумпан Людмила Валерьевна — к.м.н., с.н.с. лаборатории зоонозных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Решетникова Татьяна Александровна — к.м.н., с.н.с. лаборатории зоонозных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Абрамова Наталья Валерьевна — с.н.с. лаборатории зоонозных инфекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Коломеец Анна Николаевна — к.м.н., врач-бактериолог Сибирского федерального окружного центра СПИД, ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

Е.Д. Савилов

ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Институт эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)
Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)

В настоящее время эволюция эпидемического процесса находится под активным воздействием нового регулирующего фактора риска — техногенного загрязнения окружающей среды. Негативное воздействие экологического прессинга на клинико-эпидемиологические проявления инфекционных заболеваний реализуется в дестабилизации эпидемического процесса, утяжелении инфекционного процесса, а также в снижении иммунологической и эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики детского населения. Показано, что наиболее уязвимым звеном в единой цепи эпидемического процесса является минимальный период инфекционной заболеваемости. В эпидемиологическом эксперименте показано, что при управлении инфекционной заболеваемостью комплекс профилактических мероприятий необходимо активизировать в период минимального уровня развития эпидемического процесса в его внутригодовой динамике.

Ключевые слова: эпидемический процесс, инфекционная патология, техногенное загрязнение окружающей среды, эволюция

EPIDEMIC PROCESS IN MODERN CONDITIONS

E.D. Savilov

Institute of Epidemiology and Microbiology of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction SB RAMS, Irkutsk
Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

Nowadays the evolution of epidemic process is under active influence of a new adjusting risk factor — technogenic environmental contamination. Negative influence of ecological pressure on manifestations of infectious diseases is realized in destabilization of epidemic process: significantly higher level of incidence, greater amplitude of its fluctuations around a trendline and shortening cyclic componenta. Besides this, the more heavy clinical manifestations of infectious process and its longer duration with simultaneous development of the complications, accompanying diseases and synchronization of process takes place. Decrease of immunological and epidemiological effectiveness of vaccination is also registered. This paper establishes, that the minimal period of infection incidence is the most vulnerable part in a uniform circuit of epidemic process. It is shown in epidemiological experiment that the complex of preventive actions at management of infection incidence is necessary for making active during a minimum level of development of epidemic process in its intraannual dynamics.

Key words: infectious diseases, technogenic environmental contamination, epidemic process

Успехи, достигнутые в борьбе с инфекционными болезнями в 20-м веке, привели к тому, что еще относительно недавно казалось, будто эпидемиология в значительной мере решила все основные задачи, стоящие перед ней и приближается к своей изначально объявленной исторической цели по ликвидации инфекционных болезней. Однако в настоящее время указанная эйфория прошла, и вместо нее пришло осознанное понимание того, что инфекционные болезни не только не утратили своей актуальности, но все еще представляют реальную угрозу для здоровья человека.

По мнению многих исследователей, ведущими причинами возникновения «новых» инфекций, роста заболеваемости, изменения характера течения известных болезней являются влияние антропогенных факторов, изменение образа жизни человека, внедрение в повседневную жизнь новых технологий [5]. В этой связи следует отметить, что все названные выше факторы риска, как и многие другие здесь не названные, полностью укладываются в активно формирующуюся в последние годы парадигму под условным названием «глоба-

лизация — инфекционные болезни». Н.И. Брико и В.И. Покровский [2] показывают, что глобализация меняет существо эпидемического процесса, влияет на все его составные элементы, в ряде случаев существенно ускоряя появление и распространение инфекционных болезней, что является наиболее характерной особенностью настоящего времени.

Исходя из высказанных положений, **целью** настоящего сообщения является обобщение многолетних комплексных исследований по изучению эволюции эпидемического процесса (ЭП) в современную эпоху всеобщей глобализации.

Сравнительные эпидемиологические исследования в указанном направлении проведены в основном в двух промышленных городах Иркутской области — Ангарске и Иркутске, которые, являясь городами-соседями, на период исследования значительно отличались как уровнем, так и качественным составом техногенных загрязнителей. Проведенная гигиеническая оценка позволила отнести город Ангарск к экологически неблагополучной территории, а Иркутск к территории сравнения. Об этом же свидетельствует анализ иммунного ста-

туса и адаптационных состояний макроорганизма, проведенный в указанных городах [9]. Кроме этого часть исследований проведена и в других промышленных городах Сибири.

Первый раздел представленного сообщения посвящен сравнительной характеристике многолетней динамики инфекционной заболеваемости на опытной и контрольной территориях при ее «естественном» движении [8, 9, 12]. Такое проявление заболеваемости зависит преимущественно от инфекционно-иммунологических отношений и оцениваемого воздействия экологического (антропогенного) фактора риска. При управляемых средствами иммунопрофилактики инфекциях проявления заболеваемости связаны и зависят, в первую очередь, от проводимой иммунизации, в связи с чем указанная группа патологии не учитывалась при указанном анализе.

Многолетнее движение заболеваемости было изучено для следующих эпидемиологически значимых групп и (или) нозологических форм инфекционной патологии: острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ), краснушная инфекция, острые вирусные гепатиты А, В и С (ВГА, ВГВ, ВГС), дизентерия Зонне, дизентерия Флекснера, сальмонеллез. Сравнительный анализ заболеваемости для краснушной инфекции и вирусных гепатитов А и В представлен до начала массовой вакцинопрофилактики.

Многолетний анализ движения инфекционной заболеваемости, протекающей в естественных условиях, позволил разделить проанализированные виды инфекционной патологии на две группы.

Первая группа. Инфекционные заболевания, имеющие выраженные отличия в своем многолетнем движении на сравниваемых территориях (ОРВИ, краснушная инфекция, ВГА, дизентерия Зонне).

Вторая группа. Инфекционные заболевания, имеющие близкие (практически синхронизированные) распределения динамических рядов на сравниваемых территориях (ВГВ, ВГС, дизентерия Флекснера, сальмонеллез).

Что же разделяет две выделенные группы? С эпидемиологических позиций очевидно, что инфекционные заболевания из первой группы обладают выраженным синусоидальным ритмом (сезонность и цикличность). Во второй группе эта эпидемиологическая особенность проявляется в значительно меньшей степени.

Сравнение многолетней динамики ЭП показало, что при всех формах инфекционной патологии с выраженными ритмическими проявлениями заболеваемости (первая группа) имеют место значимые различия с более высокими ее показателями в городе с неблагоприятной экологической обстановкой. Другой особенностью рассматриваемой группы инфекционной заболеваемости в Ангарске является ее меньшая стабильность по сравнению с Иркутском. Нестабильность ЭП в экологически неблагоприятных условиях проявляется укорочением циклов и значительно большей амплитудой

колебаний относительно линии тренда в годы циклических подъемов заболеваемости.

Для второй группы инфекционной патологии, которая не обладает выраженными ритмическими колебаниями во внутригодовой и многолетней динамике, не было выявлено выраженных отличий в движении заболеваемости между сравниваемыми территориями. Соответствующие многолетние показатели были практически синхронизированы и не отличались по своим уровням.

Выявленные изменения в движении инфекционной заболеваемости в условиях экологического неблагополучия могут быть объяснены снижением неспецифической резистентности организма в виде угнетения иммунных реакций и проявлением состояния напряжения адаптации под действием комплекса ксенобиотиков [6, 7, 9], что в свою очередь способствует дестабилизации циклической компоненты ЭП.

Иное распределение заболеваемости имеет место при инфекционных заболеваниях с многолетними циклическими проявлениями, которые находятся под активным воздействием иммунопрофилактики (корь и коклюш). Сопоставление уровней совокупной заболеваемости между сравниваемыми территориями не выявило достоверных различий при кори, а при коклюше установлен более высокий ее уровень ($p < 0,02$) в городе с неблагоприятной экологической обстановкой. Вместе с тем, проявления цикличности указанных заболеваний в Ангарске и Иркутске были упорядочены и практически не отличались между сравниваемыми территориями [9].

Выявленные различия с движением заболеваемости, протекающей в естественных условиях, могут быть объяснены тем, что проявления заболеваемости при управляемых инфекциях находятся, прежде всего, под активным воздействием иммунопрофилактики. Влияние других условий и факторов риска, оказывающих влияние на ЭП, затухает на фоне указанного специфического противоэпидемического мероприятия.

Следующий раздел представленного сообщения посвящен воздействию техногенных факторов риска на проявления инфекционного процесса, который согласно современным представлениям является важнейшей подсистемой эпидемического процесса [13]. Указанные исследования были проведены по единой схеме у детского и взрослого населения для следующих видов инфекционной патологии: ОРВИ, различные виды вирусных гепатитов, дизентерия Зонне и Флекснера, сальмонеллез, коклюш, дифтерия, туберкулез и внутрибольничные инфекции.

Основные итоги изучения клинических проявлений инфекционной патологии на исследуемых территориях могут быть сведены в следующем обобщенном положении. Техногенное загрязнение атмосферного воздуха приводит к утяжелению клинического течения инфекционного процесса, большей его длительности, к более частому развитию осложнений, хронизации процесса,

увеличению сопутствующих заболеваний и удлинению сроков реконвалесценции [9]. Указанные клинико-эпидемиологические особенности были выявлены как между различными городами, так и у больных из разных районов одного города, характеризующихся различными уровнями загрязнения атмосферного воздуха. Последний подход имеет важное методическое значение в связи с тем, что в этом случае все больные «проходили» через один стационар, через одни врачебные руки, при этом загрязнение атмосферного воздуха носило не качественные, а лишь количественные отличия.

Другой важнейшей компонентой ЭП является возбудитель заболевания. При изучении биологических свойств паразита (острые кишечные и внутрибольничные инфекции) показано, что в условиях экологического неблагополучия имеет место достоверное увеличение доли штаммов с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам [1, 3, 9].

Итак, мы рассмотрели в единой связке влияние техногенного загрязнения окружающей среды на проявления эпидемического и инфекционного процессов. Исходя из логики рассматриваемого материала, в эту двуединую общность требуется включить и вакцинальный процесс. Указанные исследования проведены в Ангарске, Иркутске, Чите и включали в себя такие управляемые инфекционные заболевания как дифтерия, столбняк, корь, коклюш, краснуха, полиомиелит и ВГА.

Исследования коллективного иммунитета у привитых детей показали, что в возрастной группе лиц школьного возраста в экологически неблагоприятных условиях уровень специфических антител ко всем изученным управляемым инфекциям оказался достоверно ниже, чем в группе сравнения. Следует также отметить, что в районах с неблагоприятной экологической обстановкой имеет место выраженный рост числа привитых детей, не имеющих антител к соответствующим инфекциям. Выявленные изменения показателей коллективного иммунитета детского населения в условиях высокого уровня техногенного загрязнения атмосферного воздуха, приводят к снижению эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики кори и коклюша [9, 12].

А теперь зададимся вопросом, а есть ли в единой цепи ЭП некая «болевая точка», на которую техногенное загрязнение окружающей среды оказывает наиболее выраженное воздействие.

Ответ на этот вопрос был получен при анализе заболеваемости в двух районах крупного промышленного города Восточной Сибири (г. Усолье-Сибирское), которые отличались друг от друга лишь уровнем техногенного загрязнения атмосферного воздуха. Были проанализированы многолетние показатели десяти наиболее распространенных нозологических форм или групп инфекционной патологии с различными механизмами передачи и с наличием выраженного синусоидального ритма во внутригодовой динамике.

Проведенные исследования выявили прямую зависимость между степенью загрязнения ат-

мосферного воздуха и многолетними уровнями заболеваемости. Наиболее выраженные различия ($p = 0,01$, непараметрический критерий знаков) обнаружены на уровне минимальной интенсивности ЭП, который рассчитан для каждой нозологической единицы как средний показатель из двух месяцев минимальной заболеваемости для каждого отдельного года с дальнейшим вычислением средней в целом за весь период наблюдения (11 лет). В этот период в более загрязненном районе отмечался однонаправленный рост инфекционной заболеваемости для всех нозологических форм [9, 10, 12]. Различия в уровнях заболеваемости в другие эпидемические периоды года (предсезонный и сезонный периоды, как и, соответственно, годовые показатели) были выявлены лишь на уровне тенденций или не проявлялись вовсе.

Выявленная «болевая точка» в развитии ЭП в условиях техногенного загрязнения окружающей среды, которая пришлась на внутригодовую минимальную интенсивность инфекционной заболеваемости, позволила нам выдвинуть положение о наибольшей «уязвимости» эпидемического процесса в период его минимального развития [9–12].

Выдвинутое положение основано на анализе саморегулирующих механизмов биологической системы, связанных с внутривидовым биологическим разнообразием. Понятно, что для оценки развития эпидемического процесса определяющим является именно внутривидовая гетерогенность или фенотипическое разнообразие популяции паразита и (или) хозяина.

Анализ биологической литературы свидетельствует, что устойчивость биосистем повышается с увеличением их сложности и разнообразия, а наименьшая их стабильность приходится на период минимальной внутривидовой неоднородности. Об этом же свидетельствуют основные положения, выдвинутые при оценке устойчивости паразитарных систем в зависимости от их сложности и, прежде всего, от иерархической организации, которая играет важнейшую роль в рассматриваемой биологической системе для всех классов инфекций.

Таким образом, минимальное разнообразие соответствует наименьшей стабильности биосистем. Ниже этого уровня разнообразия находится некий критический уровень, достижение которого приведет систему к разрушению [4]. Поэтому при воздействии экзогенных и (или) эндогенных факторов, направленных на уменьшение разнообразия, вступают в действие защитные механизмы, которые препятствуют достижению биологической системы критического уровня, и вновь выводят ее в колебательный режим.

Проведенные нами эпидемиологические исследования на модели дизентерии позволили добавить к приведенному выше обобщению более частные формулировки, расширяющие наше понимание критического (уязвимого) периода в развитии эпидемического процесса [9–12]. Конечные выводы этого анализа могут быть сведены в трех кратких положениях:

1) предпосылки сезонной заболеваемости формируются в период ее минимального развития;

2) активизация механизма передачи обеспечивается природно-климатическими факторами в предсезонный период;

3) сезонный подъем заболеваемости является следствием реализованных закономерностей предшествующих эпидемических периодов года.

Таким образом, анализ функционирования биологических систем и эпидемиологических исследований позволил предположить, что межсезонный и межэпидемический периоды являются наиболее «уязвимыми» в развитии ЭП. Отсюда следует, что оптимальным временем активного воздействия на указанную систему является период минимальной заболеваемости.

Для проверки выдвинутого положения в пяти городах Восточной Сибири был проведен эпидемиологический эксперимент, в котором интенсификация специфических профилактических мероприятий пришлось на период минимальной инфекционной заболеваемости в ее внутригодовом движении. В качестве модели была выбрана дизентерия, для специфической профилактики которой был использован поливалентный дизентерийный бактериофаг. Фагопрофилактика проводилась в течение двух месяцев минимальной заболеваемости. Само мероприятие было проведено в «организованных» детских дошкольных коллективах, т.е. в основных возрастных группах риска этого инфекционного заболевания [9, 10, 12]. В этом месте еще раз подчеркну, что указанные исследования проводились в годы с относительно высокими показателями заболеваемости дизентерией, что способствовало получению надежных эпидемиологических выводов.

В результате эксперимента было установлено, что принятые профилактические меры способствуют значимому снижению заболеваемости дизентерией. При этом показано, что это воздействие более эффективно реализовалось при шигеллезе Зонне, по сравнению с дизентерией Флекснера. Таким образом, как это уже и было отмечено выше, инфекции с выраженными многолетними и внутригодовыми циклами более активно реагируют на внешние воздействия. Выявленные особенности в движении заболеваемости с различными проявлениями сезонности (цикличности) могут быть связаны с тем, что в паразитарной системе эпидемического процесса при инфекциях с ярким наличием синусоидальных колебаний имеются выраженные изменения уровня гетерогенности как у паразита, так и у хозяина. В свою очередь у инфекций со слабовыраженными ритмами колебания гетерогенности были незначительными и не имели связи с внутригодовой динамикой заболеваемости [9, 12].

Таким образом, влияние техногенного загрязнения окружающей среды, как и других факторов малой интенсивности, проявляется, прежде всего, в период наибольшей уязвимости ЭП, что соответствует периоду его минимального раз-

вития. Как выше уже отмечалось, предпосылки сезонной заболеваемости формируются в период ее минимального уровня. Следовательно, незначительное повышение заболеваемости в месяцы минимальной интенсивности ЭП способствует выраженному росту инфекционной заболеваемости, который реализуется, прежде всего, в ее сезонный подъем.

Приведенные в настоящем сообщении данные могут свидетельствовать о том, что неблагоприятная экологическая обстановка, сложившаяся в России в последние годы, без сомнения, является одной из причин ухудшения эпидемиологической ситуации. Ни в коей мере не преувеличивая значимость рассматриваемого фактора риска в ряду других социальных факторов, следует все же отметить наличие прямой связи экологического неблагополучия с изменениями эпидемического, инфекционного и вакцинального процессов.

Завершая представленный материал, можно заключить, что:

- в настоящее время ЭП находится под активным воздействием нового регулирующего фактора риска — техногенного загрязнения окружающей среды;
- негативное воздействие экологического прессинга на клинико-эпидемиологические проявления инфекционных заболеваний реализуются в дестабилизации ЭП, утяжелении инфекционного процесса, а также в снижении иммунологической и эпидемиологической эффективности вакцинопрофилактики детского населения;
- наиболее слабым и, соответственно, наиболее уязвимым звеном в единой цепи эпидемического процесса, является минимальный период инфекционной заболеваемости;
- при управлении инфекционной заболеваемостью комплекс профилактических мероприятий необходимо активизировать в период минимального уровня развития эпидемического процесса в его многолетней и (или) внутригодовой динамике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антибиотикорезистентность микроорганизмов, выделенных от госпитализированных больных на различных территориях / Е.В. Анганова [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2003. — Т. 33. — С. 105—110.
2. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 4. — С. 4—10.
3. Владимирова Н.И. Эпидемиология внутрибольничных инфекций (концепция санитарно-эпидемиологического надзора). — Иркутск, 2003. — 225 с.
4. Емельянов И.Г. Разнообразие и устойчивость биосистем // Успехи современной биологии. — 1994. — Т. 114, вып. 3. — С. 304—318.
5. Малеев В.В. Проблемы инфекционной патологии на современном этапе // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2006. — № 4. — С. 11—14.

6. Савилов Е.Д., Выборова С.А. Состояние адаптации как показатель здоровья // Гигиена и санитария. — 2006. — № 3. — С. 7–8.

7. Савилов Е.Д., Жданова С.Н., Савилова Е.Е. Использование адаптационных реакций в качестве критерия оценки состояния здоровья // Гигиена и санитария. — 2002. — № 4. — С. 72–73.

8. Савилов Е.Д., Ильина С.В., Брико Н.И. Проявления инфекционной заболеваемости в условиях экологического неблагополучия // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2009. — № 5. — С. 34–38.

9. Савилов Е.Д., Ильина С.В. Инфекционная патология в условиях техногенного загрязнения окружающей среды: клинико-эпидемиологические исследования. — Новосибирск: Наука, 2009. — 248 с.

10. Савилов Е.Д. Теоретические аспекты управления инфекционной заболеваемостью в условиях техногенного загрязнения окружающей среды // Бюл. СО РАМН. — 2008. — Т. 1 (129). — С. 43–46.

11. Савилов Е.Д. Устойчивость эпидемического процесса с позиций биологической системы // Вестн. Российской академии медицинских наук. — 1997. — № 8. — С. 29–32.

12. Савилов Е.Д. Эволюция эпидемического процесса в современных условиях // Вестн. Российской академии медицинских наук. — 2011. — № 3. — С. 14–18.

13. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. — М.: Медицина, 2001. — 560 с.

Сведения об авторе

Савилов Евгений Дмитриевич — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии ИГМАПО, проректор по научной и лечебной работе ИГМАПО (Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел. 33-34-23; e-mail: sailov47@gmail.com)

В.С. Семечкина, Е.Ю. Зоркальцева, О.А. Воробьева

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРЕССИНГ КАК ФАКТОР РИСКА ФОРМИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ*Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)*

На территории Иркутской области наблюдается напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу. Ухудшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу способствуют многие факторы. В том числе нельзя не учитывать и роль техногенной нагрузки, т. к. в Иркутской области сосредоточено значительное количество промышленных отраслей. Целью исследования явилось изучение проявления эпидемического процесса при туберкулезе легких в условиях техногенного загрязнения окружающей среды крупных промышленных городов Восточной Сибири. Было выявлено, что загрязнение атмосферного воздуха экоплютантами оказывает выраженное влияние на формирование неблагоприятной эпидемиологической ситуации по туберкулезу органов дыхания наряду с недостатками организации работы по раннему выявлению больных туберкулезом.

Ключевые слова: туберкулез, техногенное загрязнение, эпидемиологическая обстановка

ECO-PRESSING AS A RISK FACTOR OF UNWHOLESOME TUBERCULOSIS EPIDEMIOLOGICAL DEVELOPMENT

V.S. Semechkina, E.U. Zorkaltsewa, O.A. Vorobiova

Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk

Contrary tuberculosis epidemiology in the Irkutsk region is observed. There are a lot of factors underlain of this situation. Because of the Irkutsk region comprises a large amount of industrial sectors, we cannot ignore the role of anthropogenic impact. The aim of the research was to study how epidemic process of pulmonary tuberculosis could manifest in conditions of technogenic pollution in large industrial cities in the Eastern Siberia. It was found that air pollution strongly effects to the formation of unfavorable respiratory tuberculosis epidemiology.

Key words: tuberculosis, industrial pollution, epidemiology

По-прежнему наблюдается рост эпидемиологических показателей, отражающих распространенность туберкулезной инфекции. На отдельных территориях Российской Федерации и, прежде всего, в Сибирском и Дальневосточном Федеральных округах заболеваемость туберкулезом перешла на новый уровень, характеризующийся эпидемическим распространением заболевания [1, 4].

Подъем заболеваемости туберкулезом обусловлен различными условиями: увеличением доли больных ВИЧ-инфекцией, ростом первичной лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам, недостатками организации работы по активному выявлению больных туберкулезом и многими другими факторами риска. В связи с этим следует отметить, что немаловажную роль в создании неблагоприятной эпидемиологической ситуации по туберкулезу играет экологическая напряженность многих территорий. Указанный фактор риска может играть весьма существенную роль, т.к. представляет собой глобальную проблему [2, 3, 5, 6].

Цель исследования — изучение проявления эпидемического процесса при туберкулезе легких в условиях техногенного загрязнения окружающей среды крупных промышленных городов Восточной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ основных эпидемиологических показателей был ограничен территориями промышленных городов: Иркутска, Ангарска,

Шелехова. В качестве территории сравнения был рассмотрен Иркутский сельский район (ИСР), относящийся к сельской местности, имеющий преимущественно аграрный профиль и удаленный от основных промышленных зон области, более того ИСР не входит в перечень территорий с интенсивным загрязнением атмосферы примесями, концентрации которых превышают ПДК. При этом все рассматриваемые территории находятся в непосредственной близости друг от друга и имеют равный уровень качества оказания медицинской помощи.

Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости, распространенности, смертности от туберкулеза населения Иркутской области проводился за период с 2000 по 2009 гг. по материалам конъюнктурных обзоров «Состояние противотуберкулезной помощи населению Иркутской области».

Оценка загрязнения атмосферного воздуха изучаемых зон проводилась по данным Государственных докладов «О состоянии окружающей природной среды Иркутской области» за период с 2005 по 2009 гг.

Для статистической обработки материалов исследования использовался пакет статистических программ Statistica 6.0. Проводился расчет относительных показателей, средних величин, многолетней динамики и тенденции заболеваемости и др. Достоверность различий оценивалась с помощью параметрических (t-критерий Стьюдента), много-

мерных (дискриминантный анализ, Т-критерий Хотеллинга) методов. Оценка зависимости между характеристиками эпидемического процесса и техногенным загрязнением окружающей среды проводилась с использованием корреляционного анализа по Спирмену, результаты представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексный анализ состояния загрязнения атмосферного воздуха промышленных территорий показал, что изучаемые города имеют разный уровень техногенного загрязнения. В городе Иркутске на протяжении ряда последних лет фиксируется очень высокий уровень загрязнения атмосферы, в то время как в Шелехове и Ангарске — высокий. Однако уровень загрязнения воздушного бассейна Шелехова несопоставим с таковым Ангарска, что проявляется наличием в первом большого количества специфических загрязнителей, высоких концентраций приоритетных примесей, небольшой площади города, а также высокого уровня неканцерогенного риска опасности на органы дыхания ($HI = 7,8$). Таким образом, ксенобиотический пресинг, наблюдающийся на территории Шелехова, сопоставим с таковым в городе Иркутске, в котором регистрируются высокие уровни концентраций приоритетных ксенобиотиков (бенз(а)пирен, формальдегид, СО и др.) и неканцерогенного риска опасности на органы дыхания ($HI = 7,4$).

Территория Ангарска также относится к территориям экологического риска, однако, учитывая более низкие концентрации примесей в атмосфере этого города, по сравнению с Иркутском и Шелеховом, сравнительно низкий риск по патологии органов дыхания ($HI = 3,9$) дает возможность отнести Ангарск к более благополучным территориям, нежели Иркутск и Шелехов. Одним из основных показателей, характеризующих эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу, является показатель заболеваемости.

На территории г. Шелехова регистрируется отрицательный темп прироста, однако исходные показатели этого района имеют низкую степень соответствия прямолинейной трендовой модели, что может быть связано с выраженной нестабильностью эпидемического процесса на этой территории. Более того, уровень данного показателя в Шелехове занимает высокие позиции, наряду с Иркутском и ИСР, и не имеет значимых различий с этими территориями. В Ангарске уровень заболеваемости оказался значимо ниже вышеперечисленных групп ($p = 0,02$).

Тем не менее, судить о влиянии экологического фактора на заболеваемость ТОД в сложившейся ситуации не представляется возможным, поскольку этот показатель является комплексным индикатором и во многом зависит от уровня организации выявления больных туберкулезом. В связи с этим были проанализированы такие показатели, как уровень охвата населения профилактическими

флюорографическими осмотрами (ФЛГ-осмотры) и частота выявления больных туберкулезом легких при проведении профилактических ФЛГ-осмотров. Было выявлено, что на территориях ИСР и Ангарска уровень охвата населения профилактическими ФЛГ осмотрами находится на низком уровне ($41,0 \pm 6,1$ и $48,3 \pm 1,6$ % соответственно), что значимо отличает данные группы от групп городов Иркутска и Шелехова ($66,3 \pm 0,9$ и $61,6 \pm 2,6$ % соответственно; $p = 0,005$). На сельской территории (район сравнения) был зарегистрирован самый низкий уровень выявления больных при проведении профилактических ФЛГ-осмотров ($31,5 \pm 3,8$ %; $p = 0,0003$ (г. Иркутск), $p = 0,02$ (г. Шелехов), $p = 0,01$ (г. Ангарск)).

Одним из значимых индикаторов своевременного выявления больных туберкулезом является также доля ФКТ (фиброзно-кавернозного туберкулеза) и очагового туберкулеза легких в клинической структуре вновь выявленных пациентов. Проведенный дискриминантный анализ клинических форм туберкулеза органов дыхания у вновь выявленных больных показал, что мощность дискриминации близка к 1 ($N = 40$; WILKS LAMBDA = 0,055; $F(21; 86) = 7,2$; $p < 0,00001$). Наиболее информативными признаками в модели были такие формы, как ФКТ ($p = 0,00001$; $F = 13,4$), очаговый туберкулез ($p = 0,0002$; $F = 9,1$), ТВГЛУ ($p = 0,008$; $F = 4,7$), казеозная пневмония ($p = 0,03$; $F = 3,3$) и прочие формы ($p = 0,003$; $F = 6,0$). Было выявлено, что на территориях, имеющих низкий уровень охвата населения профилактическими ФЛГ-осмотрами (ИСР и Ангарск), имеются различия в формах ТОД, несущих информативность в модели. Так, для ИСР имеют место существенно более высокие показатели ФКТ ($8,52 \pm 1,21$ %, Иркутск ($4,57 \pm 0,49$ %) — $p = 0,007$; Шелехов ($2,98 \pm 0,49$ %) — $p = 0,0005$; Ангарск ($3,65 \pm 0,51$) — $p = 0,002$) и низкий удельный вес очагового туберкулеза легких ($7,38 \pm 0,88$, Иркутск ($13,13 \pm 0,97$ %) — $p = 0,0003$; Шелехов ($15,11 \pm 2,62$ %) — $p = 0,01$), что указывает на дефекты противотуберкулезных мероприятий. На территории Ангарска доля ФКТ не отличается от других промышленных территорий и значимо ниже уровня такового в ИСР ($p = 0,001$).

Показателем, характеризующим активную часть резервуара туберкулезной инфекции на той или иной территории, является распространенность. Анализ первичных материалов показал, что на территории ИСР такие показатели, как общая распространенность и распространенность ТОД ($398,13 \pm 19,76$ и $339,13 \pm 16,98/100$ тыс. соответственно) значимо выше аналогичных показателей территорий Иркутска ($343,22 \pm 11,81/100$ тыс., $p < 0,05$; $291,53 \pm 12,70/100$ тыс., $p < 0,05$) и Ангарска ($245,30 \pm 10,33/100$ тыс., $p < 0,001$; $229,10 \pm 10,47/100$ тыс., $p < 0,001$). Обратная ситуация обстоит с показателем превалентности контингентов с деструкцией легочной ткани. Значимо высокий уровень данного показателя отмечен в Иркутске ($144,95 \pm 22,01/100$ тыс., $p < 0,01$), Ангарске ($118,33 \pm 16,47/100$ тыс., $p < 0,05$) и Шеле-

хове ($119,28 \pm 18,67/100$ тыс., $p < 0,05$), в то время как в ИСР ($72,10 \pm 9,47/100$ тыс.) этот показатель существенно ниже промышленных территорий, что свидетельствует о хронизации процесса на территориях с неблагоприятной экологической обстановкой.

Одним из объективных критериев, отражающих развитие эпидемического процесса на территориях, является показатель смертности. За рассматриваемый период времени на территориях Иркутска, Ангарска и ИСР наблюдался рост показателя смертности: темп прироста в Иркутске составил 5,5 %, в Ангарске — +9,4 %, в ИСР — +6,2 %. В то же время в Шелехове отмечалось снижение этого показателя (Тпр. = -5,7 %). Тем не менее, анализ первичных данных показал, что средний уровень показателя смертности за указанный период на изучаемых территориях был сопоставим.

Анализ многолетней динамики основных эпидемиологических показателей, проведенный на изучаемых территориях, выявил неоднородность сложившейся ситуации. Как было показано выше, на уровень показателей могут оказывать влияние несколько причин: с одной стороны это дефекты противотуберкулезных мероприятий, а с другой — влияние ксенобиотического прессинга. С целью комплексной оценки основных эпидемиологических показателей и выявления причин неблагоприятной эпидемиологической обстановки произведен дискриминантный анализ. Были рассмотрены основные показатели: общая заболеваемость (X1), заболеваемость ТОД (X2), смертность (X3), охват профилактическими ФЛГ осмотрами (X4), удельный вес выявленных больных при профилактических осмотрах (X5), общая распространенность (X6).

Мощность дискриминации близка к 1 ($N = 7$; $WILKS\ LAMBDA = 0,055$; $F(21; 72) = 6,009$; $p < 0,00001$). В модель были включены все рассмотренные признаки, по которым группы имели различия, а наиболее информативным признаком в модели явился удельный вес выявленных больных при профилактических осмотрах ($p = 0,008$; $F = 4,85$), что свидетельствует о выраженном влиянии противотуберкулезных мероприятий на

эпидемиологические показатели. Также необходимо отметить, что по всем изученным признакам в модели сравниваемые группы наблюдения были различимы, за исключением групп Иркутска и Шелехова, что подтверждает вышеизложенный материал.

Таким образом, на формирование основных эпидемиологических показателей на территориях с различным уровнем экологического неблагополучия оказывают влияние разные факторы риска. Основной вклад вносят воздействия промышленных ксенобиотиков, что находит свое отражение не только в высоких уровнях эпидемиологических показателей, но и в утяжелении клинической структуры за счет высокого удельного веса распространенных форм. На территории с низким уровнем промышленного прессинга на формирование эпидемиологических показателей (заболеваемость, распространенность) основное влияние оказывают дефекты противотуберкулезных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богородская Е.М., Шилова М.В. Эпидемиология туберкулеза в России // Фтизиатрия: национальное руководство; под ред. М.И. Перельмана. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. — 512 с.
2. Савилов Е.Д., Ильина С.В. Инфекционная патология в условиях техногенного загрязнения окружающей среды: клинко-эпидемиологические исследования: монография. — Новосибирск: Наука, 2010. — 248 с.
3. Савилов Е.Д. Техногенное загрязнение окружающей среды — новый фактор риска инфекционной патологии // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2011. — С. 4–8.
4. Урсов И.Г. Смертность от туберкулеза: эпидемиология туберкулеза. — Новосибирск, 1997. — 96 с.
5. Шилова М.В., Глумная Т.В. Влияние сезонных и экологических факторов на заболеваемость туберкулезом // Проблемы туберкулеза. — 2004. — С. 17–21.
6. Яковлев А.А. Экологическое направление в эпидемиологии // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2011. — С. 33–37.

Сведения об авторах

Семечкина Вера Сергеевна — ассистент кафедры туберкулеза ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664049, г. Иркутск, м/н Юбилейный, 16В — 20; тел. 8-964-118-6-112; e-mail: vera-sem@list.ru)

Зоркальцева Елена Юльевна — д.м.н., проф., заведующая кафедрой туберкулеза ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»

Воробьева Ольга Александровна — к.м.н., доцент кафедры туберкулеза ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»

И.А. Соболев ¹, О.Г. Курская ¹, Е.В. Иванова ², А.Г. Дурыманов ¹, Т.Н. Ильичева ¹,
В.Н. Михеев ¹, А.М. Шестопалов ¹

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ГРИППУ НА ЮГЕ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ В 2011–2012 гг.

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)

² Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области (Новосибирск)

В ходе мониторинга гриппа на территории Новосибирской области в течение сезона 2011–2012 гг. на культуре клеток MDCK было выделено 85 штаммов вируса гриппа: 79 штаммов A (H3N2) и 6 штаммов вируса гриппа B (5 штаммов относились к линии Ямагата и 1 штамм принадлежал линии Виктория). За весь эпидемический сезон 2011–2012 гг. на территории Новосибирской области не было выделено ни одного штамма вируса гриппа A (H1N1)pdm09. Для молекулярно-генетического анализа были выбраны 3 штамма вируса гриппа A (H3N2). Была определена полная нуклеотидная последовательность генов NA и HA, кодирующих соответствующие поверхностные гликопротеины вируса гриппа, а также проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей этих белков для исследованных штаммов вируса гриппа A (H3N2), вакцинного штамма A/Victoria/361/2011 и штаммов более ранних сезонов, к которым были получены диагностические сыворотки.

Ключевые слова: вирус гриппа, гемагглютинин, нейраминидаза, молекулярно-генетический анализ

INFLUENZA VIRUS EPIDEMIOLOGICAL SITUATION IN THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA IN 2011–2012

I.A. Sobolev ¹, O.G. Kurskaya ¹, E.V. Ivanova ², A.G. Durymanov ¹, T.N. Ilyicheva ¹,
V.N. Mikhayev ¹, A.M. Shestopalov ¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltzovo, Novosibirsk region

² Federal Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk region, Novosibirsk

In the result of the monitoring for influenza in the Novosibirsk region during the season 2011–2012 85 strains of influenza virus on the culture of MDCK cells were isolated: 79 strains A (H3N2) and 6 strains of influenza virus B (five strains belonged to the Yamagata line and 1 strain belonged to the Victoria line). During the entire epidemic season 2011–2012 on the territory of the Novosibirsk region no strains of influenza A (H1N1) pdm09 were allocated. For molecular genetic analysis 3 strains of influenza A (H3N2) were selected. We determined full nucleotide sequence of NA and HA genes encoding respective surface glycoproteins of influenza virus, as well as the comparative analysis of amino acid sequences of these proteins to the strains of influenza A (H3N2), vaccine strain and the strain A/Victoria/361/2011 earlier seasons, for which diagnostic serum were obtained.

Key words: influenza virus, hemagglutinin, neuraminidase, molecular genetic analysis

ВВЕДЕНИЕ

Грипп — это острое инфекционное заболевание дыхательных путей из группы острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) с высоким уровнем заболеваемости и значительным числом осложнений и летальных исходов среди лиц из «группы риска». Ежегодно в мире гриппом болеют от 3 до 5 млн. человек, нанося большой ущерб здоровью населения и приводя к огромным финансовым затратам на лечение и реабилитацию больных [1]. Грипп вызывает ежегодные подъемы заболеваемости, частые эпидемии и периодические пандемии. Основная причина этого связана со способностью вируса гриппа преодолевать иммунитет, вызванный предшествующей гриппозной инфекцией или вакцинацией, благодаря высокой антигенной изменчивости поверхностных гликопротеинов вируса гриппа. Постоянный антигенный дрейф нейраминидазы и гемагглютинина является причиной частой замены штаммов, используемых для производства вакцины [2]. Пандемические вирусы обычно возникают из рекомбинации между человеческими

штаммами и вирусами животных, в результате которой появляются штаммы с поверхностными белками животного происхождения и внутренними, в основном или полностью, от человеческих штаммов. По мнению экспертов ВОЗ до апреля 2009 г., наиболее выраженным пандемическим потенциалом обладал вирус гриппа птиц A (H5N1). Несмотря на активную подготовку к пандемии, ни один из экспертов не предсказывал появление вируса A (H1N1)pdm09 как возбудителя первой пандемии гриппа двадцать первого столетия [3]. Таким образом, постоянный надзор за гриппом является обязательным мероприятием, необходимым как для расшифровки причин текущих и прогнозирования грядущих эпидемий, так и для проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий, в том числе для обоснованных рекомендаций по ежегодному обновлению состава гриппозных вакцин и при разработке диагностических препаратов.

Целью данной работы явился анализ эпидемиологической ситуации по гриппу в Новосибирской области в 2011–2012 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области».

Мазки из носа и зева. Клинический материал (мазки из носа и зева) от пациентов с диагнозом «острая респираторная вирусная инфекция» получены из лечебно-профилактических учреждений г. Новосибирска, Новосибирской районной больницы № 1 (р.п. Кольцово) и центральной районной больницы Доволенского района Новосибирской области. Образцы поступали в пробирках с транспортной средой, помещенные в термоконтейнер с хладоэлементами или в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Выделение вируса гриппа. Выделение изолятов производили в культуре клеток MDCK линии Лондон путем заражения монослоя клеток. Для этого пробирку с транспортной средой, содержащей образец, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, после чего 200 мкл образца вносили во флакон с суточным монослоем клеток MDCK. Инфицированные культуры инкубировали при температуре 37 °С. Репродукцию вируса контролировали визуально по цитопатическому действию и в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами петуха, гуся, морской свинки и человека группы 0(I)Rh⁻.

Типирование/субтипирование выделенных штаммов и изучение антигенных свойств. Типирование/субтипирование выделенных изолятов вируса гриппа и изучение их антигенных свойств проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по рекомендованной ВОЗ методике [4], используя постинфекционные хорьковые референс-сыворотки, любезно предоставленные Сотрудничающим Центром ВОЗ по гриппу (Атланта, США), а также сыворотку, полученную в результате иммунизации кролика штаммом вируса гриппа А(Н3N2), выделенным на территории Новосибирской области во время эпидемического сезона 2010 – 2011 гг. Данные РТГА подтверждали методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Для этого использовали набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (InfluenzavirusA) и вируса гриппа В (InfluenzavirusB) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенсInfluenzavirusA/B-FL» и набор для типирования (идентификации субтипов Н1N1 и Н3N2) вирусов гриппа А (InfluenzavirusA) «АмплиСенсInfluenzavirusA-тип-FL» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва, Россия).

Обратная транскрипция, амплификация и экстракция отдельных фрагментов генов. Обратная транскрипция для получения кДНК по матрице РНК вируса гриппа осуществлялась с помощью набора Fermentas RevertAid (Fermentas International Inc., Vilnius, Lithuania).

Для амплификации отдельных фрагментов генов, кодирующих поверхностные гликопроте-

ины вируса гриппа использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР) с ген-специфическими праймерами.

Для экстракции наработанных методом ПЦР фрагментов генов, кодирующих нейраминидазу и гемагглютинин исследованных штаммов вируса гриппа А (Н3N2) использовался набор реагентов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden).

Определение и анализ нуклеотидной последовательности. Реакцию секвенирования проводили с использованием набора «BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit» (Applied Biosystems, USA). Амплификация проходила в соответствии с рекомендацией производителя. Очистка продукта происходила набором «BigDye XTerminator Purification Kit» (Applied Biosystems, USA). Анализ продуктов проводился на автоматическом секвенаторе 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems, USA).

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием специализированного программного обеспечения: Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), SeqMan (Lasergene) и специализированных ресурсов Influenza Virus Resource [10] и BLAST (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Анализ аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы BioEdit.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинический материал, представляющий собой мазки из носа и зева, собирался медицинским персоналом лечебно-профилактических учреждений у лиц с симптомами ОРВИ в первые трое суток от начала клинических проявлений. Сбор проб производился в период с декабря 2011 г. по июнь 2012 г. Всего в течение сезона было проанализировано 619 образцов от жителей г. Новосибирска и Новосибирской области. Половозрастная структура выборки представлена в таблице 1.

Всего из полученных образцов при заражении культуры клеток MDCK было выделено 85 штаммов вируса гриппа, из них 6 штаммов (7,1 %) относились к вирусу гриппа типа В, 79 штаммов (92,9 %) относились к вирусу гриппа А(Н3N2). Первый штамм вируса гриппа был выделен у ребенка в январе 2012 г. и относился к вирусу гриппа типа В. Наибольший процент выделения вируса гриппа пришелся на период с 8-й по 12-ю недели, что, по данным ВОЗ, было характерно и для европейского региона в целом. Несмотря на то, что больше половины образцов было собрано от детей (61 % от общего количества пациентов), наибольший процент выделения вируса гриппа отмечался в возрастной группе 18 – 35 лет (27,5 %).

Индикацию наличия вируса в культуральной жидкости производили с помощью реакции гемагглютинации с разными видами эритроцитов: петуха, гуся, морской свинки и человека. Наибольшие титры в РГА у большинства выделенных штаммов наблюдались при использовании эритроцитов человека и морской свинки. Типирование и субтипирование проводили в реакции торможения

Таблица 1

Половозрастная структура выборки

	Всего	Мужчины	Женщины	Младше 18 лет	18–35 лет	36–59 лет	60 лет и старше
г. Новосибирск							
Собранные образцы	511	218	293	350	97	55	9
Выделенные штаммы	75	25	50	36	33	5	1
Новосибирская область							
Собранные образцы	108	37	71	29	34	41	4
Выделенные штаммы	10	4	6	2	3	3	2
Всего							
Собранные образцы	619	255	364	379	131	96	13
Выделенные штаммы	85	29	56	38	36	8	3

гемагглютинации с подтверждением результатов с помощью ПЦР в режиме реального времени.

Из 6 штаммов вируса гриппа В, выделенных в 2011–2012 гг. на территории Новосибирской области, 5 штаммов принадлежат к линии Ямагата и по антигенным свойствам подобны *B/Wisconsin/01/2010*, и только 1 штамм относится к линии Виктория и в антигенном отношении близок к *B/Brisbane/60/2008*, в то время как в течение трех предыдущих эпидемических сезонов на территории Новосибирской области выделялись только штаммы Викторианской линии. Следует отметить, что линии вируса гриппа В (*B/Victoria/2/87* и *B/Yamagata/16/88*), различаются генетически и по антигенным свойствам, и антитела к вирусам одной линии не являются протективными в отношении вирусов другой линии [5].

За весь эпидемический сезон 2011–2012 гг. на территории Новосибирской области не было выделено ни одного штамма вируса гриппа А(Н1N1) pdm09.

Доминирующим во время сезона 2011–2012 гг. на территории Новосибирской области являлся вирус гриппа А(Н3N2). Он составил 92,9 % от всех выделенных штаммов. Серологический анализ антигенных свойств штаммов вируса гриппа А(Н3N2), выделенных на территории Новосибирской области в течение сезона 2011–2012 гг., и сравнение их со штаммами, выделенными за сезон 2010–2011 гг., проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием сывороток к *A/Brisbane/10/2007* (H3N2), *A/Perth/16/2009* (H3N2), *A/Novosibirsk/76k/2011* (H3N2).

Большинство штаммов вируса гриппа А(Н3N2) сезона 2011–2012 гг. проявляют наибольшее сродство с кроличьей сывороткой, полученной на штамм *A/Novosibirsk/76k/2011*. Из 21 проанализированного штамма сезона 2011–2012 гг. у 6 штаммов наблюдалось 4-кратное, а у 4 штаммов – 8-кратное снижение титра в РТГА с сывороткой, полученной на вакцинный штамм *A/Perth/16/2009*. Для сыворотки к *A/Brisbane/10/2007* мы наблюдали отсутствие кроссреактивности со штаммами сезона 2010–2011 гг. и повышение уровня

антигенного сродства к некоторым штаммам сезона 2011–2012 гг. Такие различия в антигенных свойствах выделенных штаммов свидетельствуют об антигеном дрейфе вируса гриппа А(Н3N2) и неполном соответствии штамму, включенному в состав сезонной гриппозной вакцины.

В ходе молекулярно-генетического исследования определена полная нуклеотидная последовательность генов NA и HA, кодирующих соответствующие поверхностные гликопротеины вируса гриппа, а также проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей штаммов вируса гриппа А(Н3N2) *A/Novosibirsk/2D/2012*, *A/Novosibirsk/59D/2012*, *A/Novosibirsk/155/2012*, выделенных на территории Новосибирской области в эпидемический сезон 2011–2012 гг., вакцинного штамма *A/Victoria/361/2011* (H3N2) и штаммов более ранних сезонов, к которым были получены диагностические сыворотки.

По аминокислотному составу белка нейраминидазы исследуемые штаммы эпидемического сезона 2011–2012 гг. отличаются как от более ранних вакцинных штаммов *A/Brisbane/10/2007*, *A/Perth/16/2009* так и от штамма *A/Novosibirsk/76k/2011*, выделенного на территории Новосибирска в эпидемический сезон 2010–2011 гг. и сходны с вакцинным штаммом *A/Victoria/361/2011*. В аминокислотной последовательности нейраминидазы штаммов *A/Novosibirsk/2D/2012*, *A/Novosibirsk/59D/2012* и *A/Novosibirsk/155/2012* обнаружены как уникальные для каждого штамма замены, так и общие, отличающие их от штамма *A/Victoria/361/2011*. Штамм *A/Novosibirsk/155/2012* представляет собой гетерогенную популяцию, т.к. содержит два варианта аминокислоты (S/F) в положении 407 белка нейраминидазы. В целом же, в рамках эпидемического сезона 2011–2012 гг. для первичной структуры нейраминидазы исследованных штаммов характерна высокая степень консервативности.

Одной из задач систематического мониторинга вируса гриппа, циркулирующего в человеческой популяции, является оценка эффективности и целесообразности использования этиотропных хими-

определенных препаратов, применяемых в терапии инфекции, вызываемой вирусом гриппа. В настоящее время в медицинской практике широко применяются ингибиторы нейраминидазы гриппа: озельтамивир, занамивир и перамивир [6, 7]. К сожалению, обнаруживается все больше штаммов вируса гриппа человека, обладающих сниженной чувствительностью к действию этих препаратов. На данный момент известен ряд мутаций в белке NA вируса гриппа А (H3N2), характерных для штаммов, резистентных к озельтамивиру (наиболее широко используемый ингибитор нейраминидазы вируса гриппа): R292K, E119V, E119V + I222V, N294S, del244-247, Q136K [8]. Согласно проведенному исследованию, в аминокислотной последовательности белка нейраминидазы штаммов эпидемического сезона 2011 – 2012 не обнаружено мутаций, обуславливающих устойчивость к озельтамивиру.

Согласно анализу аминокислотных последовательностей гемагглютинина (табл.), исследованные штаммы вируса гриппа А (H3N2) A/Novosibirsk/2D/2012, A/Novosibirsk/59D/2012 и A/Novosibirsk/155/2012 схожи между собой и со штаммом A/Victoria/361/2011 (вакцинный), что характерно для штаммов в пределах одного эпидемического сезона, выделенных на одной территории. При этом первичная структура гемагглютинина штаммов A/Novosibirsk/59D/2012 и A/Novosibirsk/155/2012 полностью идентична, при наличии синонимичных замен в нуклеотидной последовательности генов, кодирующих данный белок.

Подавляющее большинство (22 из 24) замен, обнаруженных в аминокислотных последовательностях гемагглютининов всей рассмотренной выборки штаммов локализовано в антигенных детерминантах [9]. Это указывает на наличие антигенного дрейфа, который направлен на уход сезонных штаммов от иммунного прессинга со стороны организма-хозяина и закрепление соответствующих аминокислотных замен в антигенных детерминантах гемагглютинина вируса гриппа А (H3N2).

Прошедший сезон гриппа и ОРВИ в большинстве стран мира начался значительно позже, чем в предыдущие годы [10].

По данным ВОЗ, в течение сезона 2011 – 2012 гг. в разных странах Северного полушария доминировали разные типы/субтипы вируса гриппа. Так, в Канаде отмечалось незначительное преобладание вируса гриппа В по отношению к вирусу А (H3N2), в то время как в США преимущественно выделялся вирус гриппа А (H3N2). В Мексике в течение всего сезона циркулировал преимущественно вирус гриппа А (H1N1)pdm09. В Европе заболеваемость гриппом была преимущественно связана с вирусом А (H3N2) и в небольшом проценте случаев с вирусами гриппа В и А (H1N1)pdm09. В Северном Китае и Монголии в начале сезона доминировал вирус гриппа В с последующей циркуляцией совместно с вирусом А (H3N2), в то время как в Республике Корея и в Японии наблюдалась обратная ситуация: первоначально доминировал вирус гриппа А (H3N2) с последующим добавле-

нием в циркуляцию вируса гриппа В. В начале эпидемического сезона большинство изученных вирусов антигенно были близки вакцинным штаммам, однако с середины сезона, как в Европе, так и в Америке значительно возросло количество вирусов А (H3N2) со сниженной кроссреактивностью с вакцинным штаммом. Что касается вируса гриппа В, то в данном сезоне циркулировали обе линии (Ямагата и Виктория) с тем или иным преимуществом в разных странах [11].

В Российской Федерации эпидемический рост заболеваемости гриппом и ОРВИ был зарегистрирован только с начала марта 2012 года. Пик подъема заболеваемости отмечался на 15 – 16 неделе 2012 года (с 09.04.2012 по 22.04.2012), когда превышение эпидемических порогов заболеваемости на 10 – 54 % было зарегистрировано в 12 субъектах Российской Федерации [10]. В Сибири в целом в течение сезона отмечался локальный уровень распространения гриппа, в Новосибирской области заболеваемость гриппом и ОРВИ превышала порог менее чем на 20 % в течение всего сезона. В отличие от предыдущего сезона, когда преимущественно выделялся вирус гриппа А (H1N1)pdm09, доминирующим в течение всего сезона 2011 – 2012 гг. являлся вирус гриппа А (H3N2) [12, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эпидемический сезон по гриппу 2011 – 2012 гг. в Новосибирской области носил полиэтиологический характер с преимущественной циркуляцией вируса гриппа А (H3N2). Всего в течение эпидемического сезона 2011 – 2012 гг. было выделено 85 штаммов вируса гриппа, из них 79 штамма А (H3N2) и 6 штаммов вируса гриппа В, причем наблюдалась совместная циркуляция штаммов вируса гриппа В обеих генетических линий.

В течение всего сезона на территории НСО не было выделено ни одного штамма вируса гриппа А (H1N1)pdm09.

Изучение антигенных свойств 21 штамма вируса гриппа А (H3N2) показало, что у 10 штаммов отмечается уменьшение родства к вакцинному штамму A/Perth/16/2009, что отражает процесс антигенного дрейфа вируса гриппа и согласуется с данными об эпидемиологической ситуации по гриппу в других странах.

Несмотря на ряд уникальных аминокислотных замен, по структуре НА и NA штаммы вируса гриппа А (H3N2) A/Novosibirsk/2D/2012, A/Novosibirsk/59D/2012 и A/Novosibirsk/155/2012, выделенные в эпидемический сезон 2011 – 2012 гг. на Юге Западной Сибири, схожи с вакцинным штаммом A/Victoria/361/2011. Это указывает на целесообразность дальнейшего использования штамма A/Victoria/361/2011 в качестве вакцинного.

Штаммы, рассмотренные в молекулярно-генетическом анализе, не содержат специфических аминокислотных замен в белке NA, обуславливающих снижение чувствительности к действию применяемых в медицинской практике ингибиторов нейраминидазы.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП № 14.740.11.0247. и ГК № 12.741.12.0153.

ЛИТЕРАТУРА

1. Актуальные аспекты противодействия пандемиям гриппа (курс лекций) / под ред. д.м.н., профессора Дроздова И.Г. — Новосибирск: Информ-экспресс, 2009. — 136 с.
2. Muñoz E.T., Deem M.W. Epitope analysis for influenza vaccine design // Vaccine. — 2005. — Vol. 23 (9). — P. 1144—1148.
3. Taubenberger J.K., Morens D.M. Pandemic influenza — including a risk assessment of H5N1 // Rev Sci Technol. — 2009. — Vol. 28. — P. 187—202.
4. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza, 2011 [Электронный ресурс]. — Режим доступа http://www.who.int/csr/disease/influenza/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/ (дата обращения 15.06.12)
5. Increasing Appearance of Reassortant Influenza B Virus in Taiwan from 2002 to 2005 / Huey-Pin Tsai [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2006. — Vol. 44 (8). — P. 2705—2713.
6. Tullu M.S. DRUG REVIEW: Oseltamivir // Journal of Postgraduate Medicine. — 2009. — Vol. 55 (3). — P. 225—230.
7. Beigel J., Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza // Antiviral Res. — 2008. — Vol. 78 (1). — P. 91—102.
8. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. — 2011.
9. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2 / W.D. Lees [et al.] // Bioinformatics. — 2010. — Vol. 26, N 11. — P. 1403—1408.
10. Об итогах распространения гриппа и ОРВИ в мире и Российской Федерации в эпидсезон 2011—2012 гг. // Письмо от 18.06.2012 № 01-6770-12-32 [Электронный ресурс]. — Режим доступа http://rospotrebнадзор.ru/bytag2/-/asset_publisher/01Cv/content/ (дата обращения 22.06.12).
11. Influenza update // 2012 — [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/ (дата обращения 22.06.12).
12. Об итогах эпидемического подъема заболеваемости гриппом и ОРВИ в сезон 2010—2011 гг. // Письмо №01/5190-1-32 от 03.05.2011 [Электронный ресурс] — Режим доступа: <http://22.rospotrebнадзор.ru/documents/ros/60096/> (дата обращения 22.06.12).
13. Научно-исследовательский институт гриппа. Ситуация по гриппу в России и мире // [Электронный ресурс] — Режим доступа: http://www.influenza.spb.ru/system/epidemiological_situation/ (дата обращения 22.06.12).

Сведения об авторах

Соболев Иван Андреевич — аспирант, младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; e-mail: sobolev_i@hotmail.com)

Курская Ольга Григорьевна — научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Дурьманов Александр Гаврилович — старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Ильичева Татьяна Николаевна — к.б.н., заведующая лабораторией (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Шестопапов Александр Михайлович — д.б.н., профессор, заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Михеев Валерий Николаевич — к.м.н., заместитель генерального директора по научной и эпидемиологической работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Иванова Евгения Викторовна — заведующая лабораторией Центра гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области (630099, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Фрунзе 84)

Л.А. Степаненко ¹, В.А. Астафьев ², И.Ю. Самойлова ³**ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ИНФЕКЦИЯМИ С ФЕКАЛЬНО-ОРАЛЬНЫМ МЕХАНИЗМОМ ПЕРЕДАЧИ В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)**¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)³ Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия) (Якутск)

В статье представлены материалы комплексного эпидемиологического анализа заболеваемости инфекциями с фекально-оральным механизмом передачи в республике Саха (Якутия) за период с 2002 по 2011 гг. Показано повышение уровней заболеваемости острыми кишечными инфекциями установленной и не установленной этиологии на фоне снижения заболеваемости дизентерией. Установлено, что в республике Саха (Якутия) эпидемиологическая ситуация характеризуется большей напряженностью по сравнению с Российской Федерацией. Определены территории риска по заболеваемости ОКИ и дизентерией среди взрослого и детского населения республики Саха (Якутия).

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, заболеваемость, интегральный показатель

INCIDENCE OF INFECTIONS WITH THE FAECAL AND ORAL TRANSMITTING MECHANISM THE REPUBLIC OF SAKHA (YAKUTIA)L.A. Stepanenko ¹, V.A. Astafiyev ², I.Yu. Samoylova ³¹ Institute of Epidemiology and Microbiology of Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk² Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk³ Department of Consumer Supervision of the Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk

The paper presents the data of complex epidemiological analysis of infectious diseases from fecal-oral transmission in the Republic of Sakha (Yakutia) from 2002 to 2011. We found increased levels of acute intestinal infections of unknown etiology, and set against a background of reducing the incidence of dysentery. It was found that in the Republic of Sakha (Yakutia) the epidemiological situation is characterized by greater intensity in comparison with the Russian Federation. We identified area of risk for the incidence of acute intestinal infections and dysentery in adult and child population of the Republic of Sakha (Yakutia).

Key words: acute intestinal infection, morbidity, integral indicator

В начале XXI века инфекционные болезни не только не утратили своей актуальности, но все еще представляют реальную угрозу для здоровья человека. В структуре инфекционной патологии инфекции с фекально-оральным механизмом передачи, по своей значимости занимают особое место. За последние годы в нашей стране отмечается увеличение интенсивности вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ). Так за период с 2002 по 2011 гг. ими переболело более шести миллионов человек, причем доля детей в общей структуре ОКИ составляет не менее 60 %. В тоже время необходимо учитывать, что заболеваемость ОКИ распространена крайне неравномерно, т.е. существуют территории, где инцидентность возникновения случаев острых кишечных инфекций такова, что эпидемиологическую ситуацию можно оценить, как благополучную или наоборот крайне неблагоприятную.

Цель настоящей работы — эпидемиологический анализ заболеваемости инфекциями с фекально-оральным механизмом передачи населения республики Саха (Якутия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективный анализ заболеваемости населения республики Саха (Якутия) инфекциями с

фекально-оральным механизмом передачи (ОКИ установленной и не установленной этиологии, а также дизентерией) за период с 2002 по 2011 гг.

Статистическая обработка данных проведена с применением общепринятых параметрических и непараметрических критериев статистики. Оценка статистической значимости тенденции заболеваемости ОКИ в многолетней динамике проводилась с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Для определения значимости различий в уровнях заболеваемости использовали критерий Стьюдента [1, 2]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p \leq 0,05$.

Также использовались интегральные эпидемиологические показатели. Алгоритм их расчета условно называется методом «по сумме занятых мест» [3, 4], сущность которого заключается в том, что определяется перечень территорий и показателей для сравнения. Каждый из показателей ранжируется (от минимума к максимуму) за определенный отрезок лет, которые далее суммируются, что и является интегральным показателем (ИП) в виде суммы мест конкретного показателя или объекта.

Заключительный этап метода основан на вычислении коэффициента наглядности (K_n в %) по формуле:

$$K_n = \left(1 - \frac{S_x - S_p}{S_x - S_y} \right) \times 100$$

где S_x — наихудшая сумма мест; S_p — сумма мест у конкретного объекта; S_y — наилучшая сумма мест. Наихудшая сумма мест (S_x) определяется по формуле: $S_x = x \times n_i$, где x — число членов динамического ряда взятого для ранжировки; n_i — число показателей взятых для анализа. Наилучшая сумма мест (S_y) соответствует числу показателей взятых для анализа или на количество лет наблюдения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основные показатели, характеризующие многолетнюю динамику заболеваемости основными формами острых кишечных инфекций на территориях республики Саха (Якутия) (РС(Я)) и в Российской Федерации (РФ) представлены в таблице 1.

Анализ сравнительного материала показывает, что из всех форм инфекционной патологии в целом за анализируемый период уровень заболеваемости шигеллезами в РС(Я) статистически значимо ($p < 0,01$) превышал общероссийские данные. Для других сравниваемых форм инфекционной патологии заболеваемость в Якутии была значимо ниже по сравнению с РФ. В то же время, оценивая многолетнюю динамику заболеваемости, можно сделать заключение о том, что из всех форм ОКИ только для бактериальной дизентерии была выявлена значимая ($p < 0,01$) тенденция к снижению, как для Российской Федерации, так и республики Якутия.

Для многолетнего движения всех других форм инфекционной патологии (ОКИУЭ, ОКИНУЭ и сумма ОКИ) была выявлена значимая тенденция к росту, как в целом по Российской Федерации, так и для республики Якутия.

Оценивая среднеемноголетние показатели заболеваемости изучаемых форм ОКИ по их ошибкам, можно сделать вывод, что многолетняя динамика эпидемического процесса этих форм инфекционной патологии по республике Якутия характеризовалась

большой нестабильностью по сравнению с данными по РФ, о чем свидетельствуют соотношения между минимальными и максимальными показателями в исследуемых динамических рядах заболеваемости:

Шигеллезы РФ — 1 к 5,2; РС(Я) — 1 к 9,8;

ОКИУЭ РФ — 1 к 1,7; РС(Я) — 1 к 4,4;

ОКИНУЭ РФ — 1 к 1,4; РС(Я) — 1 к 2,3;

Сумма ОКИ РФ — 1 к 1,3; РС(Я) — 1 к 2,1.

В структуре заболеваемости ОКИ в целом за период наблюдения шигеллезы составили $12,6 \pm 2,8\%$, ОКИУЭ $17,4 \pm 1,6\%$ и ОКИНУЭ $70,0 \pm 3,2\%$. В течение последних 10 лет произошли значимые изменения структуры исследуемых форм инфекционной патологии. Так, например, если в 2002 г. доля шигеллез в Σ ОКИ составляла 30,1 %, то в 2011 г. этот показатель снизился до 3,7 %, удельный вес ОКИУЭ возрос с 13,1 % до 27,2 %, а ОКИНУЭ с 56,7 до 69,1 % по годам соответственно. Выявленное изменение структуры заболеваемости произошло, прежде всего, за счет чрезвычайно интенсивного снижения заболеваемости бактериальной дизентерией.

Углубленное изучение эпидемиологических особенностей кишечных инфекций среди детского и взрослого населения РС(Я) показало, что в структуре заболевших доминировали дети до 14 лет, их доля в целом за период наблюдения составила $69,6 \pm 1,1\%$. Следует отметить, что в различные годы удельный вес детского населения не регистрировался ниже 60 %.

За анализируемый период (2002 — 2011 гг.) в структуре всех ОКИ, как среди взрослого, так и среди детского населения доминировали острые кишечные инфекции неустановленной этиологии, которые составили 77,8 % и 66,5 % соответственно. В многолетнем аспекте статистически значимое повышение уровня заболеваемости острыми кишечными инфекциями неустановленной и установленной этиологии выявлено лишь среди детского населения ($p < 0,01$, $p = 0,05$). В то же время как среди детского, так и среди взрослого населения отмечено значимое снижение уровня заболеваемости шигеллезами ($p < 0,05$) (табл. 2).

Самый низкий показатель заболеваемости шигеллезами как среди взрослого, так и детского

Таблица 1
Показатели, характеризующие многолетнюю динамику заболеваемости острыми кишечными инфекциями за 2002 — 2010 гг.

Вид ОКИ	Территория	$\bar{M}$	$\pm m$	Критерий t	Уравнение регрессии ($Y = ax + b$)**	Темп прироста
Шигеллезы	Российская Федерация	29,7	4,6	115,2 $P < 0,01$	$-5,5x + 60,0$	-24,1
	Республика Саха (Якутия)	$\uparrow 56,3$	17,2		$-12,2x + 123,5$	-38,7
ОКИУЭ	Российская Федерация	113,0	6,6	127,2 $P < 0,01$	$7,6x + 71,1$	8,4
	Республика Саха (Якутия)	$\downarrow 78,6$	10,7		$5,8x + 46,8$	9,3
ОКИНУЭ	Российская Федерация	324,5	10,6	18,9 $P < 0,01$	$9,6x + 271,7$	3,3
	Республика Саха (Якутия)	$\downarrow 315,7$	28,4		$14,4x + 236,7$	5,4
Сумма ОКИ	Российская Федерация	467,2	14,6	33,4 $P < 0,01$	$11,71x + 402,8$	2,9
	Республика Саха (Якутия)	$\downarrow 450,5$	37,6		$7,9x + 407,0$	2,0

Примечания: $\uparrow$ — ниже, $\downarrow$ — выше по сравнению с данными по РФ; ** $Y = ax + b$, где Y — теоретический показатель динамического ряда, a — коэффициент регрессии, x — порядковый номер динамического ряда, b — начальный уровень динамического ряда.

Таблица 2

Показатели, характеризующие многолетнюю динамику заболеваемости острыми кишечными инфекциями в различных возрастных группах в республике Саха (Якутия) за 2002–2010 гг.

Вид инфекционной патологии	Возрастная группа	$\bar{M}$	$\pm m$	Доля (%)	Уравнение регрессии ($Y = ax + b$)	Темпы прироста	Тенденция
Шигеллезы	дети	154,1	43,1	64,6	$-31,8x + 323,7$	-36,2	$p < 0,5$
	взрослые	26,1	9,5	35,4	$-6,3x + 60,9$	-168,8	$p < 0,5$
ОКИУЭ	дети	300,3	50,6	86,5	$33,7x + 114,8$	16,4	$p = 0,5$
	взрослые	13,8	1,1	13,5	$-0,8x + 18,0$	-6,3	$p > 0,5$
ОКИНУЭ	дети	915,4	99,7	65,9	$73,1x + 513,9$	10,3	$p < 0,1$
	взрослые	139,6	9,6	34,1	$0,6x + 136,0$	0,5	$p > 0,5$
Сумма ОКИ	дети	1369,8	139,5	69,3	$77,8x + 941,8$	6,9	$p > 0,5$
	взрослые	179,5	19,9	30,7	$-6,449x + 214,9$	-3,9	$p > 0,5$

Примечания: * $Y = ax + b$, где Y – теоретический показатель динамического ряда, a – коэффициент регрессии, x – порядковый номер динамического ряда, b – начальный уровень динамического ряда.

населения РС(Я) отмечался в 2007 г. наиболее вы-
сокий в 2002 г. Доля детей до 14 лет в структуре
заболевших шигеллезами составила в среднем за
период наблюдения $64,6 \pm 1,9\%$ (рис. 1).

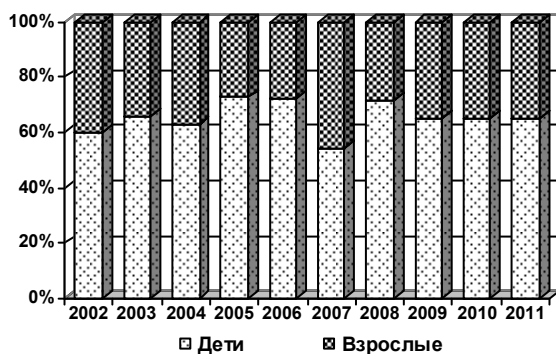


Рис. 1. Возрастная структура заболевших шигеллезами в республике Саха (Якутия) (%).

Уровень заболеваемости детского населения
ОКИУЭ в течение анализируемого периода воз-
росла в 2,3 раза, достигнув максимального зна-
чения в 2011 г. ($606,7 \text{ ‰}$). Доля детей до 14 лет в
структуре заболеваемости ОКИУЭ за исследуемый
период была не ниже $77,7\%$ и составила в среднем
 $86,5 \pm 1,8\%$ (рис. 2).

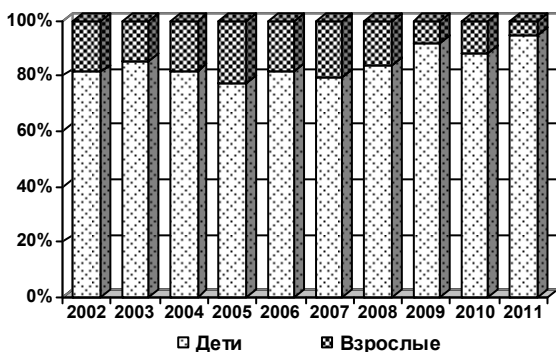


Рис. 2. Возрастная структура заболевших ОКИУЭ в республике Саха (Якутия) (%).

Уровень заболеваемости взрослого населения
кишечными инфекциями неустановленной этиоло-
гии варьировал в широких пределах от $107,5 \text{ ‰}$
(2006 г.) до $206,5 \text{ ‰}$ (2010 г.). Среди детей до 14
лет заболеваемость ОКИНУЭ за период с 2002 по
2011 гг. увеличилась в 1,3 раза ($p < 0,01$), достигнув
своего максимального значения также в 2010 году
– $1521,9 \text{ ‰}$. Основную часть всех заболевших
ОКИНУЭ за наблюдаемый период составили дети
до 14 лет ($65,9 \pm 1,7\%$) (рис. 3).

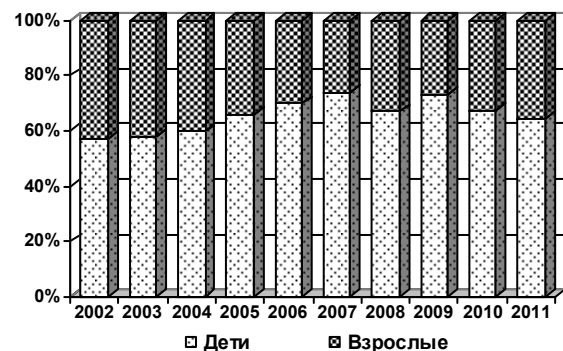


Рис. 3. Возрастная структура заболевших ОКИНУЭ в республике Саха (Якутия) (%).

Следующий этап нашего исследования заклю-
чался в комплексной оценке эпидемиологической
ситуации по острым кишечным инфекциям на
отдельных территориях республики Саха Якутия.
Для этого нами использован метод интегральной
оценки «по сумме занятых мест».

В анализ были взяты показатели заболевае-
мости шигеллезами, ОКИУЭ, ОКИНУЭ взросло-
го и детского населения до 14 лет за десять лет
(2002–2011 гг.) по каждой из административных
территорий, входящих в состав РС(Я). Всего адми-
нистративных территорий, взятых нами для рас-
чета интегральных показателей, было 35.

Анализ представленных данных позволил под-
разделить эпидемиологическую ситуацию, харак-
теризующую отдельные районы области, на три
категории, а именно:

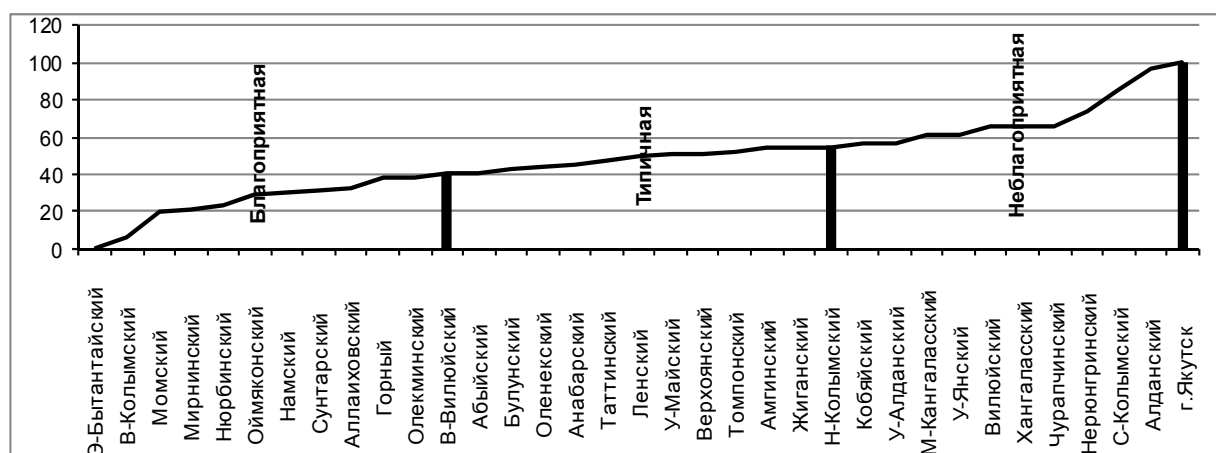


Рис. 4. Эпидемиологическая ситуация по ОКИ взрослого населения на отдельных территориях республики Саха (Якутия) с учетом интегральных показателей (ИП).

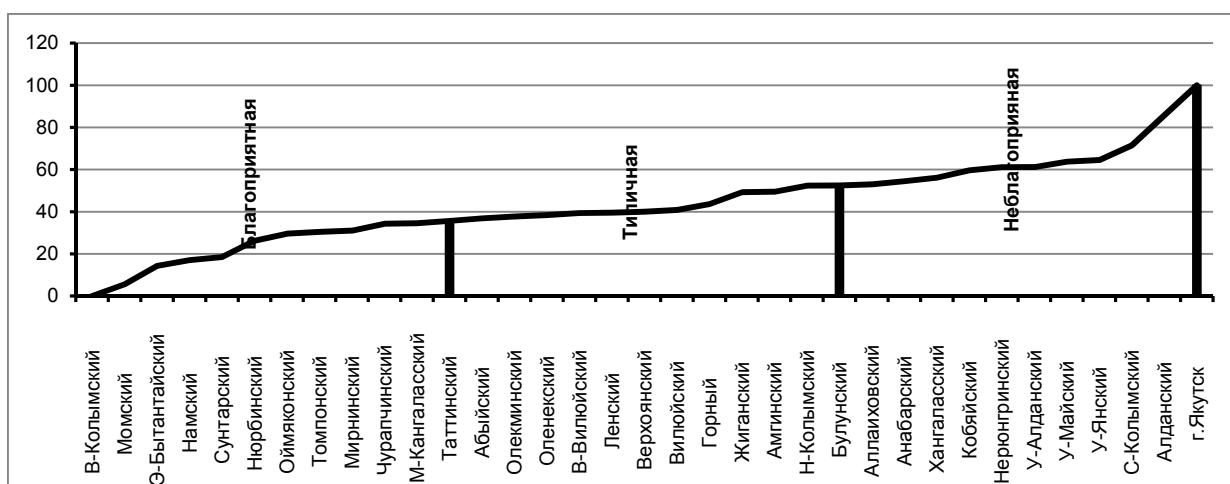


Рис. 5. Эпидемиологическая ситуация по ОКИ детского населения до 14 лет на отдельных территориях республики Саха (Якутия) с учетом интегральных показателей (ИП).

- 1) благоприятную;
- 2) типовую;
- 3) неблагоприятную.

Так, эпидемиологическая ситуация по ОКИ по районам республики Саха (Якутия) среди взрослого и детского населения выглядела следующим образом (рис. 4, 5).

Анализ материалов по оценке эпидемиологической ситуации с использованием интегральных показателей позволил выявить территории наиболее неблагополучные по острым кишечным инфекциям. Из 35 районов республики Саха (Якутия) в 11 эпидемиологическая ситуация характеризуется как неблагополучная. Следует отметить, что как среди взрослого населения, так и среди детей до 14 лет, наиболее неблагоприятная эпид. ситуация отмечается в Алданском и С-Колымском районах. При этом зоной эпидемиологического неблагополучия является крупный город республики — Якутск. Более благоприятная ситуация отмечается в В-Колымском, Момском и Э-Бытантайском районах, как среди взрослого, так и среди детского населения.

При оценке эпидемиологической ситуации по дизентерии, выявлено, что более благополучными зонами в республике Саха среди взрослого и детского населения являются Оймяконский, Э-Бытантайский и В-Колымский районы. При этом территорией с чрезвычайно неблагополучной эпид. ситуацией является также город Якутск.

Таким образом, анализ заболеваемости инфекций с фекально-оральным механизмом передачи показал, что в республике Саха (Якутия) эпидемиологическая ситуация характеризуется большей напряженностью по сравнению с Российской Федерацией. За период с 2002 по 2011 гг. в Якутии на фоне существенного снижения заболеваемости шигеллезами как среди взрослого, так и среди детского населения, отмечался рост заболеваемости ОКИ установленной и не установленной этиологии, что отражает общероссийскую тенденцию. При этом, заболеваемость шигеллезами в РС(Я) регистрировалась на статистически более высоком уровне по сравнению с аналогичными данными по Российской Федерации. Основную часть заболевших составляли дети до 14 лет. Кроме того, определены территории

риска по заболеваемости ОКИ и дизентерией среди взрослого и детского населения республики Саха (Якутия). Установлено, что город Якутск является зоной эпидемиологического неблагополучия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе / Е.Д. Савилов [и др.]. — 2-е издание, перераб. — М.: МЕД пресс-информ, 2004. — 112 с.
2. Савилов Е.Д., Астафьев В.А. Применение непараметрических критериев статистики в

эпидемиологических исследованиях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — М., 1987. — № 11. — С. 36—38.

3. Сазыкин В.Л. Метод интегральной оценки объектов по сумме мест // Материалы областного совещания по итогам противотуберкулезной работы за 1993 год. — Оренбург, 1994. — С. 14—16.

4. Сазыкин В.Л., Сон И.М. Комплексная оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу в России // Проблемы туберкулеза и болезни легких. — 2006. — № 10. — С. 65—69.

Сведения об авторах

Степаненко Лилия Александровна — научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; e-mail: stepia@mail.ru)

Астафьев Виктор Александрович — д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и микробиологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования, ведущий научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100, ИГМАПО; e-mail: astaw48@mail.ru)

Самойлова Изабелла Юрьевна — заместитель руководителя Управления Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия) (samoilova_ses@mail.ru)

С.С. Ханхареєв, Г.С. Амагзаєва, Л.А. Раднаєва

ВЫСОКОПАТОГЕННЫЙ ГРИПП В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ И ЕГО ПРОФИЛАКТИКА В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2009–2010 гг.

Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия (Улан-Удэ)

Проведен анализ заболеваемости высокопатогенным гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями в Республике Бурятия. Представлены данные лабораторного мониторинга за циркуляцией возбудителей гриппа и проведенной в предэпидемический период иммунизации населения. Освящены организационные и практические мероприятия по противодействию гриппу А/Н1N1/.

Ключевые слова: высокопатогенный грипп, острые респираторные вирусные инфекции, заболеваемость, мониторинг, иммунизация, профилактика, эпидемическая ситуация

THE HIGHLY PATHOGENIC INFLUENZA IN THE REPUBLIC OF BURYATIA AND PREVENTIVE MAINTENANCE IN EPIDEMIC SEASON 2009–2010

S.S. Khankhareyev, G.S. Amagzayeva, L.A. Radnayeve

The Department of Rospotrebnadzor of the Republic of Buryatia, Ulan-Ude

The analysis of morbidity of the highly pathogenic influenza and acute respiratory viral infections in Republic of Buryatia is lead. Data of laboratory monitoring behind circulation of pathogen agent of flue and the immunization of the population in preepidemic period are presented. Organizational and practical actions on counteraction to flu A/H1N1/ are consecrated.

Key words: highly pathogenic influenza, acute respiratory viral infection, morbidity, monitoring, immunization, preventive maintenance, epidemiological situation

Грипп и острые респираторные вирусные инфекции остаются одной из самых актуальных проблем здравоохранения как по количеству заболевших, так и по наносимым экономическим потерям и числу осложнений после перенесенной инфекции.

Доля гриппа и острых респираторных заболеваний в общей структуре инфекционной заболеваемости в 2009 г. в Республике Бурятия составила 85,1 %, в 2010 г. — 78,5 %.

Осенью 2009 г. здравоохранение Бурятии впервые столкнулось с заболеванием, вызванным ранее не известным высокопатогенным штаммом вируса гриппа А/Н1N1/ Калифорния/2009. С 25 октября 2009 г. в республике были зарегистрированы первые случаи заболевания высокопатогенным гриппом, пришедшим из Монголии и Забайкальского края. Одновременно начался резкий рост заболеваемости острых респираторных вирусных инфекций, что было не характерно для этого времени года. За неделю регистрировалось от 2,5 до 7 тысяч случаев заболевания острых респираторных вирусных инфекций, пик заболеваемости отмечен на второй и третьей неделе ноября, когда за короткий промежуток времени в республике заболело более 12 тысяч человек, и превышение пороговых уровней заболеваемости имело место практически во всех муниципальных образованиях республики. Ситуация стабилизировалась к началу января 2010 г., эпидемия длилась 9 недель, за это время переболело более 75 тысяч человек или 9 % населения республики, что обусловило превышение уровня заболеваемости 2008 г. в 1,5 раза, но на 45 % ниже чем по Российской Феде-

рации (23430,6 на 100 тысяч населения). Всего за 2009 г. переболело острыми респираторными инфекциями 16,2 % населения республики, из них 61,7 % составили дети до 14 лет. Всего было зарегистрировано 156 602 случая острых респираторных вирусных инфекций, показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составил 16 164,4 против 10 598,2 в 2008 г., в том числе гриппом переболело 807 жителей республики.

Среди заболевших гриппом основной удельный вес составили больные высокопатогенным гриппом А/Н1N1/2009, на него пришлось 89,4 % или 722 случая, показатель составил 75,2 на 100 тысяч населения, сезонным гриппом заболело 85 человек (10,5 %). Случаи регистрировались практически во всех районах, за исключением Баунтовского и Окинского (176 случаев или 28,7 на 100 тысяч населения) и г. Улан-Удэ (546 случаев или 155,4 случая на 100 тысяч населения).

За время наблюдения и лабораторного мониторинга за циркуляцией возбудителей острых респираторных заболеваний, в том числе гриппа, на базе лаборатории особоопасных инфекций и вирусологической лаборатории ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия» были обследованы на вирусы высокопатогенного гриппа А/Н1N1/2009 — 1528 человек, проведено исследований — 2037, из них положительных — 730. Все заболевшие были обследованы с помощью молекулярно-генетического метода исследования — ПЦР (полимеразная цепная реакция). Для диагностики применялся набор реагентов для идентификации вируса гриппа А/Н1N1/2009, разработанных ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора в первые дни

объявления чрезвычайной ситуации, связанной с высокопатогенным вирусом гриппа.

Анализ заболеваемости показал, что среди заболевших высокопатогенным гриппом 33,4 % (241 человек) составили дети до 17 лет (в том числе до 14 лет — 193 чел., подростки — 48 чел.), взрослые — 66,6 % (4 481 чел.). По социальной структуре 29,6 % составляют неработающие, 28,3 % — работающие, 16,1 % — школьники, 12,2 % — студенты, 9 % — неорганизованные, 4,2 % — дети детских дошкольных учреждений (МДОУ), 0,7 % — военнослужащие. 34 % заболевших составляли беременные женщины (251 чел.).

Все заболевшие получили лечение, из них 87,6 % — стационарное (674 чел.), 61 больной — амбулаторное. Тяжелое течение отмечалось у 11 больных (1,5 %), среднее — у 503 (69,6 %), легкое — у 208 (28,8 %) и у 25 % (183 чел.) заболевание гриппом осложнилось пневмониями.

Зарегистрировано 4 случая летальных исхода среди населения г. Улан-Удэ, Бичурского, Заиграевского и Кабанского районов, показатель летальности составил 0,6 %. Из числа умерших 3 мужчин и 1 женщина в возрасте 45 — 56 лет.

С началом осложнения эпидемической ситуации по высокопатогенному гриппу в мире в республике с конца апреля 2009 г. началась подготовка к пандемии гриппа, осуществлялись организационные и практические мероприятия. Были разработаны и утверждены межведомственный республиканский план по предупреждению завоза и распространения гриппа на территории РБ на 2009 — 2011 гг., республиканский план по подготовке к пандемии гриппа, создана Республиканская комиссия по подготовке к пандемии гриппа под председательством Первого заместителя Председателя Правительства Республики Бурятия. Ход подготовки заслушивался на совещаниях различного уровня, в том числе на совещании у Президента — Председателя Правительства Республики Бурятия, на заседаниях Санитарно-противоэпидемической комиссии при Правительстве Республики Бурятия, Правительственной Комиссии по предупреждению и ликвидации ЧС и обеспечению пожарной безопасности, коллегии территориальных органов федеральных органов исполнительной власти по Республике Бурятия и др. Муниципальные образования были заслушаны на 3-х селекторных совещаниях Правительства Республики Бурятия. Издано 3 Постановления Главного государственного санитарного врача по Республике Бурятия по усилению мероприятий по профилактике гриппа и острых респираторных инфекции в эпидсезон 2009 — 2010 гг.».

Управлением Роспотребнадзора по Республике Бурятия проведены 68 совещаний, направлено 82 письма заинтересованным министерствам и ведомствам об организации профилактических и противоэпидемических мероприятий в подведомственных учреждениях.

В целях предупреждения завоза высокопатогенного гриппа на территорию республики специали-

стами Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия был усилен санитарно-карантинный контроль в пунктах пропуска через государственную границу. Осуществлялся контроль за состоянием здоровья пассажиров, прибывающих воздушным, железнодорожным и автомобильным транспортом. На средства, выделенные из республиканского бюджета в сумме более 2,5 миллионов рублей были приобретены 4 тепловизора для бесконтактного определения температуры тела у пассажиров.

Была обеспечена готовность лечебно-профилактических учреждений республики к оказанию медицинской помощи больным высокопатогенным гриппом, были приобретены противовирусные препараты, дезинфицирующие средства и средств индивидуальной защиты для медицинских работников, аппараты искусственной вентиляции легких, осуществлена подготовка медицинских работников.

В предэпидемический период проводилась иммунизация населения республики против гриппа. Было привито в 2009 году 415 459 человек, из них детей — 178 737, в том числе в рамках национального приоритетного проекта в сфере здравоохранения привито 321 470 человек: учащиеся 1 — 11 классов, дети, посещающие ДДУ, студенты, медицинские работники, лица в возрасте старше 60 лет. За счет средств местного бюджета, страховых кампаний прививались работники коммунальных служб, часто и длительно болеющие, лица с хроническими заболеваниями. За счет средств работодателей прививались работники промышленных предприятий, сферы обслуживания, торговли, транспорта. Всего на эти средства было привито 93 989 человек на сумму более 11 миллионов рублей. Охват прививками против гриппа составил 43,3 % от численности населения против 33,8 % в 2008 г.

В связи с осложнением эпидемиологической обстановки в республике, обусловленной распространением пандемического и сезонного гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций, с 3 по 24 ноября 2009 г. в республике был объявлен режим чрезвычайной ситуации: запрещено проведение массовых, культурных и спортивных мероприятий, введен масочный режим во всех учреждениях, на предприятиях, организациях. Введены карантинно-ограничительные мероприятия в лечебно-профилактических учреждениях, было отменено 49 мероприятий.

В ежедневном режиме в Управлении Роспотребнадзора по Республике Бурятия проводились заседания республиканского оперативного штаба по координации мероприятий по предупреждению распространения высокопатогенного гриппа, всего проведено 48 заседаний. Осуществлялся ежедневный мониторинг за посещаемостью детей и студентов, температурным режимом в образовательных учреждениях республики с анализом причин отсутствия, а также за заболеваемостью и внебольничными пневмониями.

Специалистами Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия проводились внеплановые проверки лечебных, детских дошкольных и других

образовательных учреждений, совместно с Министерством внутренних дел Республики Бурятия — предприятий торговли и общественного питания, развлекательных центров, досуговых учреждений по выполнению противоэпидемических мероприятий. Всего был проверен 1401 объект, выявлены нарушения на 550 объектах, составлен 631 протокол об административном правонарушении на должностных лиц. Проводилась активная разъяснительная работа с населением на русском и бурятском языках по республиканским телеканалам

БГТРК, «Тивиком», «Ариг Ус», в республиканских, городских и районных газетах, по телефону «горячей линии».

Таким образом, благодаря проведенным мероприятиям в период подготовки к пандемии гриппа и во время эпидемического подъема заболеваемости острых респираторных вирусных инфекций и гриппом, высокому охвату прививками против сезонного гриппа населения республики (43,3 %) удалось сдержать уровень распространения высокопатогенного гриппа среди населения республики.

Сведения об авторах

Ханхареев Сергей Степанович – и.о. руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия (тел. 8 (3012) 41-24-77)

Амагзаева Галина Сергеевна – начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия

Раднаева Людмила Александровна – ведущий специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия

С.С. Ханхареєв, Г.С. Амагзаєва, Н.А. Гаврилова, Б.Б. Дараєва

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия (Улан-Удэ)

Проведен анализ многолетней заболеваемости острым и хроническим вирусным гепатитом В в Республике Бурятия. Представлены данные обследования на ВГВ среди населения республики. Выявлена взаимосвязь между заболеваемостью и иммунизацией населения против вирусного гепатита В. Даны итоги реализации приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения по дополнительной иммунизации населения против ВГВ в республике.

Ключевые слова: вирусный гепатит В, многолетняя заболеваемость, эпидемиологическая ситуация, вакцинация, приоритетный национальный проект в сфере здравоохранения

THE MORBIDITY OF VIRAL HEPATITIS B IN THE REPUBLIC OF BURYATIA

S.S. Khankhareev, G.S. Amagzayeva, N.A. Gavrilova, B.B. Darayeva

The Department of Rosпотребнадзор of the Republic of Buryatia, Ulan-Ude

The analysis of long-term morbidity of acute and chronic viral hepatitis B in the Republic of Buryatia is lead. The data of inspections of HBV infection among the population of republic are presented. The interrelation between morbidity and immunization of the population against a virus of hepatitis B is revealed. The results of the realization priority national project of healthcare on additional immunization of the population against HBV infection in republic are given.

Key words: viral hepatitis B, long-term morbidity, epidemiological situation, vaccination, the priority national project in the health sector

Впервые в Республике Бурятия острый вирусный гепатит В был зарегистрирован в 1967 году, когда показатель заболеваемости составил 0,25 на 100 тысяч населения. За период с 1967 по 1997 гг. имел место неуклонный рост заболеваемости (до 650 человек ежегодно), с пиком заболеваемости в 1997 году с показателем 61,66 на 100 тысяч населения. Начиная с 1998 года эпидемиологическая ситуация стала стабилизироваться, в республике началась вакцинация против вирусного гепатита В в альтернативных кабинетах лечебно-профилактических учреждениях г. Улан-Удэ. С 2000 года — вакцинация новорожденных и 13-летних детей в рамках Национального календаря профилактических прививок. В результате реализации в городе Улан-Удэ программы «Вакцинация школьников против вирусного гепатита В и краснухи в 1985—1990 гг. рождения» было привито 5250 школьников. На средства республиканской целевой программы «Профилактика вирусных гепатитов» на 2002—2005 гг. привито более 8600 школьников и 18 000 медицинских работников (92 %).

В период с 1999 по 2006 годы заболеваемость регистрировалась на уровне 32,0—14,99 на 100 тысяч населения. За эти годы заболеваемость среди детей до 14 лет снизилась в 19,7 раз, с 59 случаев до 3 случаев в год.

С момента реализации Национального приоритетного проекта, в ходе дополнительной иммунизации населения республики до 55 лет против вирусного гепатита В заболеваемость этой инфекцией снизилась более чем в 191 раз по сравнению с 2005 годом, а также привела к снижению уровня

носительства вирусного гепатита В среди населения, который за последние 10 лет уменьшился в 2,5 раза (с 73,8 в 2002 г. до 30,0 на 100 тысяч населения в 2011 г.). За данный период не регистрировалась заболеваемость среди детей, кроме 2-х случаев ВГВ у детей в 2008 году.

В 2011 году в республике зарегистрирован 1 случай острого гепатита В у непривитого против этой инфекции, показатель заболеваемости составил 0,1 на 100 тыс. населения.

В то же время ежегодно увеличивается количество больных с хронической формой вирусного гепатита В, заболеваемость с момента официальной регистрации (1999 г.) возросла в 11 раз с 1,0 до 11,8 случаев на 100 тысяч населения в 2011 г. На долю молодого и трудоспособного населения приходится 65 % заболевших, заразившихся половым путем и инъекционным применением наркотиков и представляющих огромный резервуар инфекции.

Ежегодно на вирусный гепатит В обследуется от 10 до 13 % населения Республики Бурятия из числа контингентов, подлежащих обязательному обследованию на маркеры вирусного гепатита В. Выявляется до 2300 положительных результатов (1,8 %). Наибольший удельный вес положительных результатов на маркеры ВГВ отмечается у больных с хроническими поражениями печени — 6,5 %, беременных — 2,2 %, пациентов наркологических и кожно-венерологических диспансеров — 1,3 %, доноров — 0,4 % от числа обследованных.

В настоящее время основным методом борьбы с вирусным гепатитом В остается вакцинопрофилактика. Накопленный во многих странах мира многолетний опыт широкого применения вакцин

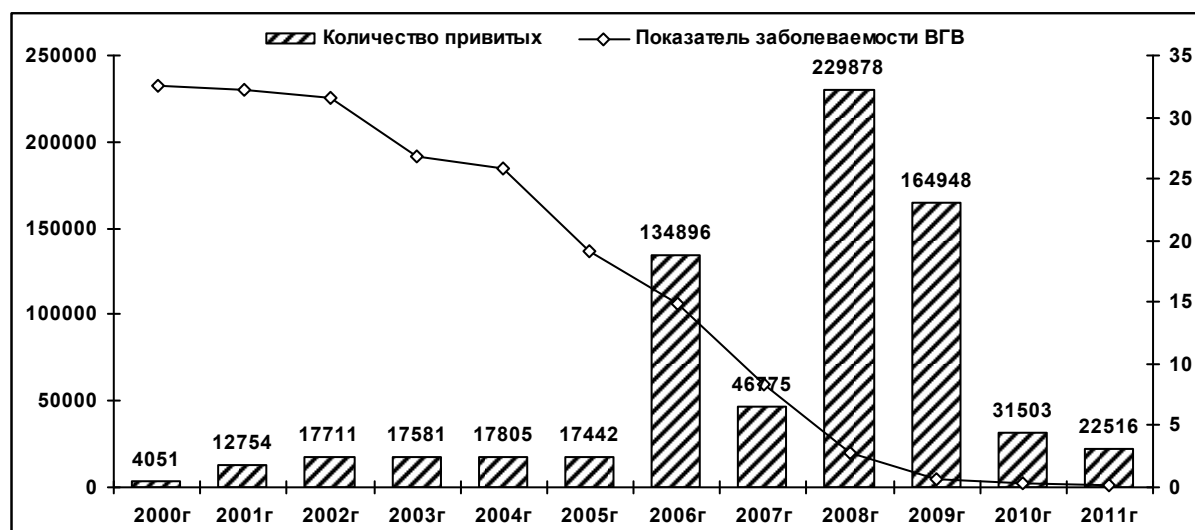


Рис. 1. Заболеваемость вирусным гепатитом В и количество привитых против вирусного гепатита В на территории республики за 2000–2011 гг.

против гепатита В свидетельствует, что благодаря этому может быть достигнуто резкое снижение показателей заболеваемости, частоты летальных исходов и формирования хронических форм, уровня носительства HBSAg в популяции, получена значительная экономическая выгода.

Снижения заболеваемости вирусным гепатитом В также удалось добиться в результате проведения огромной работы, направленной на организацию и проведение массовой дополнительной иммунизации взрослого населения против гепатита В в рамках реализации приоритетного Национального проекта «Здоровье». Всего в республике за период с 2005 по 2011 годы привито более 500 тысяч человек или 50 % от населения республики. Ежегодно возрастает охват детей 1 года против вирусного гепатита В, который составил в 2011 г. 98,9 % против 98,6 % в 2010 году. Охват взрослого

населения в возрасте 18–55 лет составил 95,6 % против 94,1 % в 2010 году (рис. 1).

Таким образом, в настоящее время основным методом борьбы с вирусным гепатитом В остается вакцинопрофилактика, благодаря которой может быть достигнуто резкое снижение показателей заболеваемости, частоты летальных исходов и формирования хронических форм, уровня носительства HBSAg в популяции, получена значительная экономическая выгода.

Дальнейшее осуществление профилактических мероприятий, эффективный эпидемиологический надзор за гепатитом В и проводимая вакцинация в рамках национального календаря и приоритетного национального проекта в сфере здравоохранения позволят не только поддерживать стабильную эпидситуацию по ВГВ, но и добиться ликвидации острого вирусного гепатита В.

Сведения об авторах

Ханхареев Сергей Степанович – и.о. руководителя Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия (тел. 8 (3012) 41-24-77)

Амагзаева Галина Сергеевна – начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия

Гаврилова Нэли Алагуевна – главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия

Дараева Баирма Борисовна – специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Бурятия

С.Н. Чекунина, А.А. Яковлев, И.А. Кравцов

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДЕМОГРАФИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НАСЕЛЕНИЯ НА ПРОСТРАНСТВЕННЫЙ АСПЕКТ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ГЕПАТИТА А, ШИГЕЛЛЕЗОВ ФЛЕКСНЕРА И ЗОННЕ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ*Владивостокский государственный медицинский университет (Владивосток)*

В работе, на основе ретроспективного анализа заболеваемости гепатитом А, шигеллезами Флекснера и Зонне совокупного населения различных административных территорий Приморского края за период 1995–1999 гг. и 2004–2011 гг. и проведенных корреляционных исследований между показателями заболеваемости указанными инфекциями и долей в демографической структуре населения районов края детей до 14 и до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения, дана эпидемиологическая оценка влияния этого фактора на пространственный аспект эпидемического процесса изучаемых нозоформ.

Ключевые слова: эпидемиология, гепатит А, шигеллезы, демография

EPIDEMIOLOGICAL ASSESSMENT OF INFLUENCE OF DEMOGRAPHIC STRUCTURE OF THE POPULATION ON SPATIAL ASPECT OF EPIDEMIC PROCESS OF HEPATITIS A, SHIGELLOSIS FLEXNER AND SONNE IN PRIMORSKY KRAI

S.N. Chekunina, A.A. Yakovlev, I.A. Kravtsov

Vladivostok State Medical University, Vladivostok

In this paper, based on a retrospective analysis of hepatitis A, shigellosis Flexner and Sonne total population of the various administrative areas of Primorye Territory in the period 1995–1999 and 2004–2011 years and conducted studies of the correlation between the incidence and the proportion of these infections in the demographic structure of the population areas of the region up to 14 children and up to 6 years attending preschool institutions, given the epidemiological assessment of the impact of this factor on the spatial dimension of the epidemic process under studied nozoform was studied.

Key words: epidemiology, hepatitis A, shigellosis, demography

Гепатит А и шигеллезы относятся к наиболее распространенным инфекциям с фекально-оральным механизмом передачи. При этом Дальневосточный Федеральный округ относится к регионам, где регистрируются одни из самых высоких показателей заболеваемости [6, 8]. Традиционно различия в уровнях заболеваемости этими инфекциями связывают с активностью механизма передачи и качеством проведения санитарно-гигиенических мероприятий. Однако неравномерность территориального распределения заболеваемости данными нозоформами нельзя объяснить только действием указанных факторов [5, 6]. В частности, ранее проведенные нами исследования [4] показали, что, например, качество водоснабжения — ведущий фактор передачи гепатита А и шигеллеза Флекснера — не влияет на пространственный аспект распространения этих инфекций в Приморье. Судя и по литературным данным, далеко не всегда территории с высоким уровнем заболеваемости этими инфекциями неблагополучны по водоснабжению [6]. Как показывают исследования ряда авторов [1, 5, 6], фактором, оказывающим существенное влияние на уровни заболеваемости в различных странах и на отдельных территориях РФ, может быть демографическая структура населения, в частности, — доля детей до 14 лет и детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения. В При-

морском крае исследований по изучению влияния этого фактора на территориальное распределение заболеваемости гепатитом А и шигеллезами ранее не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

По данным Федерального государственного статистического наблюдения по Приморскому краю (ф. 2) изучена заболеваемость населения различных административных территорий Приморья указанными инфекциями за 1995–1999 и 2004–2011 гг. Такие периоды наблюдения были нами выбраны для исключения влияния на показатели заболеваемости фактора экономического спада в 90-х годах в нашей стране, а также — это периоды более высокого и более низкого уровней заболеваемости вышеуказанными инфекциями населения Приморья. Кроме того, от Краевого статистического управления были получены данные о количестве детей до 14 лет, проживающих на различных административных территориях в указанные временные периоды и до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения. Для определения влияния демографической структуры населения на уровни заболеваемости был применен корреляционный анализ по Спирмену с использованием коэффициента ранговой корреляции. Статистическая обработка материала проводилась с применением программы MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что многолетняя динамика заболеваемости указанными инфекциями в крае имеет выраженную тенденцию к снижению, и в последние годы она достигла минимальных за весь период наблюдения значений (рис. 1). Подобная тенденция отмечена и на других территориях РФ [1].

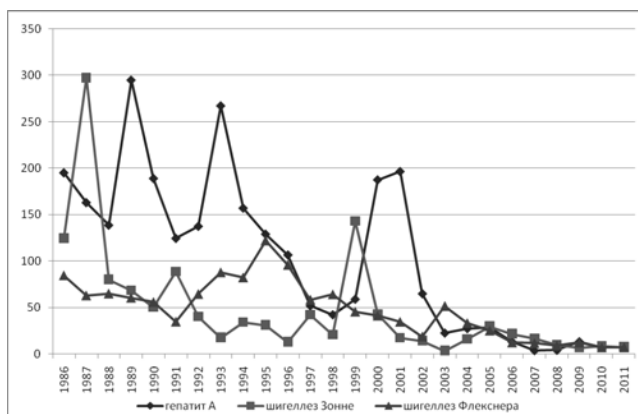


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости гепатитом А, шигеллезами Зонне и Флекснера в Приморском крае (на 100 тысяч населения).

Проведенный анализ по возрастной структуре заболеваемости гепатитом А, шигеллезом Флекснера и шигеллезом Зонне населения Приморского края позволил установить, что на долю детей, больных гепатитом А в возрасте до 14 лет, приходилось от 57 % в 1998 г. до 31 % — в 2007 г.; заболевших шигеллезом Зонне — от 73 % в 1998 г. до 37 % в 2007 г.; заболевших шигеллезом Флекснера — от 48 % в 2004 г. до 32 % в 2009 г. При этом следует отметить, что, если в первый анализируемый временной период доля детей среди всего совокупного населения края составляла 22,9 %, то во второй — 16,7 %. Как показали наши исследования (табл. 1), применительно ко всем анализируемым инфекциям в первый временной период была выявлена прямая сильная достоверная корреляционная связь между долей детского населения до 14 лет в среднем по краю в каждом году, долей детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения, и ежегодными показателями заболеваемости совокупного населения. Во второй временной период выявленные корреляци-

онные связи уже не были столь убедительными. В частности, только при шигеллезе Флекснера была установлена прямая средней силы корреляционная связь между изучаемыми явлениями. В отношении других нозоформ достоверных корреляционных связей выявлено не было.

Эти данные подтверждали наше предположение о возможном существенном влиянии доли детского населения на различных территориях края на показатели заболеваемости указанными инфекциями совокупного населения. Следует отметить, что в последние годы доля детей в структуре заболевших анализируемыми нозоформами стала уменьшаться. При этом в научных публикациях последнего времени активно отражается точка зрения, что, например, гепатит А перестал быть преимущественно детской инфекцией, так как наибольшее число случаев заболеваний регистрируется среди взрослых [7]. Другие авторы указывают на увеличение количества заболевших шигеллезом Флекснера в возрасте старше 15 лет [2]. Однако, по мнению А.Я. Миндлинной с соавт. [6], большее количество зарегистрированных случаев заболевания среди взрослого населения определяется, прежде всего, особенностью его демографической структуры. Удельный вес взрослых в РФ составляет 80 % и более. Соответственно можно ожидать, что среди них будет зарегистрировано и наибольшее количество заболевших.

Результаты эпидемиологической оценки территориального распределения гепатита А в Приморском крае, во-первых, показали, что в период 1995 — 1999 гг. он регистрировался на всех административных территориях края. Среднегодовой показатель заболеваемости был равен 132,6 на 100 тыс. населения. Во-вторых, проведенный корреляционный анализ между долей детей до 14 лет в структуре населения этих территорий (в среднем за указанный период времени) и среднегодовыми показателями заболеваемости гепатитом А совокупного населения на различных административных территориях, позволил выявить прямую средней силы связь между ними ($r = 0,4$; $p > 95$ %). Во второй временной период гепатит А также был зарегистрирован на всех административных территориях. Однако в отдельные годы на некоторых из них эта инфекция не была выявлена. Среднегодовой показатель снизился до 41,7

Таблица 1
Результаты корреляционного анализа между долей детей от общего количества населения Приморского края и ежегодными показателями заболеваемости шигеллезами Зонне, Флекснера и гепатитом А

Периоды исследования, гг.	Анализируемая детерминанта эпидемического процесса	Шигеллез Зонне		Шигеллез Флекснера		Гепатит А	
		r	p (%)	r	p (%)	r	p (%)
1995–1998	Доля детей до 14 лет	0,8	> 95	0,98	> 95	0,92	> 95
	Доля детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения	0,86	> 95	0,95	> 95	0,94	> 95
2003–2011	Доля детей до 14 лет	–0,62	< 95	0,96	> 95	0,4	< 95
	Доля детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения	0,29	< 95	–0,95	> 95	–0,68	> 95

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа между средней долей детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения, от населения различных административных территорий Приморского края и среднемноголетними показателями заболеваемости шигеллезами Зонне, Флекснера и гепатитом А

Периоды исследования	Шигеллез Зонне		Шигеллез Флекснера		Гепатит А	
	<i>r</i>	<i>p</i> (%)	<i>r</i>	<i>p</i> (%)	<i>r</i>	<i>p</i> (%)
1995–1998	0,01	< 95	0,2	< 95	0,16	< 95
2003–2011	0,03	< 95	0,14	< 95	0,17	< 95

на 100 тыс. населения. Коэффициент корреляции стал равен 0,2 ($p < 95\%$).

Эпидемиологическая оценка территориального распространения шигеллеза Флекснера позволила установить, что в первый временной период он был зарегистрирован на всех административных территориях края. Среднемноголетний показатель оказался равен 72,2 на 100 тыс. населения. Проведенный корреляционный анализ не выявил достоверной связи между долей детей до 14 лет в демографической структуре населения отдельных административных районов и показателями заболеваемости шигеллезом Флекснера в эти годы ($r = 0,04$; $p < 95\%$). Во второй временной период заболеваемость этой инфекцией, как и при гепатите А, была отмечена не на всех территориях края и составила в среднем 27,4 на 100 тыс. населения. Не было выявлено и достоверной корреляционной связи между анализируемыми явлениями ($r = 0,2$; $p < 95\%$).

Результаты эпидемиологической оценки территориального распространения шигеллеза Зонне, позволили установить, что в первый временной период эта инфекция регистрировалась на всех административных территориях края. Среднемноголетние показатели ее были равны 35,2 на 100 тыс. населения. Корреляционной связи между изучаемыми явлениями выявлено не было ($r = 0,03$; $p < 95\%$). Во второй временной период заболеваемость шигеллезом Зонне также в отдельные годы регистрировалась не во всех районах и городах Приморья. Среднемноголетний показатель стал равен 16,7 на 100 тыс. населения. Достоверной корреляционной связи выявлено не было ($r = 0,14$; $p < 95\%$).

Как известно, важную роль в развитии эпидемического процесса кишечных инфекций играют детские дошкольные организованные коллективы. Именно в этих коллективах преимущественно формируются эпидемические варианты гепатита А и шигеллезом [2]. В частности, А.Я. Миндлин [5], этот фактор был выделен как один из ведущих по влиянию на показатели заболеваемости указанными инфекциями. Поэтому на втором этапе наших исследований, мы проанализировали и влияние доли детей до 6 лет в демографической структуре населения различных административных территорий края, посещающих дошкольные учреждения, на показатели заболеваемости указанными инфекциями совокупного населения этих районов.

Результаты исследования показали (табл. 2), что в первый и во второй временные периоды достоверная прямая слабая корреляционная связь была выявлена при шигеллезе Флекснера и гепатите А.

Таким образом, наши исследования позволили установить, что заболеваемость гепатитом А, шигеллезами Флекснера и Зонне в Приморском крае имеет выраженную тенденцию к снижению. При этом со снижением заболеваемости уменьшается количество территорий, на которых эти инфекции ранее были зарегистрированы. На региональном уровне эпидемического процесса указанных нозоформ в первый временной период была выявлена прямая сильная корреляционная связь между долей детского населения до 14 лет в среднем по краю в каждом году, долей детей до 6 лет, посещающих дошкольные учреждения, и ежегодными показателями заболеваемости совокупного населения Приморья. Во второй временной период только при шигеллезе Флекснера была установлена прямая средней силы корреляционная связь между изучаемыми явлениями. Кроме того прямая средней силы корреляционная связь между долей детей до 14 лет в демографической структуре населения отдельных административных районов Приморского края и показателями заболеваемости указанными инфекциями совокупного населения этих территорий прослеживается только при гепатите А в период повышенной заболеваемости (1995–1999 гг.). И, наконец, доля детей до 6 лет, посещающих дошкольные детские учреждения в тех или иных административных территориях края, существенного влияния на показатели заболеваемости анализируемыми инфекциями совокупного населения, как в первом, так и во втором временных периодах, — не оказывала (табл. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Демографическая структура населения и динамика заболеваемости антропонозными инфекционными болезнями / А.Н. Герасимов [и др.] // Вестник Российской АМН. — 2010. — № 11. — С. 34–37.
2. Закономерности и особенности эпидемического процесса вирусного гепатита А и дизентерии Флекснера / И.В. Федорова [и др.] // Вестник Российской ВМА. — 2008. — Приложение 2 (22). — С. 424–425.
3. Зуева А.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. — СПб: ООО «Изд-во Фолиант», 2006.

4. Интеграционный подход к изучению пространственного распространения гепатита А и дизентерии Флекснера в Приморском крае / А.А. Яковлев [и др.] // Тихоокеанский мед. журнал. — 2010. — № 3. — С. 51–55.

5. Миндлина А.Я. Факторы, определяющие эпидемиологические особенности антропонозов с различным механизмом передачи в современных условиях // Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека (труды конференции). — СПб., 2012. — С. 27–28.

6. Миндлина А.Я., Полибин Р.Н. Демографическая структура населения и уровни заболеваемости гепатитом А в России и за рубежом // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 2. — С. 4–7.

7. Михайлов М.И., Шахгильдян И.В., Онищенко Г.Г. Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика). — М.: ФГОУ «Росздрава», 2007.

8. Молочный В.П. Динамика инфекционной заболеваемости населения Дальнего Востока в период 2002–2007 годов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. — 2008. — № 3. — С. 4–8.

Сведения об авторах

Яковлев Анатолий Александрович – д.м.н., профессор, профессор каф. эпидемиологии и военной эпидемиологии ГОУ ВПО ВГМУ Минздравсоцразвития России (690050, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2; e-mail: yakovlev-epid@yandex.ru)

Чекунина Светлана Наильевна – аспирант каф. эпидемиологии и военной эпидемиологии ГОУ ВПО ВГМУ Минздравсоцразвития России (690050, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2; e-mail: snch82@mail.ru)

Кравцов Илья Александрович – клинический интерн каф. эпидемиологии и военной эпидемиологии ГОУ ВПО ВГМУ Минздравсоцразвития России (690050, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

А.А. Чушкина, Н.М. Корецкая

**ПАТОМОРФОЗ ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ
ЗА 20-ЛЕТНИЙ ПЕРИОД****Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
(Красноярск)**

Изучен возрастно-половой и социальный состав впервые выявленных больных инфильтративным туберкулезом легких, характеристика развившегося у них специфического процесса и его клинические проявления в три периода, охватывающих 20-летний срок наблюдения (1989 г. — 105 больных, 2004 г. — 161 больной, 2009 г. — 399 больных). Установлено, что за 20 лет инфильтративный туберкулез подвергся выраженному патоморфозу, который проявился увеличением среди заболевших доли лиц старших возрастных групп и женщин, возрастанием роли экзогенной суперинфекции и сопутствующих заболеваний группы риска в его патогенезе, ростом объема поражения при неизменившейся частоте деструкции и бактериовыделения. В динамике констатируется увеличение частоты первичной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза и утяжеление ее структуры. Выделены особенности клинико-лабораторных проявлений инфильтративного туберкулеза легких в современных условиях.

Ключевые слова: патоморфоз, инфильтративный туберкулез легких

**PATHOMORPHISM OF INFILTRATIVE PULMONARY TUBERCULOSIS
FOR A 20-YEAR PERIOD**

A.A. Chushkina, N.M. Koretskaya

Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk

Pattern of age, sex and social composition of newly diagnosed patients with infiltrative pulmonary tuberculosis was studied as well as characteristic features of the developed particular process and its clinical manifestations in three phases, covering a 20-year period of observation (1989 — 105 patients, 2004 — 161 patients, 2009 — 399 patients). It was found that for 20 years infiltrative tuberculosis was subjected to significant pathomorphism, which showed an increase in the proportion of cases among persons of older age groups and women, an increasing role of exogenous superinfection and concomitant diseases of the risk group in its pathogenesis, growth of damage at a constant rate of destruction and bacterioexcretion. It is stated that in the dynamics there is an increase in frequency of primary drug resistance in tuberculosis Mycobacterium and the loading of its structure. The features of clinical and laboratory manifestations of infiltrative pulmonary tuberculosis are distinguished in modern conditions.

Key words: pathomorphism, infiltrative pulmonary tuberculosis

Экономический кризис 90-х годов XX века привел к значительному ухудшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу в нашей стране. Именно к этому периоду относят начало негативной фазы патоморфоза данного заболевания, продолжающейся по настоящее время [1]. Патоморфоз туберкулеза сегодня характеризуется не только ростом количественных эпидемиологических показателей, но и глубокими качественными изменениями самого возбудителя, структуры форм заболевания, его осложнений, причин смерти и патоморфологических проявлений [3, 5, 6, 7].

В этой связи проявления патоморфоза туберкулеза и особенно доминирующей клинической его формы — инфильтративного туберкулеза легких [4] — необходимо изучать и учитывать в процессе клинической и патоморфологической практики [2].

Цель исследования: изучить проявления патоморфоза инфильтративного туберкулеза легких в динамике за 20-летний период.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В разработку взяты данные из историй болезни 665 больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких, проходящих

стационарное лечение в Красноярском краевом противотуберкулезном диспансере №1: I группа — 105 чел, лечившихся в 1989 году, II — 161 чел, в 2004 г., III — 399 чел, в 2009 г. Изучался возрастно-половой и социальный состав больных, наличие вредных привычек, сопутствующих заболеваний группы риска, контакта с больными туберкулезом, характеристика процесса (протяженность поражения, частота распада и бактериовыделения), а также лекарственная устойчивость возбудителя, пути выявления заболевания, частота и выраженность клинических проявлений, изменения в гемограмме.

Результаты исследования были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа. Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию t Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В I и III группах больных максимальный процент заболевших (соответственно $33,3 \pm 4,6\%$ и $26,3 \pm 2,2\%$) наблюдался в возрасте 20—29 лет

(табл. 1), во II он пришелся на возраст 40–49 лет ($35,4 \pm 3,8\%$). Также во II группе, по сравнению с I, выше была доля лиц 50–59 лет ($21,1 \pm 3,2\%$ против $9,5 \pm 2,9\%$; $p < 0,01$), что свидетельствует о «постарении» данной формы туберкулезного процесса в начале XXI века, что отмечено и другими авторами [3]. Однако, в динамике к 2009 г. (III группа) вновь имел место факт «омоложения» инфильтративного туберкулеза легких (перемещение максимальной доли заболевших на возраст 20–29 лет и снижение удельного веса таковых в возрастной группе 40–49 лет до $20,8 \pm 2,0\%$ с $35,4 \pm 3,8\%$ во II; $p < 0,001$), но все же доля заболевших старше 40 лет в III группе оставалась более высокой, чем в I.

Мужчины по группам составили соответственно $70,5 \pm 4,5\%$, $57,8 \pm 3,9\%$ и $63,2 \pm 2,4\%$, при соотношении с женщинами 2,4:1, 1,4:1 и 1,7:1, т.е. во II группе просматривался четкий рост доли женщин среди заболевших, на что имеются указания и в литературе [6], и хотя в III группе это соотношение, по сравнению со II, увеличилось, оно не достигло такового в I группе. Во всех группах преобладали сельские жители: $62,9 \pm 4,7\%$, $66,5 \pm 3,7\%$ и $62,9 \pm 2,4\%$.

Сравнение образовательного уровня больных показало, что в динамике снизился удельный вес лиц, имеющих начальное и незаконченное среднее образование (с $42,9 \pm 4,8\%$ в I до $27,3 \pm 3,5\%$ во II и до $22,1 \pm 2,1\%$ в III; $p < 0,05$) и увеличился, — с высшим (с $1,9 \pm 1,3\%$ в I до $8,1 \pm 2,2\%$ во II и до $8,5 \pm 1,4\%$ в III; $p < 0,001$), т.е. туберкулез стал подниматься вверх по социальной лестнице. В соответствии с ростом образовательного ценза уменьшилась доля лиц, занимающихся физическим трудом с $55,2 \pm 4,8\%$ в I группе до $29,3 \pm 3,6\%$ во II и до $25,3 \pm 2,2\%$ в III ($p < 0,001$). Особо следует отметить рост доли неработающих лиц трудоспособного возраста с $13,3 \pm 3,3\%$ в I группе до $46,0 \pm 3,9\%$ во II; в III группе она составила $44,4 \pm 2,5\%$ ($p_{I-III} < 0,001$).

Вредные привычки были распространены у больных трех групп: страдали хроническим алкоголизмом или злоупотребляли алкоголем $29,4 \pm 4,4\%$ больных I группы, $24,8 \pm 3,4\%$ — II; в III группе их доля снизилась до $9,5 \pm 1,5\%$ ($p_{I-III} < 0,001$). Курили по группам соответственно $60,9 \pm 4,8\%$, $63,4 \pm 3,8\%$ и $71,4 \pm 2,3\%$.

В развитии инфильтративного туберкулеза легких во II и III группах больных резко возросла роль семейных и родственных контактов: в I группе они имели место в $7,6 \pm 2,6\%$, во II — в $26,3 \pm 3,1\%$ ($p_{I-II} < 0,01$), в III — $34,6 \pm 2,4\%$ ($p_{I-III} < 0,001$), что свидетельствует о возросшей значимости экзогенной суперинфекции в развитии этой формы специфического процесса. Констатируется и увеличение доли лиц с сопутствующими заболеваниями группы риска с $33,3 \pm 4,4\%$ в I группе до $44,1 \pm 3,9\%$ во II и до $47,9 \pm 2,5\%$ в III ($p_{I-III} < 0,05$).

Сравнительный анализ объема поражения легочной ткани показал (табл. 2), что в I группе инфильтративный туберкулез характеризовался преобладанием ограниченных моно- и бисегментарных процессов ($58,1 \pm 4,8\%$), удельный вес которых во II группе больных снизился до $34,2 \pm 3,7\%$ ($p < 0,001$). Несмотря на то, что в III группе удельный вес таких процессов составил $42,9 \pm 2,5\%$, он был ниже чем в I ($p < 0,01$); во II и III группах преобладали долевые и более доли поражения (соответственно $65,8 \pm 3,7\%$ и $57,1 \pm 2,5\%$).

Особенно показателен в динамике рост удельного веса распространенных процессов, захватывающих более доли легкого: так, если в I группе он составил $3,9 \pm 1,9\%$, то в II — $18,6 \pm 3,1\%$ ($p_{I-II} < 0,001$) и остался без изменений в III — $15,5 \pm 1,8\%$ ($p_{II-III} > 0,05$). Несмотря на увеличение объема поражения легочной ткани в динамике, значимых различий в частоте ее деструкции по группам установить не удалось ($73,3 \pm 4,3\%$ в I группе, $77,6 \pm 3,3\%$ — во II, $69,9 \pm 2,3\%$ — в III; $p > 0,05$) (табл. 2) и полученные нами данные отличаются от литературных [4], в которых отмечено увеличение частоты деструкции при инфильтративном туберкулезе легких в современных условиях. Не изменилась и частота бронхогенного обсеменения (табл. 2).

Оставалась стабильной и доля бактериовыделителей (табл. 2), но изменились биологические свойства возбудителя, что проявилось ростом первичной лекарственной устойчивости (ПЛУ) с $13,3 \pm 3,9\%$ в I группе до $33,6 \pm 4,2\%$ во II ($p_{I-II} < 0,01$) и до $49,3 \pm 3,0\%$ в III ($p_{II-III} < 0,01$). Следует отметить, что в I группе ПЛУ была представлена лишь монорезистентностью; во II она была отмечена лишь у $8,6 \pm 2,5\%$ больных, имеющих ПЛУ; у $14,8 \pm 3,1\%$

Таблица 1
Возрастная структура больных инфильтративным туберкулезом легких (абс., $M \pm m$, %)

Группа больных	Возраст, годы					
	18–19	20–29	30–39	40–49	50–59	60 и старше
I, $n = 105$	9 $8,6 \pm 2,7$	35 $33,3 \pm 4,6$	28 $26,7 \pm 4,3$	18 $17,1 \pm 3,7$	10 $9,5 \pm 2,9$	5 $4,8 \pm 2,1$
II, $n = 161$	7 $4,3 \pm 1,6$	21 $13,0 \pm 2,7$	31 $19,3 \pm 3,1$	57 $35,4 \pm 3,8$	34 $21,1 \pm 3,2$	11 $6,8 \pm 2,0$
III, $n = 399$	25 $6,3 \pm 1,2$	105 $26,3 \pm 2,2$	90 $22,6 \pm 2,1$	83 $20,8 \pm 2,0$	73 $18,3 \pm 1,9$	23 $5,8 \pm 1,2$
p_{I-II}	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,001$	$< 0,01$	$> 0,05$
p_{II-III}	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$
p_{I-III}	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$

Таблица 2

Характеристика туберкулезного процесса и пути его выявления у больных инфильтративным туберкулезом легких (абс., $M \pm m$, %)

Группа больных	Характеристика туберкулезного процесса						Пути выявления	
	Объем поражения			фаза распада	бронхогенное обсеменение	бактерио-выделение	ПФЛГО	при обращении
	1/2 сегмента	доля	более доли					
I, $n = 105$	61 $58,1 \pm 4,8$	40 $38,0 \pm 4,7$	4 $3,9 \pm 1,9$	77 $73,3 \pm 4,3$	36 $34,3 \pm 4,6$	75 $71,4 \pm 4,4$	39 $37,2 \pm 4,7$	66 $62,8 \pm 4,7$
II, $n = 161$	55 $34,2 \pm 3,7$	76 $47,2 \pm 3,9$	30 $18,6 \pm 3,1$	125 $77,6 \pm 3,3$	60 $37,3 \pm 3,8$	128 $79,5 \pm 3,2$	78 $48,5 \pm 3,9$	83 $51,6 \pm 3,9$
III, $n = 399$	171 $42,9 \pm 2,5$	166 $41,6 \pm 2,5$	62 $15,5 \pm 1,8$	279 $69,9 \pm 2,3$	144 $36,1 \pm 2,4$	293 $73,4 \pm 2,2$	223 $55,9 \pm 2,5$	176 $44,1 \pm 2,5$
p_{I-II}	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
p_{II-III}	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
p_{I-III}	$< 0,01$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,001$	$< 0,001$

Таблица 3

Частота клинических проявлений инфильтративного туберкулеза легких (абс., $M \pm m$, %)

Группа	Клинические симптомы								
	Слабость	Повышение температуры	Потливость	Похудание	Кашель сухой	Кашель с мокротой	Боли в грудной клетке	Одышка	Кровохарканье
I, $n = 105$	52 $49,5 \pm 4,9$	39 $37,1 \pm 4,7$	34 $32,4 \pm 4,6$	22 $20,9 \pm 4,0$	13 $12,4 \pm 3,2$	51 $48,6 \pm 4,9$	25 $23,8 \pm 4,2$	13 $12,4 \pm 3,2$	3 $2,8 \pm 1,5$
II, $n = 161$	65 $40,4 \pm 3,9$	31 $19,3 \pm 3,1$	16 $9,9 \pm 2,4$	26 $16,2 \pm 2,9$	12 $7,5 \pm 2,1$	65 $40,4 \pm 3,9$	13 $8,1 \pm 2,2$	41 $25,5 \pm 3,4$	4 $2,5 \pm 1,2$
III, $n = 399$	143 $35,8 \pm 2,4$	137 $34,3 \pm 2,3$	31 $7,8 \pm 1,3$	102 $25,6 \pm 2,2$	58 $14,5 \pm 1,8$	147 $36,8 \pm 2,4$	76 $19,0 \pm 2,0$	86 $21,6 \pm 2,1$	18 $4,5 \pm 1,0$
p_{I-II}	$> 0,05$	$< 0,01$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,01$	$< 0,01$	$> 0,05$
p_{II-III}	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$
p_{I-III}	$< 0,01$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$	$> 0,05$

имела место полирезистентность, а у $10,2 \pm 2,7$ % — множественная лекарственная устойчивость (МЛУ); в III группе соответствующие показатели составили $9,1 \pm 1,7$ %; $14,3 \pm 2,1$ %; $25,9 \pm 2,6$ %. Таким образом, в динамике за 20-летний период отмечается не только рост частоты ПЛУ возбудителя, но и утяжеление ее структуры, что еще раз подтверждает возросшую роль экзогенной суперинфекции в патогенезе ИТЛ в современных условиях.

Анализ путей выявления заболевания в динамике показал рост доли активно выявленных больных с $37,2 \pm 4,7$ % в I группе до $48,5 \pm 3,9$ % — во II и до $55,9 \pm 2,5$ % в III группе ($p_{I-III} < 0,01$) (табл. 2).

Важной особенностью инфильтративного туберкулеза, выявленной нами, является тенденция к нарастанию удельного веса внелегочных локализаций специфического процесса в динамике: в I группе он составил $5,7 \pm 2,3$ %, во II — $6,8 \pm 2,0$ %, в III — $10,3 \pm 1,5$ % ($p > 0,05$).

Изучение клинических проявлений инфильтративного туберкулеза показало, что за 20-летний период имело место снижение частоты таких симптомов интоксикации как слабость, потливость, т.е. наблюдался диссонанс между нарастанием объема поражения легочной ткани и выраженностью этих

симптомов. На наш взгляд, это может быть связано с двумя факторами: во-первых, с неизменившейся частотой деструкции легочной ткани, а во-вторых, с менее внимательным отношением к своему здоровью, имеющимся у заболевших в современных условиях. Обращает на себя внимание возросшая в 2 раза частота одышки у больных II и III групп, по сравнению с I (табл. 3), что подтверждает роль обширности поражения в возникновении данного симптома.

Сравнение данных, полученных при физикальном обследовании больных трех групп, выявило возросшую частоту измененного характера дыхания: $53,3 \pm 4,9$ % в I группе, $76,4 \pm 3,4$ % во II ($p_{I-II} < 0,001$) и $70,9 \pm 2,3$ % в III ($p_{II-III} > 0,05$). Катаральные явления в легких в динамике, наоборот, стали констатироваться реже: так, если в I группе они определялись у $38,0 \pm 4,7$ %, то во II лишь у $26,1 \pm 3,5$ % ($p_{I-II} < 0,05$), а в III у $25,6 \pm 2,2$ % ($p_{I-III} < 0,01$).

Изменения в гемограмме во все периоды наблюдения проявлялись характерными для туберкулезного процесса изменениями: лейкоцитозом, лимфопенией, увеличением СОЭ (табл. 4). Однако частота лейкоцитоза во II и III группах больных значительно снизилась (с $61,8 \pm 4,7$ % в I группе

Таблица 4

Изменения гемограммы у больных инфильтративным туберкулезом легких (абс., $M \pm m$, %)

Группа больных	Лейкоцитоз	Сдвиг лейкоцитарной формулы влево	Лимфопения	Моноцитоз	Увеличение СОЭ
I, $n = 105$	65 $61,8 \pm 4,7$	8 $7,6 \pm 2,6$	30 $28,6 \pm 4,4$	25 $23,8 \pm 4,2$	48 $45,7 \pm 4,9$
II, $n = 161$	45 $28,0 \pm 3,5$	1 $0,6 \pm 0,6$	79 $49,1 \pm 3,9$	52 $32,3 \pm 3,7$	79 $49,1 \pm 3,9$
III, $n = 399$	132 $33,1 \pm 2,4$	31 $7,8 \pm 1,3$	187 $46,9 \pm 2,5$	101 $25,3 \pm 2,2$	176 $44,1 \pm 2,5$
p_{I-II}	$< 0,001$	$< 0,01$	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,05$
p_{II-III}	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
p_{I-III}	$< 0,001$	$> 0,05$	$< 0,001$	$> 0,05$	$> 0,05$

до $28,0 \pm 3,5$ % во II, составив в III — $33,1 \pm 2,4$ %; $p_{I-II} < 0,001$, $p_{I-III} < 0,001$), а частота лимфопении, наоборот, выросла (с $28,6 \pm 4,4$ % в I группе до $49,1 \pm 3,9$ %, во II, а в III составила $46,9 \pm 2,5$ %; $p_{I-II} < 0,001$, $p_{I-III} < 0,001$), что свидетельствует о нарастании иммунодефицита у больных инфильтративным туберкулезом легких в динамике. Необходимо отметить низкую частоту сдвига лейкоцитарной формулы влево у больных всех групп, которая, соответственно, составила $7,6 \pm 2,6$ %, $0,6 \pm 0,6$ %, $7,8 \pm 1,3$ %.

Таким образом, за 20-летний период инфильтративный туберкулез подвергся значительному патоморфозу: в структуре заболевших: увеличилась доля лиц в возрасте 40 лет и старше, изменилось соотношение мужчин и женщин в сторону роста последних, изменилась и социальная структура больных. В патогенезе инфильтративного туберкулеза повысилась роль экзогенной суперинфекции, заболеваний группы риска и иммунодефицита. Специфический процесс стал характеризоваться обширностью поражения при сохранившейся неизменно высокой частоте деструкции легочной ткани. Несмотря на то, что частота бактериовыделения в динамике практически не изменилась, микобактерии туберкулеза почти в половине случаев стали обладать ПЛУ с высоким уровнем полирезистентности и особенно МЛУ. В современных условиях заслуживает внимания наличие диссонанса между объемом поражения легочной ткани и выраженностью интоксикационного синдрома, и, наоборот, его соответствие частоте такого бронхолегочного симптома, как одышка, а в гемограмме, — снижение частоты лейкоцитоза и рост частоты лимфопении.

Сведения об авторах

Чушкина Анна Александровна — ассистент кафедры туберкулеза с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб. 8(391) 261-76-82, факс 8(391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Корецкая Наталия Михайловна — профессор, зав. кафедрой туберкулеза с курсом ПО ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб. 8(391) 261-76-82, факс 8(391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

ЛИТЕРАТУРА

1. Гринберг Л.Г. Актуальные вопросы патологии во фтизиатрии // Актуальные вопросы лечения туберкулеза различной локализации: Научные труды Всероссийской науч.-практ. конференции. — СПб., 2008. — С. 224—227.
2. Гринберг Л.М. Актуальные проблемы патологии микобактериальных инфекций // Фтизиатрия и пульмонология. — 2011. — № 1. — С. 102—109.
3. Егоров О.Н. Возрастной аспект патоморфоза в последнее десятилетие по материалам аутопсийных исследований // Уральский медицинский журнал. — 2009. — № 4. — С. 77—79.
4. Лучевые методы в диагностике инфильтративного туберкулеза легких и остаточных изменений после его излечения / А.А. Криштафович [и др.] // Актуальные вопросы лечения туберкулеза различной локализации: Научные труды Всероссийской науч.-практ. конференции. — СПб., 2008. — С. 247—252.
5. Патолого-анатомическая диагностика основных форм туберкулеза (по данным секционных исследований) / В.В. Ерохин [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2008. — № 7. — С. 54—64.
6. Патоморфоз легочного туберкулеза (по патологоанатомическим данным) / В.П. Нефедов [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2009. — № 5. — С. 57—60.
7. Цыганкова Е.А. Патоморфоз клинических форм туберкулеза у детей Омской области // Сибирское медицинское обозрение. — 2012. — № 1. — С. 73—76.

Е.А. Шмелева ¹, С.М. Попкова ², Т.Н. Фирсова ¹, Л.В. Сердюк ², Е.Б. Ракова ², М.М. Губин ³

СОДЕРЖАНИЕ ПРОТИВОДИФТЕРИЙНЫХ АНТИТОКСИЧЕСКИХ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ ЗДОРОВЫХ ВЗРОСЛЫХ ЛЮДЕЙ

¹ Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)² Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)³ ООО «Фирма «ВИПС-МЕД» (Москва)

В статье с использованием метода биномиального распределения анализируется напряженность популяционного антитоксического (АТ) и антибактериального (АБ) иммунитета к дифтерии по уровню специфических противодифтерийных антител в сыворотках крови здоровых взрослых людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в России и Италии. Последняя, в отличие от России, в годы эпидемии имела лишь единичные случаи заболевания дифтерией.

Для популяции людей из Италии определялись оптимальные показатели напряженности АТ иммунитета (бимодальное распределение концентраций АТ антител), в то время как для популяции взрослых из России отмечалась аномально высокая перенапряженность АТ иммунитета (отсутствие бимодального распределения). Уровень концентрации АБ антител изотипов М, G, А в обеих странах соответствовал синтезу общих иммуноглобулинов этих изотипов в онтогенезе: так, в сыворотках крови взрослых в возрасте от 20 до 40 лет преобладают АБ антитела изотипа G. Низкие показатели концентрации антитоксина в крови большинства взрослых людей, проживающих в Италии, восполняются высоким содержанием в этих же сыворотках АБ IgG и оптимальными концентрациями АБ IgM и IgA, что свидетельствует о возможности отмены массовой ревакцинации взрослых и создания индивидуального подхода к ревакцинации взрослого населения. Оптимальное бимодальное распределение АБ антител в популяции здоровых взрослых людей, как в РФ, так и в Италии, является дополнительной противодифтерийной защитой к антитоксической резистентности.

Ключевые слова: дифтерия, вакцинопрофилактика, антитоксические антитела, антибактериальные антитела, популяционный анализ, бимодальное распределение.

CONTENTS DIPHTHERIA ANTITOXIC AND ANTIBACTERIAL ANTIBODIES IN THE SERUM OF HEALTHY ADULTS

Е.А. Shmeleva ¹, S.M. Popkova ², T.N. Firsova ¹, E.B. Rakova ², L.V. Serdyuk ², M.M. Gubin ³¹ Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk³ Firm "VIPS-MED" Ltd, Moscow

In the article using the binomial distribution analysis of the intensity of population antitoxic (AT) and anti-bacterial (AB) of immunity to diphtheria in terms of specific diphtheria antibodies in the sera of healthy adults aged 20 to 51 years and older, living in Russia and Italy. The latter, in contrast to Russia, during the epidemic was only a few cases of diphtheria. For the population of people from Italy the optimal parameters of tension antibody immunity (bimodal distribution of the concentrations of AT antibodies) are determined, whereas for the adult population of Russia experienced an abnormally high overvoltages antibody immunity (lack of bimodal distribution). The level of concentration of antibody isotypes AB M, G, A in both countries match the total synthesis of immunoglobulin isotypes in the ontogeny of these: thus, in the sera of adults aged 20 to 40 years AB antibody IgG prevail. Low concentrations of antitoxin in the blood of most adults living in Italy, recharged high AB IgG in these same serum and optimal concentrations of AB IgM and IgA. This indicates the possibility lifting the mass revaccination of adults, and creating an individual approach to their boosters. Optimal bimodal distribution of AB antibodies in the population of healthy adults, both in Russia and in Italy, is an additional protection to the diphtheria antitoxic resistance.

Key words: diphtheria immunizations, antitoxic antibodies, anti-bacterial antibodies, population analysis, a bimodal distribution

Проведение профилактических прививок дифтерийным анатоксином создает антитоксический иммунитет и спасает от заболевания дифтерией. Вместе с тем в иммунных коллективах продолжается свободная циркуляция *C. diphtheriae* tox+ и tox- [4, 14, 15, 17]. Носительство, а, следовательно, и колонизация коринебактериями слизистых носоглотки человека с последующей передачей другим индивидуумам являются резервуаром сохранения вида в природе. Единая видовая принадлежность, а также общность антигенов клеточной стенки позволяют считать *C. diphtheriae* tox+ и tox- частью

симбионтного микробиоценоза человека. Привнесение гена tox+ в *C. diphtheriae* tox- не меняет общей схемы генома микробной клетки [3, 5, 16]. Развитие популяций *C. diphtheriae* контролируется иммунными механизмами, которые, выполняя роль фактора аутостабилизации в симбионтной системе, оказывают лимитирующее воздействие на популяции коринебактерий. Наряду с антитоксином в крови людей определяются и антибактериальные противодифтерийные антитела. Широкий диапазон показателей их концентрации в сыворотках крови является отражением интенсивности сти-

муляции иммунной системы бактериальными антигенами [6, 9, 16, 12].

Целью данной работы явилось определение противодифтерийных антитоксических (АТ) и антибактериальных (АБ) антител в сыворотках крови здоровых взрослых людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в России и Италии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Противодифтерийные АТ (IgG) и АБ (IgM, IgG, IgA) антитела определяли с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в абсолютных показателях (мкг/мл) [6, 8, 12]. В качестве антигена для антитоксических антител использовали очищенный несорбированный дифтерийный анатоксин, предоставленный ГИСК им. Л.А. Тарасевича. В качестве антигена для определения антибактериальных антител использовали бактериальную субклеточную вакцину Кодивак, состоящую из антигенов клеточных стенок *C. diphtheriae* tox- пептидополисахаридной природы [16]. Для определения АТ IgG и АБ IgM, IgG, IgA использовали конъюгат антител к μ -, γ -, α -цепям иммуноглобулина человека, меченных пероксидазой хрена (производство компании «Сорбент»). Изучение АТ и АБ антител проводили в сыворотках крови здоровых взрослых людей — доноров из России и Италии. Всего изучено АТ IgG в 108, IgM — в 262, IgG — в 262, IgA — в 252 пробах сывороток крови.

Расчет количества АТ и АБ антител (мкг/мл) в сыворотках крови проводили по компьютерной программе «MSFL ELA.exe» разработанной в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (Козлов Л.В., 1995). Для обработки полученных данных проводили среднеарифметический расчет показателей концентрации антител. Для оценки напряженности АТ и АБ иммунитета использовали метод популяционного анализа, который позволяет определить распределение показателей концентрации АТ и АБ иммуноглобулинов среди всего контингента взрослых людей в каждой стране [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ показателей концентрации АТ антител в сыворотках крови здоровых взрослых людей разных возрастных групп показал, что наибольшее содержание антитоксина зарегистрировано в сыворотках 20–30-летних взрослых людей из России (178 ± 16 мкг/мл, табл. 1). Содержание антитоксина

в сыворотках лиц этой же возрастной группы из Италии составляло 103 ± 32 мкг/мл, что примерно в 2 раза меньше, чем в России. Концентрация АТ антител в сыворотках людей, начиная с 31–40 лет, снижалась, и в группе 41–50-летних составляла 26 ± 11 мкг/мл (Россия), 49 ± 7 мкг/мл (Италия) (табл. 1). Наименьшая концентрация АТ антител определялась у лиц в возрасте 51 года и старше как из России, так и из Италии (по 29 ± 6 мкг/мл в обеих странах).

Таблица 1
Противодифтерийные антитоксические антитела в сыворотках здоровых взрослых людей различных возрастных групп

Страна	Возраст	Концентрация, мкг/мл	Кол-во сывороток
Россия	20–30	178 ± 16	25
	31–40	159 ± 18	25
	41–50	26 ± 11	7
	51 и старше	29 ± 6	10
Италия	20–30	103 ± 32	10
	31–40	60 ± 11	10
	41–50	49 ± 7	11
	51 и старше	29 ± 6	10

Таким образом, с увеличением возраста показатели концентрации антитоксина в крови здоровых взрослых людей, независимо от ревакцинации взрослых в России, уменьшались (табл. 1). Понятно, что высокая концентрация АТ антител в крови у лиц из России в возрасте 20–30 лет индуцирована, прежде всего, ревакцинацией, проводимой через 10 лет после ревакцинации подростков в 14 лет согласно Национальному календарю профилактических прививок [1].

Повышенные концентрации антитоксина в крови ревакцинированных взрослых, так же, как и высокие концентрации, определяемые у носителей *C. diphtheriae* tox+, отражают гипериндукцию АТ антител, большую напряженность гуморального иммунитета, который в то же время не препятствует персистенции возбудителя в организме. Известно, что у длительных носителей показатели не только гуморального, но и клеточного звена иммунитета отличаются от нормы составом лимфоцитов, повышенным содержанием В-клеток, высоким уровнем IgG и IgE [11, 16, 12]. У таких

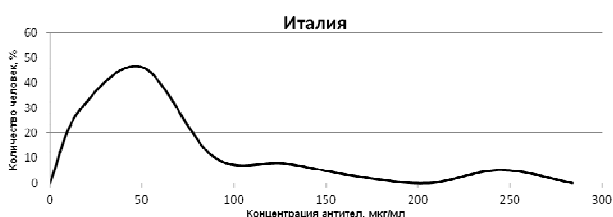
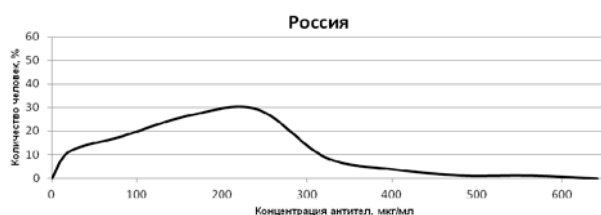


Рис. 1. Профили распределения в популяции показателей концентрации противодифтерийных антитоксических антител, содержащихся в сыворотках взрослых людей.

индивидуумов состояние иммунореактивности можно охарактеризовать как вторичное иммунодефицитное, сопровождающееся, как правило, патологией ротоглотки и ее микродисбиозом [2, 7, 13].

Напряженность АТ иммунитета в популяциях взрослых определяли с помощью расчета биномиального вариационного ряда распределения признака [10]. Анализ показал, что в Италии профиль распределения показателей концентрации АТ антител является бимодальным. Значительная часть взрослого населения этой страны содержала антитела в низких концентрациях (от 12 до 100 мкг/мл, 1-й модальный пик), и меньшая — в более высоких концентрациях (2-й модальный пик). Профили распределения показателей концентрации АТ антител у лиц из Италии практически соответствуют нормальному бимодальному эволюционно закрепленному вариационному ряду, что является отражением оптимальной напряженности противодифтерийного АТ иммунитета [1].

В популяции взрослых из России профиль распределения концентрации АТ антител отличается от нормального распределения, характерного для взрослых из Италии. Первый модальный пик представляет собой удлинненное плато, отражающее наличие большого количества людей в популяции с высокой концентрацией антитоксина (от 100 до 400 мкг/мл), что свидетельствует о гипернатяженности АТ иммунитета. Показатели концентрации 2-го модального пика сливаются с показателями 1-го. Бимодальное распределение признака в этих группах индивидуумов отсутствует. При том, что ситуация считается нормальной, когда большее количество людей в популяции обладает оптимальным ответом на любое антигенное воздействие, то есть у большего процента людей в популяции концентрация индуцированных антител умеренная (1-й модальный пик), а у меньшего процента — выше оптимальной нормы (2-й модальный пик).

Итак, использование метода биномиального распределения показывает, что оптимальная напряженность АТ иммунитета достигается при бимодальном распределении показателей концентрации АТ антител в популяции взрослых людей. От-

сутствие бимодального распределения показателей концентрации АТ антител в популяции (Россия), т.е. наличие большого количества людей с высокими и гипервысокими концентрациями антитоксина в крови приводит к снижению напряженности коллективного АТ иммунитета. Бимодальное распределение показывает, что вне зависимости от возраста количество людей с оптимальными невысокими концентрациями антитоксина в крови составляет большинство (1-й модальный пик) в популяции Италии, в то время как в России — меньшинство. На иммунной структуре популяции неблагоприятно сказывается большая доля индивидуумов с гипертитрами антитоксина в крови, так как повышенный синтез АТ антител сопровождается изменением иммунной реактивности, формированием вторичного иммунодефицита, патологией дисбиотического состояния ротоглотки и носительством. Увеличение количества носителей повышает плотность циркуляции возбудителя среди населения. В популяции, где выявлены отклонения от бимодального распределения концентрации АТ антител, изменение иммунной структуры сопровождается снижением уровня специфической коллективной защиты. Подтверждением этому служит высокий уровень заболевших дифтерией в России (более 120 000 случаев за период с 1991 по 2008 гг.) по сравнению с Италией (4 случая за этот же период, с отсутствием таковых после 1996 г.) [18].

Известно, что синтез и количественный состав иммуноглобулинов разных изотипов определяется филогенетически и претерпевает различные изменения в онтогенезе. В первые годы жизни ребенка гуморальный ответ характеризуется повышенной продукцией макроглобулинов. С возрастом происходит переключение реакции гуморального иммунитета на синтез IgG, обеспечивающих противои инфекционную анитоксическую защиту. IgG, отсутствующие у новорожденных, появляются после трех месяцев жизни. Оптимальное их содержание в крови и секретах устанавливается к пубертатному возрасту, после которого к 18–20 годам происходит окончательное созревание иммунной системы и формируются сильный и слабый

Таблица 2
Антибактериальные противодифтерийные антитела в сыворотках здоровых взрослых людей

Страна	Возраст	IgM		IgG		IgA	
		Концентрация, мкг/мл	Количество человек	Концентрация, мкг/мл	Количество человек	Концентрация, мкг/мл	Количество человек
Россия	20–30	171 ± 16	91	385 ± 36	87	109 ± 8	89
	31–40	210 ± 24	28	820 ± 80	27	95 ± 15	27
	41–50	295 ± 62	19	474 ± 86	20	92 ± 17	15
	51 и старше	198 ± 32	9	386 ± 48	10	68 ± 12	8
Италия	20–30	185 ± 23	20	336 ± 38	18	119 ± 13	18
	31–40	172 ± 14	31	559 ± 63	36	114 ± 12	36
	41–50	179 ± 15	37	190 ± 18	37	142 ± 16	37
	51 и старше	113 ± 12	27	638 ± 87	27	146 ± 18	22

типы гуморального иммунного ответа, характерные для популяции здоровых взрослых людей [2, 7, 13].

В исследованных сыворотках крови здоровых взрослых лиц из России и Италии концентрация АБ IgM определялась от 171 ± 16 до 295 ± 62 мкг/мл и от 113 ± 12 до 185 ± 23 мкг/мл соответственно (табл. 2).

Профили распределения показателей концентрации АБ IgM у лиц из России и Италии соответствовали бимодальному, то есть у большого количества людей они определялись в концентрации в среднем 110 мкг/мл, у меньшего количества людей — 250–300 мкг/мл и у отдельных индивидуумов свыше 300 мкг/мл.

Концентрации АБ IgG определялись в сыворотках крови взрослых в более высоких концентрациях, чем IgM. Показатели концентрации АБ IgG составили для лиц из России от 385 ± 36 до 820 ± 80 мкг/мл, а для индивидуумов из Италии от 190 ± 18 до 638 ± 87 мкг/мл (табл. 2).

Профиль распределения показателей АБ IgG в популяции соответствовал бимодальному для контингентов из России и Италии, то есть у большинства индивидуумов из этих стран в сыворотках крови содержались оптимально низкие концентрации АБ IgG (1-ый модальный пик распределения), а у небольшого количества — высокие концентрации (2-й модальный пик).

Изучение содержания АБ IgA в сыворотках крови взрослых индивидуумов из России и Италии показало, что они, как и IgM, содержатся в более низких концентрациях, чем IgG. Так, показатели концентрации АБ IgA составили для лиц из России

от 68 ± 12 до 109 ± 8 мкг/мл, а для лиц из Италии — от 114 ± 12 и 146 ± 18 мкг/мл. В то же время из представленных в таблице 2 данных видно, что содержание АБ IgA в сыворотках крови взрослых из Италии значительно превышает содержание этих же антител в сыворотках взрослых из России. Причем у индивидуумов из Италии наблюдается тенденция к увеличению концентрации АБ IgA с возрастом, а в России — к снижению.

Бимодальное распределение показателей концентрации АБ IgA для этого контингента отсутствует, концентрации сливаются в сплошное плато высоких показателей. Бимодальное распределение показателей концентрации АБ IgA также отсутствует и для контингентов взрослых из России [1].

Таким образом, АБ антитела изотипов М, G, А содержатся в сыворотках крови людей из России и Италии в возрасте от 20 до 51 года и старше в широком диапазоне концентраций. Иммуноглобулины А и макроглобулины играют большую роль в антиколониционной, антибактериальной резистентности детского и взрослого организма. Основная функция IgA и sIgA — предотвращение проникновения в организм бактериальных антигенов с внешней поверхности слизистых оболочек. Значительные концентрации АБ противодифтерийных IgA, выявленные в сыворотках взрослых из России и Италии, свидетельствуют о высокой устойчивости к адгезии *C. diphtheriae*.

Таким образом, низкие показатели концентрации антитоксина в крови большинства взрослых людей, проживающих в Италии, восполняются

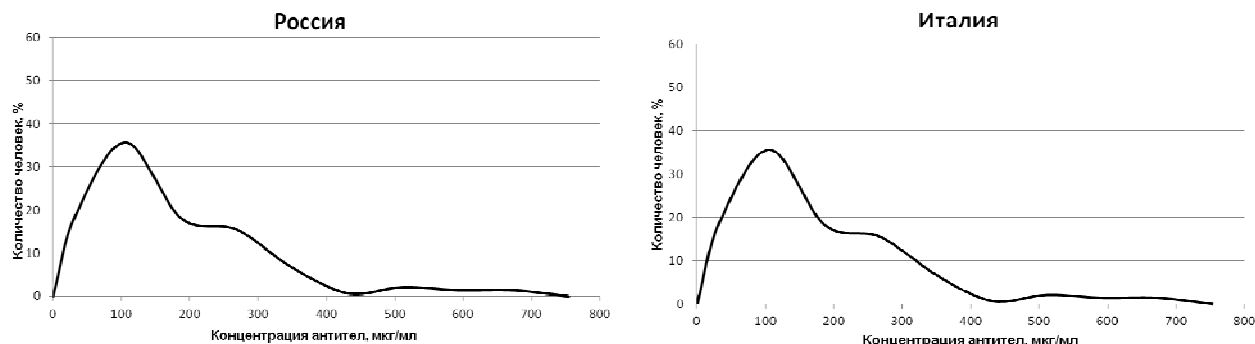


Рис. 2. Профили распределения в популяции показателей концентрации антибактериальных IgM, содержащихся в сыворотках взрослых.

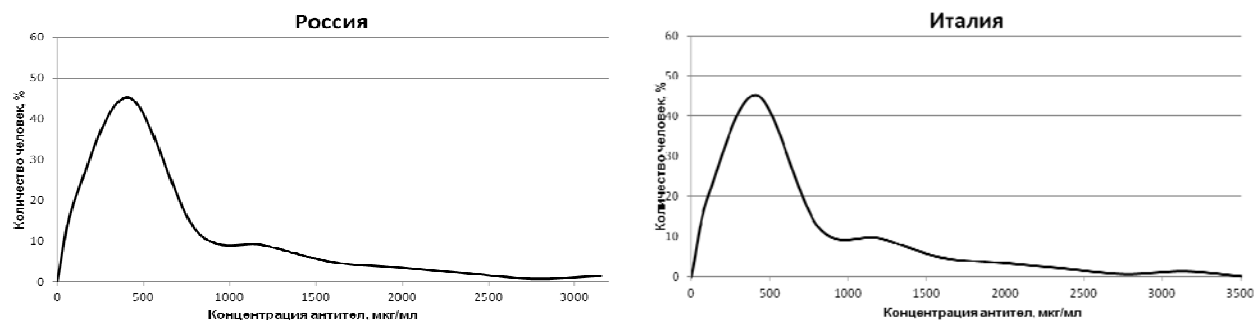


Рис. 3. Профили распределения в популяции показателей концентрации антибактериальных IgG, содержащихся в сыворотках взрослых.

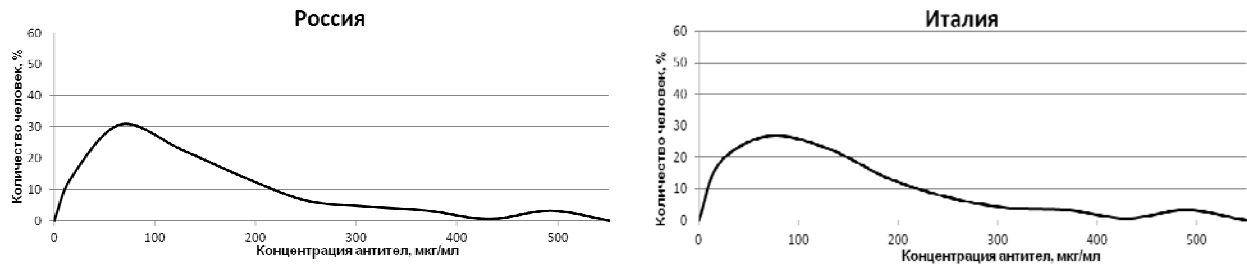


Рис. 4. Профили распределения в популяции показателей концентрации антибактериальных IgA, содержащихся в сыворотках взрослых.

высоким содержанием в этих же сыворотках АБ IgG и оптимальными концентрациями АБ IgM и IgA, что свидетельствует о возможности отмены массовой ревакцинации взрослых и создании индивидуального подхода к ревакцинации взрослого населения. Следовательно, напряженность популяционного АТ иммунитета должна соответствовать эволюционно закрепленному бимодальному распределению концентраций. Оптимальное содержание АБ IgG и IgM при низких концентрациях АТ IgG в этих же сыворотках свидетельствует о роли антибактериального иммунитета в создании антиколониционной резистентности к возбудителю дифтерии.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотках крови людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в России и Италии, выявляются АТ и АБ противодифтерийные антитела в концентрации от 29 ± 6 до 178 ± 16 и от 68 ± 12 (IgA) до 820 ± 80 мкг/мл (IgG) соответственно.
2. В сыворотках лиц в возрасте 20–40 лет из России, где проводится ревакцинация взрослых, концентрация антитоксических антител значительно выше, чем в этой же возрастной группе лиц из Италии. С увеличением возраста концентрация АТ-антител в сыворотках крови людей, как из России, так и из Италии, снижается и к 41–50 годам и старше регистрируется практически в одинаково низких показателях.
3. Для популяции людей из Италии определяются оптимальные показатели напряженности АТ иммунитета (бимодальное распределение концентраций АТ антител), в то время как для популяции взрослых из России отмечается аномально высокая перенапряженность АТ-иммунитета (отсутствие бимодального распределения).
4. Противодифтерийные АБ-антитела изотипов М, G, А определяются в сыворотках крови у всех людей в возрасте от 20 до 51 года и старше, проживающих в России и Италии. Уровень концентрации АБ антител изотипов М, G, А соответствует синтезу общих иммуноглобулинов этих изотипов в онтогенезе: так, в сыворотках крови взрослых в возрасте от 20 до 40 лет преобладают АБ антитела изотипа G.
5. Напряженность противодифтерийного иммунитета характеризуется содержанием в сыворотках крови как АТ-, так и АБ-антител, распределение показателей концентрации которых должно соответствовать бимодальному.
6. Оптимальное бимодальное распределение АБ антител в популяции здоровых взрослых людей, как в РФ, так и в Италии, свидетельствует о дополнительной противодифтерийной защите к антитоксической резистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антитоксические противодифтерийные антитела в сыворотках крови здоровых взрослых людей при разных схемах вакцинации / Е.А. Шмелева [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2012. — № 3 (85), Часть 2. — С. 241–248.
2. Вельтищев Ю.Е. Становление иммунной системы у детей. Иммунная недостаточность. Иммунодефекты // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. Приложение. Лекция 17. — № 21. — М., 1996.
3. Далин М.В., Фиш Н.Г. Белковые токсины микробов. — М.: Медицина, 1980.
4. Костюкова Н.Н., Кадырова Х.В., Гукасян Л.А. Патогенез дифтерийного бактерионосительства в микробиологическом и иммунологическом аспекте // Журнал микробиол. — 1973. — № 2. — С. 135–138.
5. Крылова М.Д. Биологические, генетические, эпидемиологические аспекты дифтерии и нормальная микрофлора человека // Журнал микробиол. — 1985. — № 3. — С. 37–45.
6. Макарова С.И. Выявление противодифтерийных антибактериальных антител с помощью ИФА: автореф. дис. канд. биол. наук. — М., 2005.
7. Медуницын Н.В. Вакцинология. — М.: Триада-Х, 2004.
8. Некоторые показатели иммунитета при дифтерийной инфекции / Е.А. Шмелева [и др.] // Эпидемиол. и вакцинопроф. — 2002. — № 3–4. — С. 31–35.
9. Печуркин Н.С. Популяционная микробиология. — Новосибирск: Наука, 1979.
10. Плохинский Н.А. Биометрия // Изд. Сибирского отд. АН СССР. — 1961. — С. 16–21.
11. Попкова С.М., Шмелева Е.А., Лещук С.И. Иммунитет и экологические аспекты бактерионосительства при дифтерии // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2005. — № 1. — С. 134–140.
12. Современный взгляд на старые истины о противодифтерийном иммунитете / Е.А. Шмелева

[и др.] // Эпидем. и вакцинопроф. — 2003. — № 2 (9). — С. 26 — 32.

13. Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е. Иммунология и иммунопатология детского возраста // Рук-во для врачей. — М.: Медицина, 1996.

14. Сухорукова Н.Л. Эпидемиологическая оценка дифтерийной инфекции в условиях высокого уровня противодифтерийного иммунитета : автореф. дисс. ... докт. мед. наук. — М., 1978. — 46 с.

15. Фаворова Л.А. Эпидемиологическое значение различных источников инфекций (на модели дифтерии и менингококкового менин-

гита) : автореф. дисс. ... докт. мед. наук. — М., 1967. — 39 с.

16. Шмелева Е.А. Биологическая функция антигенов клеточной стенки *C. Diphtheria* и научно-производственная разработка иммуномодулирующего препарата Кодивак : автореф. дис. ... докт. биол. наук. — М., 1991.

17. Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией. Методические указания. МУ 3.1.1082-01. Минздрав России — М., 2002.

18. <http://www.who.int/vaccines/globalsummary/immunization>.

Сведения об авторах

Шмелева Елена Александровна — профессор, доктор биологических наук, руководитель сектора иммуномодуляторов микробного отдела ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.; тел. +7 (495) 4521814; e-mail: elena.a.shmeleva@mail.ru)

Попкова София Марковна — доктор биологических наук, руководитель лаборатории микророзкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; р.т. 8(3952) 33-34-41; e-mail: smporkova@gmail.com)

Фирсова Татьяна Николаевна — научный сотрудник сектора иммуномодуляторов микробного отдела ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10; тел. +7 (495) 4521814)

Сердюк Людмила Викторовна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории микророзкологии, к.б.н. ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: radugarose@yandex.ru)

Ракова Елена Борисовна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории микророзкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: lenova@mail.ru)

Губин Михаил Михайлович — кандидат технических наук, генеральный директор ООО «Фирма «ВИПС-МЕД» (141190, Московская область, г. Фрязино, Заводской проезд, 4; тел. (495) 22-181-22; e-mail: market@vipsmed.ru)

Т.Н. Якимова, Н.М. Максимова, С.С. Маркина

ЭПИДСИТУАЦИЯ ПО ДИФТЕРИИ В РОССИИ И В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 2005–2011 гг.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

Представлен анализ состояния заболеваемости дифтерией в Российской Федерации с 2005–2011 гг., т.е. после проведения второй ревакцинации взрослых. Изучен уровень привитости и состояние популяционного иммунитета всего населения. Установлен высокий уровень защиты населения от дифтерии, что обеспечивает эпидблагополучие в стране в отношении этой инфекции.

Ключевые слова: дифтерия, заболеваемость, иммунитет

EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF DIPHTHERIA IN RUSSIA AND IN THE REGIONS OF THE RUSSIAN FEDERATION SINCE 2005 TO 2011

T.N. Yakimova, N.M. Maksimova, S.S. Markina

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow

The analysis of the incidence of diphtheria in the Russian Federation after the second revaccination of adults since 2005 to 2011 is presented. The level of the immunization and the state of population immunity were studied. The high level of protection against diphtheria was established. It provides positive epidemiological situation against this infection in the country.

Key words: diphtheria, incidence, immunity

Ослабление внимания к вопросам вакцино-профилактики и миграционные процессы в стране привели к вспышке дифтерийной инфекции в 90-е годы предыдущего столетия.

Пик заболеваемости был зарегистрирован в 1994–1995 гг., когда за 2 года заболело около 75 тыс. человек, умерло более 2 тыс. человек. Сложившаяся ситуация потребовала проведения экстренных мер. Было издано Постановление Главного государственного санитарного врача Г.Г. Онищенко «О массовой иммунизации населения против дифтерии». После проведения 1-ой массовой иммунизации населения заболеваемость начала резко

снижаться, а после 2-ой ревакцинации взрослых (2004–2005 гг.) стала носить спорадический характер с тенденцией ежегодного снижения численности заболевших [2]. Показатели заболеваемости были на уровне сотых долей на 100 тыс. населения. В 2011 г. показатель заболеваемости равнялся 0,0035 на 100 тыс. населения (рис. 1).

За исследуемый период ежегодно продолжает увеличиваться число территорий, где больные дифтерией не зарегистрированы. Доля таких территорий возросла с 38,3 % в 2005 г. до 94,0 % в 2011 г. В 2005 г. заболевшие были зарегистрированы в 55 субъектах. Более интенсивно заболеваемость

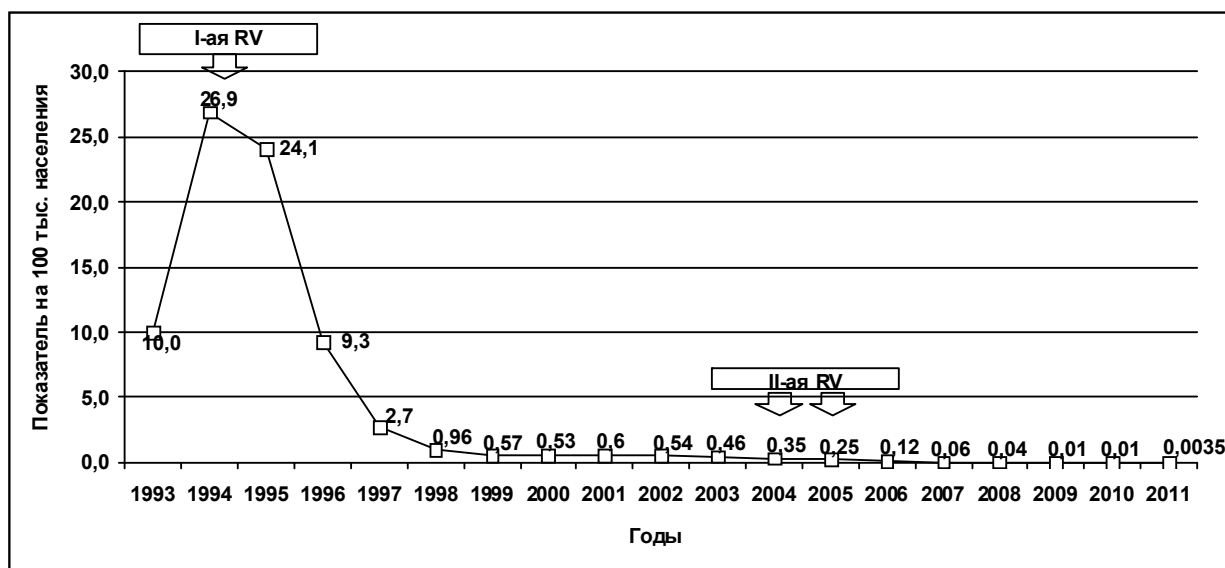


Рис. 1. Показатели заболеваемости дифтерией в России в 1993–2011 гг.

регистрировалась в Европейской части России. Большинство заболевших были зарегистрированы в Центральном и Северо-Западном федеральных округах, где показатели заболеваемости были выше среднероссийских. Спустя 7 лет в 2011 году заболеваемость регистрировалась лишь в 7 субъектах Федерации и то на низких цифрах.

В возрастной структуре заболевших изменений не произошло. Наибольшее число составляют взрослые. В течение всего периода наблюдения наиболее активно в эпидемический процесс были вовлечены дети старшего дошкольного и школьного возраста, молодые и социально-активные взрослые среднего возраста.

Легкие локализованные формы дифтерии диагностированы у 70–80 % заболевших [1]. Это свидетельствует о том, что эпидемический процесс дифтерии в России продолжает развиваться как среди непривитых, так и среди привитого населения.

В течение последних 7 лет (с 2005 г.) заболеваемость совокупного населения к 2011 г. снизилась в 71 раз с 0,25 на 100 тыс. населения до 0,0035 на 100 тыс. населения. В 2009 и 2010 гг. заболело 14 и 9 человек соответственно, в 2011 — 5 человек. Снижается и число токсических случаев заболевания, и, самое главное, снизилась смертность — в 23 раза. В 2009 и 2010 гг. летальные случаи не регистрировались. В 2011 г. зарегистрирован один случай смерти (бомж-алкоголик). Также снизилось и носительство возбудителя инфекции в 35 раз.

Среди детского населения снижение заболеваемости происходит очень интенсивно. В 2010 году заболело 3 ребенка. За этот период заболеваемость снизилась в 58 раз с показателя 0,58 в 2005 г. до 0,01 на 100 тыс. детского населения в 2010 г. В последние 3 года заболевание детей токсической дифтерией не зарегистрировано. Заболевших дифтерией детей в 2011 г не было. Летальность не отмечается с 2007 года. Носительство возбудителя инфекции среди этого контингента снизилось в 28 раз.

У подростков с 2005 г. наблюдается общая тенденция снижения заболеваемости и носительства. С 2006 г. регистрировались единичные случаи заболевания. Заболеваемость снизилась с показателя 0,31 до 0,07 в 2008 г. С 2009 г. больные не зарегистрированы. Летальные случаи не регистрируются

с 2006 г. Число носителей уменьшилось с 68 в 2005 г. до 1 в 2011 г.

За анализируемый период взрослые более интенсивно вовлечены в эпидемический процесс. Показатели заболеваемости среди них к 2011 г. снизились в 43 раза по сравнению с 2005 г. В 2011 году заболели 5 человек. Число больных токсической дифтерией также снижалось, но менее интенсивно, чем среди детей. Коэффициент тяжести во все годы оставался одинаково высоким, каждый третий больной переносит токсическую форму болезни. В 2009 и 2010 гг. летальные случаи не регистрировались, а в 2011 г. зарегистрирован один летальный случай среди асоциального контингента. Носительство снизилось к 2011 г. почти в 95 раз.

В течение всего анализируемого периода подавляющее большинство больных выделяли штаммы биовара *gravis*. Их доля составляла от 88,7 % в 2006 г. до 60 % в 2009 г.

К сожалению, несмотря на стремительное снижение заболеваемости и носительства бактериологическое подтверждение диагноза дифтерии ежегодно уменьшается (от 90,2 % в 2005 г. до 70,0 % в 2010 г.), т.е. у каждого 3–4-го больного диагноз был выставлен клинически без бактериологического подтверждения. Это указывает на недостатки бактериологической диагностики. В 2011 г. диагноз был подтвержден у всех 5 заболевших. О недостатках бактериологической диагностики свидетельствуют данные обследования больных с подозрением на дифтерию (ангинами). Показатель выявления возбудителя дифтерии в 2011 г. равен 0,007 на 1000 обследованных (табл. 1).

Благодаря ежегодному поддержанию стабильно высокого уровня охвата прививками всего населения в целом в стране сложилась благоприятная ситуация в отношении дифтерийной инфекции. Об этом свидетельствует анализ официальных сведений о привитости детей и взрослых против дифтерии на 01.01.2012 года. Среди детей, подлежащих прививкам в возрасте 3 месяцев — 14 лет 11 месяцев 29 дней, привито — 96,6 %, среди подростков — 99,7 %. Показатели своевременности охвата вакцинацией и ревакцинацией против дифтерии детей и подростков в декретированных возрастах высокие: в 12 месяцев — 97,8 %, 24 месяца — 98,6 %, 7 лет — 99,7 % 14 лет — 99,8 %. Взрослые в возрасте

Таблица 1
Бактериологическое обследование в целях наблюдения за распространением токсигенных и нетоксигенных *C. diphtheriae* в России в 2011 г.

Контингенты	Обследовано, абс.	В том числе выявлено коринебактерий			
		токсигенные		нетоксигенные	
		абс.	на 1000 обследованных	абс.	на 1000 обследованных
1. С диагностической целью	963988	8	0,007	1531	1,6
2. По эпидпоказаниям	11081	3	0,37	10	0,9
3. С профилактической целью	996173	7	0,007	2192	2,2
Всего	1971242	18	0,009	2192	1,1

18 лет и старше привиты в среднем в 97,9 %. Несколько ниже показатели охвата прививками лиц в возрасте 60 лет и старше — 96,8 %.

В результате проведенных мероприятий сформирован высокий уровень антитоксического популяционного иммунитета среди всего населения. Ежегодно в России в рамках проведения серомониторинга в субъектах Российской Федерации обследуется около 60–70 тыс. человек. Результаты серомониторинга подтверждают высокий уровень охвата прививками населения страны. Среди обследованных детей, подростков и взрослых в среднем по России выявлена высокая степень защиты от дифтерии. В 2011 г. она составила 95,4 %, 97,6 %, 91,1 % соответственно. При этом выявлена и высокая напряженность иммунитета. Средние и высокие титры антител в сыворотках крови выявлены в 79,3 % обследований (рис. 2).

В 2011 г. по федеральным округам наибольший процент серонегативных среди детей был в Северо-Западном федеральном округе (7,6 %). Показатель защищенности от дифтерии детей составил — 92,4 %. В остальных округах этот показатель был в пределах 94,5 % (Дальневосточный федеральный округ) — 96,6 % (Приволжский федеральный округ). Напряженность иммунитета в округах была также высокой — в 76,7–87,9 % случаев обнаружено среднее и высокое содержание антител.

У подростков по федеральным округам показатели защищенности и напряженности противодифтерийного иммунитета очень высокие: от 96,5 % (Центральный федеральный округ) до 99,0 % (Дальневосточный федеральный округ), а 78,9–92,3 % сывороток содержали средние и высокие титры дифтерийных антител, в том числе высокие значения титров выявлены в 55,7–80,0 % сывороток. Только в Северо-Кавказском федеральном округе высокие титры антитоксина обнаружены в 35,4 % сывороток подростков.

У взрослых по всем округам уровень защиты был в пределах 90,7–95,2 %, кроме Сибирского федерального округа (87,0 %).

По возрастным группам в среднем по России защищенность взрослых по состоянию антитоксического иммунитета была, как и в прошлые годы, более высокая среди лиц в возрасте 18–29 лет, 30–39 лет и 40–49 лет и составила — 94,8 %, 93,8 % и 90,9 % соответственно. Среди лиц старшего возраста 50–59 лет и 60 лет и старше показатели защищенности тоже были высокие, хотя и несколько ниже, чем у молодых: 86,1 % и 85,7 % соответственно. Вместе с тем, в отдельных субъектах Федерации показатели защищенности и напряженности иммунитета у взрослых были ниже среднероссийских. Так, в Республиках Коми и Тыва они составили 75,7 % и 72,9 %; 60,2 и 33,1 % соответственно.

Результаты контрольных исследований сывороток, проводимых в Федеральном референс-центре по мониторингу за дифтерией (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) в 2005–2010 гг., в целом совпали с данными серомониторинга [3] Уровень противодифтерийного иммунитета в среднем у детей, подростков и взрослых составил 93,9–96,9 %; 96,5–100 %; 86,3–95,4 % соответственно. Проведенные исследования подтверждают значительную напряженность иммунитета населения.

За 100 лет достигнуты значительные успехи в борьбе с дифтерией. Для сравнения в 1910 году заболело дифтерией в России 633559 человек (1184,0 на 100 тыс. населения), умерло — 4816 человек. В 2011 году — заболело 5 человек (0,0035 на 100 тыс. населения), летальный исход — один. Однако снижение внимания к дифтерии недопустимо, поскольку эпидпроцесс продолжается среди привитого населения в форме носительства, т.е. продолжается циркуляция возбудителя. На сегодняшний день остаются непривитыми около 3 млн. человек. При этом на отдельных территориях у детей, подростков

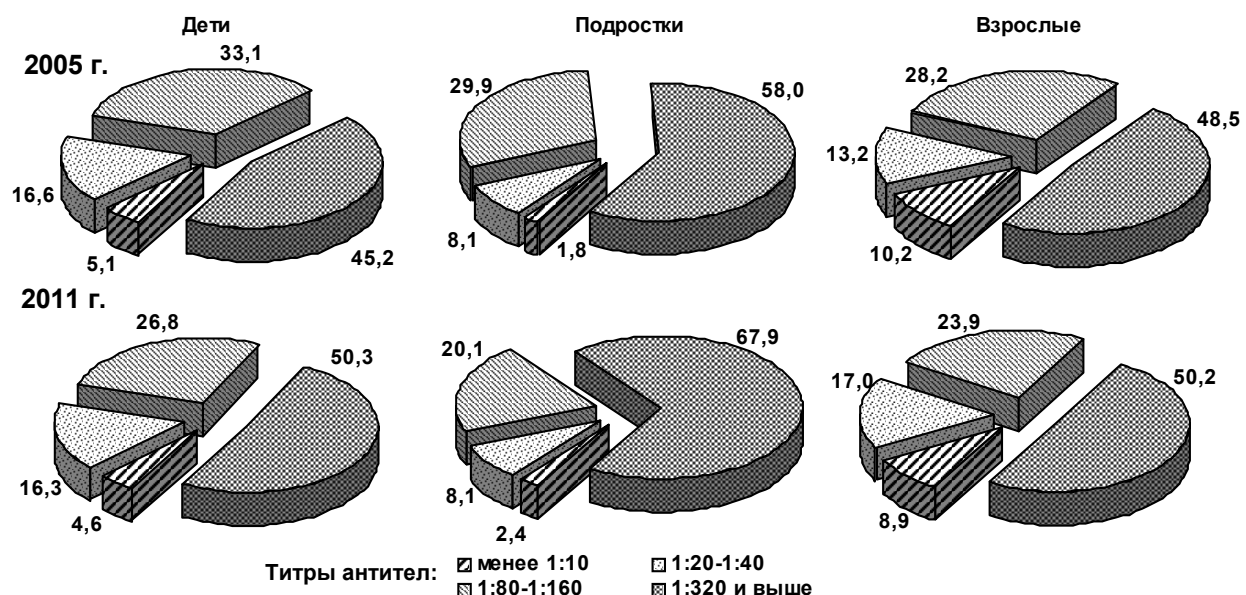


Рис. 2. Результаты серомониторинга дифтерии у детей, подростков и взрослых в России в 2005 и 2011 гг.

и взрослых отмечен недостаточный уровень анти-токсического иммунитета. Положение усугубляется и недостатками в бактериологической диагностике. У каждого 3-го больного диагноз устанавливается без бактериологического подтверждения. При этом на 24 % территории (20 территорий из 83) не выявляются даже нетоксигенные коринебактерии дифтерии, что является одним из показателей работы бактериологических лабораторий. Только устранение этих недостатков при выполнении всех мер по профилактике дифтерии в стране и, в первую очередь, наблюдение за популяционным иммунитетом населения обеспечит в дальнейшем благоприятную эпидситуацию по этой инфекции в России.

Сведения об авторах

Якимова Татьяна Николаевна – м.н.с. лаборатории эпиднадзора за дифтерией ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора; р.т. (факс) 8(495)459-21-46; e-mail: l.o.ra@mail.ru)

Максимова Нина Михайловна – д.м.н., заведующая лабораторией эпиднадзора за дифтерией ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора)

Маркина Светлана Сергеевна – к.м.н., научный сотрудник лаборатории эпиднадзора за дифтерией ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора)

ЛИТЕРАТУРА

1. Дифтерия в России: начало периода элиминации заболеваний / Н.М. Максимова [и др.] // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Журн. инфекция и иммунитет. — 2012. — Т. 2, № 1–2. — С. 40–41.
2. Уроки дифтерии / М.П. Корженкова [и др.] // Журн. Биопрепараты. — 2011. — № 2. — С. 30–35.
3. Якимова Т.Н. Современное состояние анти-токсического противодифтерийного иммунитета населения в России // Журн. Эпидемиология и санитария. — 2011. — № 4. — С. 17–19.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 579.25;579.61

T. Masuzawa ¹, N. Ohashi ², M.A. Khasnatinov ³, G.A. Danchinova ³, L.I. Ivanov ⁴, T. Fukui ¹,
Y. Okamoto ¹, M.J. Pan ⁴, N. Koizumi ⁵

COMPARATIVE STUDY OF ANAPLASMA IN JAPAN AND OTHER COUNTRIES

¹ Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan

² University of Shizuoka, Shizuoka, Japan

³ Scientific Center for Family health and human reproduction problems SB RAMS, Irkutsk, Russia

⁴ Plague Control Station of Khabarovsk, Khabarovsk, Russia

⁵ Central Taiwan University of Science and Technology, Taichung, Taiwan

⁶ National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

To determine the reservoir animals and vector ticks for *Anaplasma phagocytophilum* in Far East Asia, which causes human granulocytic anaplasmosis, we analyzed tissue samples from deer and boars in Japan, rodents in Taiwan and *Ixodes persulcatus* in Russia by PCR-targeted to 16S rDNA. *Anaplasma* species including *Anaplasma bovis* and *Anaplasma centrale*-infected wild deer and boars were detected. The detection rates for *A. phagocytophilum*, *A. bovis* and *A. centrale* in deer were 15,6 %, 21,9 % and 37,5 %, respectively. These infection rates in wild boar were 3,6 %, 17,9 % and 3,6 %, respectively. Wild rodents captured in Taiwan were positive for *A. phagocytophilum* and *A. bovis*. Prevalence rate of *A. phagocytophilum* on *I. persulcatus* ticks in Irkutsk and in Khabarovsk were 6,3 % and 11,3 %, respectively. The 16S rDNA sequences detected from Russian ticks were identical to those of *A. phagocytophilum* detected in US and Europe, and from tick *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Japan. However the sequence detected from deer and boars in Japan were identical to sequences previously detected from deer and cattle in Japan, and showed less similarity (98,6 %) with typical *A. phagocytophilum*. Sequences detected from wild rodents collected in Taiwan showed higher similarity (99,7 %) with typical *A. phagocytophilum*, but formed the branch from those of *A. phagocytophilum* detected in US and Europe. The finding suggests that the *A. phagocytophilum*-related sequence detected from deer and boars in Japan, and wild rodents in Taiwan were different from those of typical *A. phagocytophilum* found in Ixodid ticks.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, boar, deer, *Rattus*

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНАПЛАЗМ В ЯПОНИИ И ДРУГИХ СТРАНАХ

Т. Масузава ¹, Н. Охашаи ², М.А. Хаснатинов ³, Г.А. Данчинова ³, Л.И. Иванов ⁴, Т. Фукуи ¹,
Й. Окамото ¹, М.Дж. Пан ⁴, Н. Коизуми ⁵

¹ Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan

² University of Shizuoka, Shizuoka, Japan

³ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, Иркутск, Россия

⁴ Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия

⁵ Central Taiwan University of Science and Technology, Taichung, Taiwan

⁶ National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

С целью установления животных-резервуаров и клещей-переносчиков бактерий *Anaplasma phagocytophilum* — возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека — на дальнем востоке Азии мы проанализировали образцы тканей оленей и кабанов из Японии, грызунов из Тайваня и клещей *Ixodes persulcatus* в России с помощью ПЦР, направленной на амплификацию гена 16S rRNA. Дикие олени и кабаны были заражены *Anaplasma bovis* и *Anaplasma centrale*. Зараженность диких оленей *A. phagocytophilum*, *A. bovis* and *A. centrale* составила 15,6, 21,9 и 37,5 % соответственно. Среди диких кабанов зараженность этими микроорганизмами составила 3,6 %, 17,9 % и 3,6 % соответственно. Дикие грызуны, отловленные на Тайване, были заражены *A. phagocytophilum* и *A. bovis*. Зараженность клещей *I. persulcatus* в Иркутске и Хабаровске составила 6,3 и 11,3 % соответственно. Нуклеотидные последовательности гена 16S rRNA микроорганизмов, обнаруженных в клещах из России, были идентичны последовательностям *A. phagocytophilum*, обнаруженным в США и Европе, а также последовательностям *A. phagocytophilum* из клещей *Ixodes ovatus* и *Ixodes persulcatus* из Японии. Однако, последовательности из оленей и кабанов Японии были идентичны *A. phagocytophilum*, выделенным ранее от оленей и крупного рогатого скота в Японии и обладали меньшей схожестью (98,6 %) с типичными *A. phagocytophilum*. Последовательности, обнаруженные в грызунах на Тайване, были более сходны с типичными *A. phagocytophilum* (99,7 %), однако на филогенетическом древе формировали ветвь, отделившую от *A. phagocytophilum* из Европы и США. Данные результаты позволяют предположить, что *A. phagocytophilum*, инфицирующие диких оленей и кабанов в Японии и грызунов на Тайване, существенно отличаются от типичных *A. phagocytophilum*, инфицирующих иксодовых клещей.

Ключевые слова: *Anaplasma phagocytophilum*, кабан, олень, *Rattus*

Anaplasmosis is a tick-borne infectious disease of cattle, sheep, horse and other domestic ruminants caused by a gram-negative bacterium, *Anaplasma* species. Among *Anaplasma* species, *Anaplasma phagocytophilum* has been recognized as a tick-borne fever agent of cattle, sheep, goats and horses in the United States and Europe [4]. In 1990, it has been recognized that *A. phagocytophilum* potentially causes illness in humans (human granulocytic anaplasmosis, HGA) in the United States [1]. Roe and red deer and wild boar has been recognized for reservoir host for *A. phagocytophilum* in Europe. We previously demonstrated *A. phagocytophilum* infection in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Japan by PCR [3]. The 16S rDNA sequence detected from *I. ovatus* and *I. persulcatus* in Japan showed higher similarity with *A. phagocytophilum* isolated from US patient. The aim of this study was to determine reservoir host of *A. phagocytophilum* in Japan and Taiwan.

MATERIALS AND METHODS

Total DNA was extracted from the disrupted blood and/or spleen samples of 56 wild boars (*Sus scrofa*) and 32 Sika deer (*Cervus nippon*) captured in Japan, 138 wild small mammals (7 species) using QuickGene-800 Nucleic-acid Isolation System. To detect specific DNA of *Anaplasma* species, 16S rDNA was amplified with forward primer EC9 and reverse primer EC12A [2] in the first-step PCR. For the nested PCR, mixtures of forward primer Abpp (5'-TACTGCCAGACTAGAGTCCGGGA-3') specific to sequences for *Anaplasma bovis*, *A. phagocytophilum*, and *Anaplasma platys*, and another forward primer Acom (5'-TACTGCAGGACTAGAGTCCGGAA-3') specific to sequences for *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis* and *Anaplasma marginale*, and reverse primer AP-R (5'-TTGCAACCTATTGTAGTC-3') were used as inner primer sets, which amplified approximately 600 base pairs of DNA. For DNA sequencing analysis, the nested PCR amplicon purified with Microcon-PCR purification column (Millipore) was subjected to DNA cycle-sequencing analysis using BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) with an ABI 3130-Avant Genetic Analyzer. A phylogenetic tree was constructed on the basis of the alignment of 16S rDNA sequences (600bp) and the previously published sequences by Clustal W algorithm using sequence analysis software, MegAlign (DNASTAR).

RESULTS AND DISCUSSION

Prevalence rate of *A. phagocytophilum* on *I. persulcatus* ticks in Irkutsk and in Khabarovsk were 6,3 % (28/445) and 11,3 % (23/204), respectively. A phylogenetic tree was constructed on the basis of 16S-rDNA sequence. The 16S rDNA sequences detected from Russian ticks were identical to those of *A. phagocytophilum* detected in US and Europe, and from tick *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Japan.

Infection rates for *A. phagocytophilum*, *A. bovis* and *A. centrale* in Sika deer in Japan were 15,6 %, 21,9 % and 37,5 %, respectively. These rates in wild boar were 3,6 %, 17,9 % and 3,6 %, respectively. All positive

results were obtained from whole blood samples, but not from spleen samples. *A. phagocytophilum* detected from deer and boars form cluster with these sequences previously found from deer (AB196720, AB196721, AB454076) and cattle (EU368727, EU368728) in Japan and that from dog in South Africa (AY570540). However, these branched from those detected from a patient in USA (AF093789), horse in Sweden (AY527214) and USA (AF172164), *I. ovatus* (AY969012) in Japan and *I. persulcatus* in Russia (k-7, 7-109, HM366590). Furthermore, these 16S rDNA-PCR positive samples gave negative result on *p44/msp2* PCR targeted to outer membrane protein gene. The finding suggests that the agents detected are genetically related, but different from the *A. phagocytophilum* that cause HGA in USA and European countries, and also those detected from ixodid ticks in Japan and Russia.

16S rDNA sequence related to *Anaplasma* species were detected from wild rodent, *Rattus losea* among wild small mammals (7 species, *R. losea*, *Apodemus agrarius*, *Mus fromosanus*, *Mus caroli*, *Bandicota indica*, *Suncus murinus*, *Crocidura suaveolens*). These sequences (99-73, 99-58) were identical to those detected from *R. losea* (HM439430) and *Niviventer coxingi* (DQ458808) in China and showed high similarity (99.7 %) with typical *A. phagocytophilum* detected from Ixodid ticks in US, Europe and Asia.

During the study, we detected *Anaplasma* species sequences identified as *A. centrale* and *A. bovis*, respectively. *A. centrale* was found to be the only bovine anaplasmosis pathogen in Japan and usually causes mild anemia. Ten and 2 sequences detected from deer and boars, respectively, were identical to that of *A. centrale* detected in cattle (AF283007), and Sika deer in Japan (AB21116). The sequences detected in Japan branched from these sequences detected in Europe EF520686, EF520690) and Africa (AF414869) (similarity value 98.5-98.6 %), indicating genetic differences between the pathogen in Japan and those in other countries. This classification remains as a problem that should be study. Furthermore, *A. bovis* sequences were detected from deer and also boars. *A. bovis* has been previously detected in Sika deer (AB21116), cattle (FJ169957), and vector ticks, *Haemaphysalis longicornis* (AB196475) and *Haemaphysalis megaspinosus*. *A. bovis* mostly infects cattle in Africa and is phylogenetically more closely related to *A. phagocytophilum* than *A. centrale*.

Further study is needed to confirm reservoir animals for *A. phagocytophilum*, and genetic characterization of *A. phagocytophilum* in Japan and Russia to understanding the status of diseases associated with these agents.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dainihon Ryoyukai for providing tissue and blood samples of wild boars and deer. This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research B (No. 20406011) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and a Health Sciences Research Grant-in-Aid for Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (H16-Shinkou-

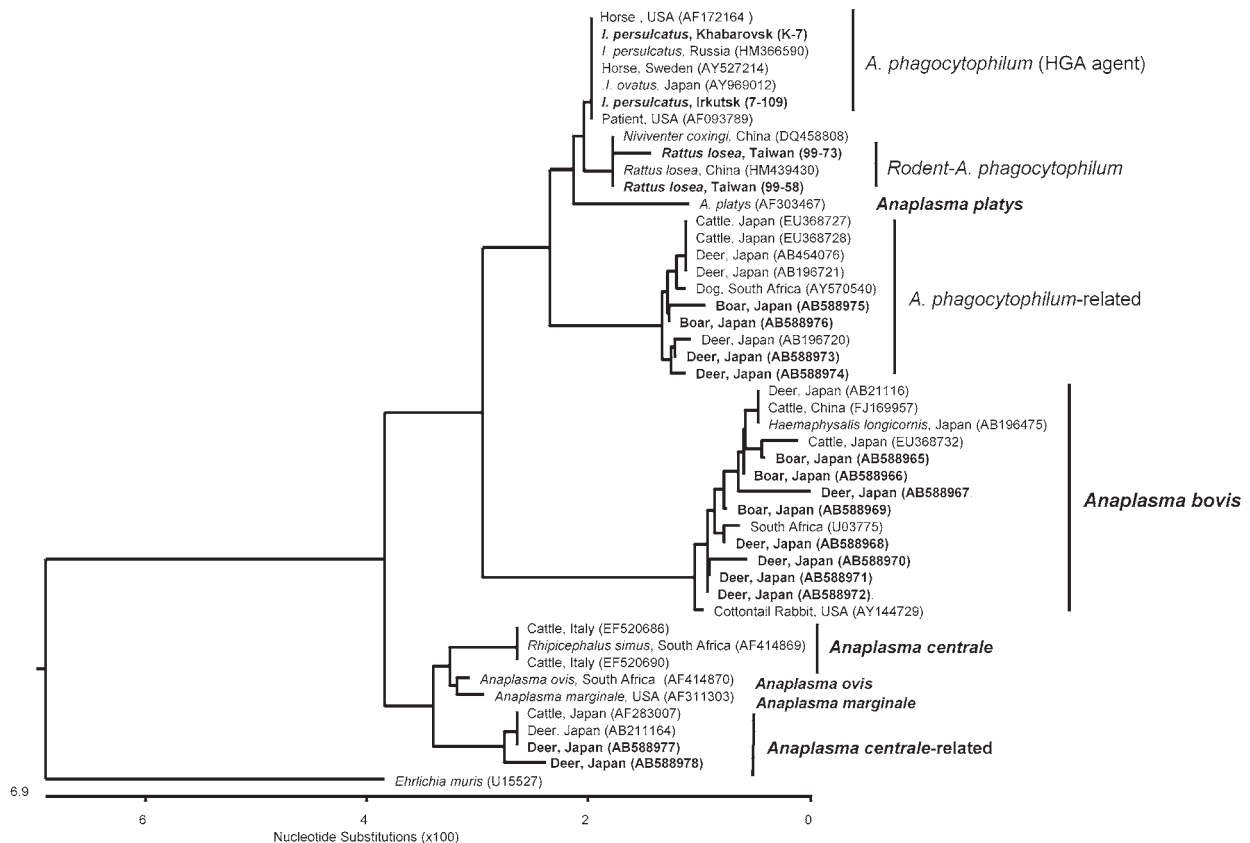


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed on the basis of 16S rDNA sequences.

Ippan-033) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

The phylogenetic tree was constructed using the alignment of 16S rDNA sequences by Clustal W algorithm followed by the neighbor-joining method with 1000 bootstrap resamplings. Sequence accession numbers are in parentheses. Bold type indicates sequences determined by this study.

REFERENCES

1. Chen S.M. et al. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease // J. Clin. Microbiol. — 1994. — Mar; Vol. 32 (3). — P. 589—595.
2. Dumler J.S. et al. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in

the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila* // Int J Syst Evol Microbiol. — 2001. — Nov; Vol. 51 (Pt 6). — P. 2145—2165.

3. Kawahara M. et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan // Appl Environ Microbiol. — 2006. — Feb; Vol. 72 (2). — P. 1102—1109.

4. Ohashi N. et al. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks // Emerg Infect Dis. — 2005. — Nov; Vol. 11 (11). — P. 1780—1783.

Сведения об авторах

Masuzawa T. — PhD, профессор Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan (e-mail: masuzawat@cis.ac.jp)
Ohashi N. — PhD, профессор, зам. декана School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan
Khasnatinov M.A. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952) 333-971)
Danchinova G.A. — д.б.н., руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел.: (3952)333-971; e-mail: dan-chin@yandex.ru)
Ivanov L.I. — д.м.н., директор Хабаровской противочумной станции Роспотребнадзора РФ
Fukui T. — научный сотрудник, Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan
Okamoto Y. — научный сотрудник, Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan
Pan M.J. — научный сотрудник Хабаровской противочумной станции Роспотребнадзора РФ
Koizumi N. — PhD, научный сотрудник National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

R. Yanagihara

RECONSTRUCTING THE EVOLUTIONARY HISTORY OF HANTAVIRUSES

John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA

Segregation of hantaviruses into clades that parallel the molecular phylogeny of rodents (order Rodentia) in the Murinae, Arvicolinae, Neotominae and Sigmodontinae subfamilies suggests that hantaviruses may have co-evolved with their reservoir hosts. Recently, however, host switching and local species-specific adaptation have been proposed to account for the similarities between host and virus phylogenies. The demonstration that Thottapalayam virus, a hantavirus isolated from the Asian house shrew (*Suncus murinus*), represents an early evolutionary divergence from other hantaviruses has spurred a search to ascertain if small mammals having shared ecosystems with rodents, such as shrews (order Soricomorpha, family Soricidae) and moles (family Talpidae), as well as bats (order Chiroptera), may have figured prominently in the evolution and diversification of hantaviruses. Archival tissues from 1,258 shrews (47 species), 152 moles (10 species) and 329 bats (32 species), captured in Europe, Asia, Africa and North America in 1980-2012, were analyzed for hantavirus RNA by RT-PCR. The realization that newfound hantaviruses detected in soricomorphs are genetically more diverse than those harbored by rodents suggests that the evolutionary history of hantaviruses is more ancient and complex than previously conjectured and that ancestral rodents may not have been the original mammalian hosts of primordial hantaviruses.

Key words: hantavirus, shrew, mole, bat, phylogeny

РЕКОНСТРУКЦИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИСТОРИИ ХАНТАВИРУСОВ

Р. Янагихара

John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA

Разделение хантавирусов на клады, соответствующие молекулярной филогении грызунов (порядок Rodentia) в подсемействах Murinae, Arvicolinae, Neotominae Sigmodontinae означает, что хантавирусы, возможно, ко-эволюционировали с их резервуарными хозяевами. Недавно, однако, было высказано предположение, что сходство между филогенией хозяев и хантавирусов обусловлено процессами смены хозяев и локальной видоспецифичной адаптации. Демонстрация того, что вирус Топтапалайя — хантавирус, изолированный от домового мускусной землеройки (*Suncus murinus*) — раньше всех остальных дивергировал от остальных хантавирусов, стимулировала поиск доказательств того, что мелкие млекопитающие, которые занимают те же экосистемы, что и грызуны, например, землеройки (порядок Soricomorpha, сем. Soricidae), кроты (сем. Talpidae) и летучие мыши (пор. Chiroptera), возможно, играли заметную роль в эволюции и диверсификации хантавирусов. Архивные образцы тканей 1285 землероек (47 видов), 152 кротов (10 видов) и 329 летучих мышей (32 видов), отловленных в Европе, Азии, Африке и Северной Америке в период 1980–2012 гг., были проанализированы на наличие РНК хантавирусов с помощью ОТ-ПЦР. Осознание того факта, что новые хантавирусы, обнаруженные в землеройках, более генетически разнообразны, чем хантавирусы, инфицирующие грызунов, наводит на мысль о том, что эволюционная история хантавирусов более древняя и сложная, чем ранее предполагалось, и что грызуны, возможно, не являлись исходным хозяином для предковых форм хантавирусов.

Ключевые слова: hantavirus, землеройка, крот, летучая мышь, филогения

INTRODUCTION

Virus and host gene phylogenies suggest that hantaviruses co-evolved with their reservoir rodent hosts. That is, phylogenetic analyses, based on full-length viral genomic sequences and host mitochondrial DNA (mtDNA) sequences, indicate that antigenically and genetically distinct hantaviruses segregate into clades, which parallel the evolution of rodents (order Rodentia) in the Murinae, Arvicolinae, Neotominae and Sigmodontinae subfamilies [18]. Recently, however, on the basis of the disjunction between evolutionary rates of the reservoir rodent host and hantavirus species, host switching and local species-specific adaptation, rather than co-divergence, have been proposed to account for the similarities between host and virus phylogenies [20]. When viewed within the context that Thottapalayam virus (TPMV), a hantavirus isolated from the Asian house shrew (*Suncus murinus*) [24, 25], represents a separate and divergent

phylogenetic clade, the long-forgotten, historical accounts of hantavirus antigens in non-rodent small mammals captured in HFRS-endemic regions, such as the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*), alpine shrew (*Sorex alpinus*), Eurasian water shrew (*Neomys fodiens*) and common mole (*Talpa europea*) in Russia and the former Yugoslavia [7, 11, 19], and the greater white-toothed shrew (*Crocidura russula*) and Chinese mole shrew (*Anourosorex squamipes*) in China [3], suggest that rodents may not be the primordial or principal reservoir hosts of hantaviruses. An opportunistic search was conducted to ascertain the role of other small mammals in the evolution and diversification of hantaviruses.

MATERIALS AND METHODS

Archival frozen tissues from 1,258 shrews (47 species) and 152 moles (10 species), captured in Europe, Asia, Africa and North America in 1980–2009, and

either frozen, ethanol-fixed or RNAlater®-preserved tissues from 323 bats (32 species), collected in Asia, Africa and the Americas in 1981–2012, were analyzed for hantavirus RNA by RT-PCR. Total RNA was extracted from tissues, using the PureLink Micro-to-Midi total RNA purification kit (Invitrogen, San Diego, CA), then reverse transcribed, using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and random hexamers. A two-step PCR was performed in 20-μL reaction mixtures, containing 250 μM dNTP, 2 mM MgCl₂, 1 U of AmpliTaq polymerase (Roche, Basel, Switzerland) and 0.25 μM of each primer. Initial denaturation at 94 °C for 5 min was followed by two cycles each of denaturation at 94 °C for 40 sec, two-degree step-down annealing from 48 to 38 °C for 40 sec, and elongation at 72 °C for 1 min, then 32 cycles of denaturation at 94 °C for 40 sec, annealing at 42 °C for 40 sec, and elongation at 72 °C for 1 min, in a GeneAmp PCR 9700 thermal cycler (Perkin-Elmer, Waltham, MA). DNA was sequenced directly using an ABI Prism 377XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide sequences of the newfound hantaviruses were aligned and compared with representative rodent- and soricomorph-borne hantavirus sequences, using the ClustalW method (TranslatorX server and BioEdit 7.0.5). Phylogenetic trees, based on

the coding regions of the S, M and L segments, were generated using the maximum likelihood (ML) method implemented in PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, 4.0b10) and RAxML Blackbox webserver, as well as a Bayesian approach using MrBayes 3.1. The optimal evolutionary model was estimated as the GTR + I + Γ model of evolution, as selected by jModelTest version 0.1. ML topologies were evaluated by bootstrap analysis of 1,000 neighbor-joining iterations (in PAUP*) or 1,000 ML iterations (in RAxML). Bayesian analysis consisted of two million Markov Chain Monte Carlo generations sampled every 100 generations to ensure convergence across two runs of four chains each, with average standard deviations of split frequencies less than 0.01 and effective sample sizes over 100, resulting in consensus trees supported by posterior-node probabilities. The taxonomic identities of the hantavirus-infected mole shrews were verified by sequence analysis of the complete 1,140-nucleotide cytochrome *b* gene, amplified by PCR. Host phylogenies based on mtDNA cytochrome *b* sequences, along with published sequences for shrews for this gene region, were generated, using ML and Bayesian methods described previously.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1

Newfound Soricomorph-borne Hantaviruses

Family	Subfamily	Genus species	Country	Year	Virus Name
Soricidae	Crocidae	<i>Suncus murinus</i>	India	1963	Thottapalayam
		<i>Crociodura doucetii</i>	Guinea	2012	Bowé
		<i>Crociodura lasiura</i>	Korea	2004	Imjin
		<i>Crociodura shantungensis</i>	Korea	2007	Jeju
		<i>Crociodura theresae</i>	Guinea	2004	Tanganya
		<i>Crociodura obscurior</i>	Côte d'Ivoire	2009	Azagny
	Myosoricinae	<i>Myosorex geata</i>	Tanzania	1996	Uluguru
		<i>Myosorex zinki</i>	Tanzania	2002	Kilimanjaro
	Soricinae	<i>Anourosorex squamipes</i>	Vietnam	2006	Cao Bang
		<i>Anourosorex yamashinai</i>	Taiwan	1989	Xinyi
		<i>Blarina brevicauda</i>	United States	1998	Camp Ripley
		<i>Blarina carolinensis</i>	United States	1983	Iamonia
		<i>Neomys fodiens</i>	Poland	2011	Boginia
		<i>Sorex araneus</i>	Switzerland	2006	Seewis
		<i>Sorex caecutiens</i>	Russia	2006	Amga
		<i>Sorex cinereus</i>	United States	1994	Ash River
		<i>Sorex cylindricauda</i>	China	2005	Qiandao Lake
		<i>Sorex monticolus</i>	United States	1996	Jemez Springs
		<i>Sorex palustris</i>	Canada	2005	Fox Creek
		<i>Sorex roboratus</i>	Russia	2006	Kenkeme
		<i>Sorex trowbridgii</i>	United States	2003	Tualatin River
		<i>Sorex unguiculatus</i>	Japan	2006	Sarufutsu
		<i>Sorex vagrans</i>	United States	2003	Powell Butte
Talpidae	Talpinae	<i>Talpa europaea</i>	Hungary	1999	Nova
		<i>Urotrichus talpoides</i>	Japan	2008	Asama
		<i>Neurotrichus gibbsii</i>	United States	2003	Oxbow
		<i>Scaptomyx fuscicaudus</i>	China	1989	Dahonggou Creek
	Scalopinae	<i>Scalopus aquaticus</i>	United States	1986	Rockport

Being permitted access to archival tissues in museum repositories and personal collections made possible the detection of genetically distinct hantaviruses in shrews of multiple species captured in widely separated geographic regions, including the Chinese mole shrew (*Anourosorex squamipes*) [15], Taiwanese mole shrew (*Anourosorex yamashinai*), northern short-tailed shrew (*Blarina brevicauda*) [10], southern short-tailed shrew (*Blarina carolinensis*), Eurasian water shrew (*Neomys fodiens*), Eurasian common shrew (*Sorex araneus*) [21], Laxmann's shrew (*Sorex caecutiens*), masked shrew (*Sorex cinereus*) [17], dusky shrew (*Sorex monticolus*) [17], flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*) [16], long-clawed shrew (*Sorex unguiculatus*), Doucet's shrew (*Crocidura douceti*), Ussuri white-toothed shrew (*Crocidura lasiura*) [2], West African pygmy shrew (*Crocidura obscurior*) [13], Asian lesser white-toothed shrew (*Crocidura shantungensis*) [4], geata mouse shrew (*Myosorex geata*) and Kilimanjaro mouse shrew (*Myosorex zinki*) (Table 1). Previously unrecognized hantaviruses were also found in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*)

[14], American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*) [12], European common mole (*Talpa europaea*) [6], eastern mole (*Scalopus aquaticus*) [23] and long-tailed mole (*Scaptonyx fuscicaudus*), as well as in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) [5], an insectivorous vesper bat species captured in Côte d'Ivoire. Only three of the soricomorph-borne hantaviruses listed in Table 1 (Thottapalayam virus, Tanganya virus and Qiandao Lake virus) were reported by others.

Newly identified soricid-borne hantaviruses exhibited geographic-specific clustering, akin to that observed for rodent-borne hantaviruses. For example, distinct lineages were noted for Seewis virus in Eurasian common shrews from Switzerland, Austria, Finland, Germany, Hungary, Czech Republic, Slovakia, Poland and Russia [1, 8, 22], and for Thottapalayam virus in Asian house shrews from India and Nepal [9]. Moreover, host sharing was evidenced by genetic variants of the same hantavirus in evolutionarily related shrew species: Seewis virus in *Sorex araneus*, *Sorex daphaenodon*, *Sorex tundrensis* and *Neomys anomalus*

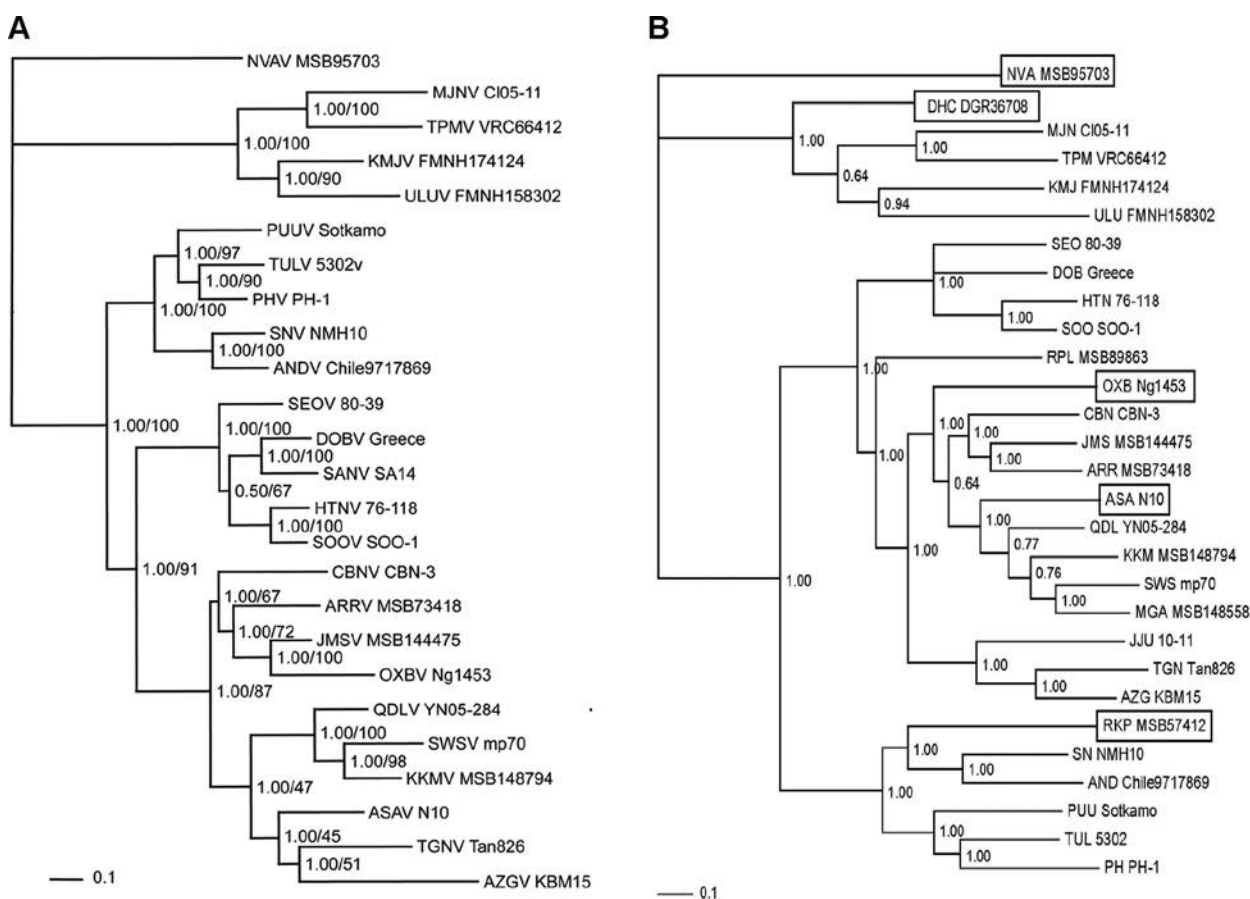


Fig. 1. Phylogenetic trees, using the best-fit GTR+I+ Γ model of evolution, based on the (A) S-genomic and (B) L-genomic segments of representative rodent-, shrew- and mole-borne hantaviruses. The numbers at each node are posterior probabilities and ML bootstrap supports. The scale bar indicates the nucleotide substitutions per site. The five taxa in (B), enclosed by individual boxes, represent hantaviruses detected in moles. Abbreviations: ANDV (Andes virus), ARRV (Ash River virus), ASAV (Asama virus), AZGV (Azagny virus), CBNV (Cao Bang virus), DHCV (Dahonggou Creek virus), DOBV (Dobrava virus), HTNV (Hantaan virus), JJUV (Jeju virus), JMSV (Jemez Spring virus), KKMV (Kenkeme virus), KMJV (Kilimanjaro virus), MGA (Amga virus), MJNV (Imjin virus), NVAV (Nova virus), OXBV (Oxbow virus), PHV (Prospect Hill virus), PUUV (Puumala virus), QDLV (Qiandao Lake virus), RKPV (Rockport virus), RPLV (Camp Ripley virus), SANV (Sangassou virus), SEOV (Seoul virus), SNV (Sin Nombre virus), SOOV (Soochong virus), SWSV (Seewis virus), TGNV (Tanganya virus), TPMV (Thottapalayam virus), TULV (Tula virus), ULUV (Uluguru virus).

[22]; and Jemez Springs virus in *Sorex monticolus*, *Sorex palustris*, *Sorex trowbridgii* and *Sorex vagrans*.

Host switching, or cross-species transmission of hantaviruses, was found between reservoir hosts of the same family (Soricidae and Soricidae), of different families (Soricidae and Talpidae) and of different orders (Soricomorpha and Rodentia). Notable examples were Asama virus in the Japanese shrew mole [14] and Oxbow virus in the American shrew mole [12], and the shared ancestry of Rockport virus in the eastern mole and hantaviruses carried by cricetid rodents [23], as well as Jemez Springs virus in the Trowbridge shrew.

Phylogenetic analyses showed that hantaviruses segregated into five distinct lineages (Fig. 1A). Two of these lineages, comprising hantaviruses hosted by murid and cricetid rodents, have previously been well described. The three new lineages were composed of hantaviruses harbored by soricine, crocidurine and mysosoricine shrews, with the most divergent being that of a mole-borne hantavirus, Nova virus (NVAV) from the European common mole. As stated earlier, other mole-borne hantaviruses (shown in boxes in Fig. 1B) appeared to be somewhat more catholic in their host range compared to present-day rodent-borne hantaviruses. More in-depth investigations are warranted to define the genetic diversity of hantaviruses in moles. That is, despite the overall success of the RT-PCR approach at identifying previously unrecognized hantaviruses, overcoming technical barriers of primer design and deploying more powerful applications, such as ultra high-throughput sequencing technology, are essential to accelerate the virus discovery process.

The re-discovery of genetically divergent hantaviruses in soricomorphs, and the more recent detection of a divergent lineage of hantavirus in an insectivorous bat, have forced the rewriting of textbook chapters and have necessitated the reframing of their evolutionary origin and diversification. That these newfound hantaviruses are genetically more diverse than those hosted by rodents suggests that the evolutionary history of hantaviruses is far more ancient and complex than previously conjectured. Moreover, ancestral rodents may not have been the original mammalian hosts of primordial hantaviruses. Instead, in keeping with other members of the *Bunyaviridae* family which are carried by insects and arthropods, the evolutionary history of hantaviruses might have entailed an insect-borne virus, initially infecting insectivorous ancestral hosts in the mammalian superorder Laurasiatheria, dating 50 or more million years before present, with subsequent host switching and species-specific adaptation in the distant and more recent past.

Acknowledgements: The collaborative contributions of the following scientists are gratefully acknowledged: Sergey A. Abramov, Satoru Arai, Luck Ju Baek, Shannon N. Bennett, Joseph A. Cook, Christiane Denys, Laurie Dizney, Jake A. Esselstyn, Se Hun Gu, Andrew G. Hope, Monika Hilbe, Hae Ji Kang, Francois Jacquet, Blaise Kadjo, Michael Y. Kosoy, Pawel P. Liberski, Burton K. Lim, Janusz Markowski, Violaine Nicolas, Satoshi D. Ohdachi, Maria Puorger, Luis A. Ruedas, Jin-Won Song,

Ki-Joon Song, William T. Stanley, Laarni Sumibcay, Ninh U. Truong, Thang T. Truong and Liudmila N. Yashina. This work was supported in part by grants R01AI075057 and P20GM103516 from the National Institutes of Health.

REFERENCES

1. Broad geographical distribution and high genetic diversity of shrew-borne Seewis hantavirus in Central Europe / M. Schlegel [et al.] // *Virus Genes*. — 2012. — Mar 31.
2. Characterization of Imjin virus, a newly isolated hantavirus from the Ussuri white-toothed shrew (*Crociodura lasiura*) / J.-W. Song [et al.] // *J. Virol.* — 2009. — Vol. 83. — P. 6184–6191.
3. Chen S.Z. Strains of epidemic hemorrhagic fever virus isolated from the lungs of *C. russula* and *A. squamipes* // *Chin J Prev Med.* — 1986. — Vol. 20. — P. 261–263.
4. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea / S. Arai [et al.] // *Virology*. — 2012. — Vol. 424. — P. 99–105.
5. Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Côte d'Ivoire / L. Sumibcay [et al.] // *Virol J.* — 2012. — Vol. 9. — P. 34.
6. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*) / H.J. Kang [et al.] // *PLoS One*. — 2009. — Vol. 4. — e6149.
7. Features of circulation of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus among small mammals in the European U.S.S.R / I.N. Gavrilovskaya [et al.] // *Arch Virol.* — 1983. — Vol. 75. — P. 313–316.
8. Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary / H.J. Kang [et al.] // *Virol J.* — 2009. — Vol. 6. — P. 208.
9. Genetic diversity of Thottopalayam virus, a hantavirus harbored by the Asian house shrew (*Suncus murinus*) in Nepal / H.J. Kang [et al.] // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* — 2011. — Vol. 85. — P. 540–545.
10. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States / S. Arai [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2007. — Vol. 13. — P. 1420–1423.
11. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Yugoslavia: epidemiologic and epizootiologic features of a nationwide outbreak in 1989 / A. Gligic [et al.] // *Eur J Epidemiol.* — 1992. — Vol. 8. — P. 816–825.
12. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*) / H.J. Kang [et al.] // *Virology*. — 2009. — Vol. 388. — P. 8–14.
13. Molecular evolution of Azagny virus, a newfound hantavirus in the West African pygmy shrew (*Crociodura obscurior*) in Côte d'Ivoire / H.J. Kang [et al.] // *Virol J.* — 2011. — Vol. 8. — P. 373.
14. Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*) / S. Arai [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. — 2008. — Vol. 105. — P. 16296–16301.

15. Newfound hantavirus in Chinese mole shrew, Vietnam / J.-W. Song [et al.] // Emerg Infect Dis. — 2007. — Vol. 13. — P. 1784–1787.
16. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*) / H.J. Kang [et al.] // Vector-Borne Zoonotic Dis. — 2010. — Vol. 10. — P. 593–597.
17. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States / S. Arai [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2008. — Vol. 78. — P. 348–351.
18. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution // J. Gen. Virol. — 1996. — Vol. 77. — P. 2677–2687.
19. Potential reservoir and vectors of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in the U.S.S.R / E.A. Tkachenko [et al.] // Ann Soc Belg Med Trop. — 1983. — Vol. 63. — P. 267–269.
20. Ramsden C., Holmes E.C., Charleston M.A. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for co-divergence // Mol Biol Evol. — 2009. — Vol. 26. — P. 143–153.
21. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*) / J.-W. Song [et al.] // Virol J. — 2007. — Vol. 4. — P. 114.
22. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia / L. Yashina [et al.] // Vector-Borne Zoonotic Dis. — 2010. — Vol. 10. — P. 585–591.
23. Shared ancestry between a mole-borne hantavirus and hantaviruses harbored by cricetid rodents / H.J. Kang [et al.] // J. Virol. — 2011. — Vol. 85. — P. 7496–7503.
24. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India / D.E. Carey [et al.] // Indian J. Med. Res. — 1971. — Vol. 59. — P. 1758–1760.
25. Thottapalayam virus: a prototype shrewborne hantavirus / J.-W. Song [et al.] // Emerg Infect Dis. — 2007. — Vol. 13. — P. 980–985.

Сведения об авторах

Richard Yanagihara – Pacific Center for Emerging Infectious Diseases Research, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa (651 Ilalo Street, BSB 320L, Honolulu, Hawaii 96813, USA; Tel.: 808 692-1610, Fax: 808 692-1976; e-mail: ryanagih@hawaii.edu)

Э.Р. Абдуллазянова, А.В. Зайковская, Л.В. Шестопалова *, А.М. Шестопалов

**ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗВАННОЙ ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСОМ ГИППА А/Н5N1
У ДИКИХ УТОК И ДОМАШНИХ КУР****Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)***** Новосибирский государственный университет (Новосибирск)**

Изучены изменения в легком, печени и головном мозге у диких уток вида кряква и кур при экспериментальном заражении высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1. Показано выделение вируса в мазках из глотки и клоаки, дан титр вируса в образцах органов. У диких уток изменения в органах носят дистрофический характер, у домашних кур имеют дистрофически-некротическую природу.

Ключевые слова: дикие водоплавающие птицы, вирус гриппа А/Н5N1, патоморфология

**STUDY OF PATHOGENETIC FEATURES INFECTION CAUSED BY HIGHLY PATHOGENIC
INFLUENZA VIRUS A/H5N1 IN WILD DUCKS AND DOMESTIC CHICKEN****E.R. Abdullazyanova, A.V. Zajkovsmaya, L.V. Shestopalova *, A.M. Shestopalov****Scientific Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo***** Novosibirsk State University, Novosibirsk**

Changes in lung, liver and brain were investigated in wild ducks and domestic chicken under experimental infection caused by highly pathogenic avian Influenza virus A/H5N1. Isolation of virus was demonstrated in swabs from the throat and cloaca, virus titers were presented in patterns of organs. Changes in organs of wild ducks have dystrophic characteristics, but in domestic chickens are of the dystrophic and necrotic nature.

Key words: wild aquatic birds; Influenza virus A/H5N1; pathomorphology

Вирус гриппа типа А относится к семейству Orthomyxoviridae и в природе поражает широкий круг млекопитающих и птиц. Природным резервуаром вирусов гриппа А являются дикие водоплавающие птицы, в которых они эволюционно стабильны, сбалансированы с организмом-хозяином и размножаются, не вызывая явных симптомов заболевания и смертности [4, 5]. До 2002 года сообщалось только о спорадических случаях инфицирования высокопатогенными вирусами птичьего гриппа свободноживущих диких птиц. В 2003 году во Вьетнаме, Индонезии и Тайланде появились сведения о массовой гибели домашней птицы, а также диких водоплавающих птиц, после чего высокопатогенные вирусы гриппа субтипа Н5N1 широко распространились из Азии в Европу и Африку [1].

Кряква — широко распространенный вид среди Евразийских диких уток, которые мигрируют на длительные расстояния. Анализ вирусов Н5N1, изолированных от здоровых крякв в Южной Корее, показал, что они могут бессимптомно выделять вирус во время длительных перелетов и являться, таким образом, потенциально важным механизмом в распространении высокопатогенных вирусов гриппа [2]. При миграции дикие птицы могут передавать вирус домашним видам птиц, в популяциях которых инфекция протекает в виде эпизоотий и сопровождается высокой смертностью [3].

Поэтому целью работы стало изучение патогенетических особенностей инфекции при заражении высокопатогенным вирусом гриппа типа А субтипа Н5N1 у диких уток и домашних кур.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы дикие утки вида кряква *Anas platyrhynchos* в возрасте 6 недель, выращенные из яиц в условиях биологического стационара Института систематики и экологии животных; домашние куры породы белый леггорн 6-недельного возраста, выращенные в ГППЗ «Новосибирский». Животных инфицировали штаммом вируса A/duck/Omsk/1822/06 (H5N1) (IVPI = 3,0) в дозе 10^6 ЭИД₅₀ путем равномерного нанесения на слизистые оболочки носовых ходов, конъюнктивы глаз, ротовой полости. Все работы по заражению животных и наблюдению за ними проводились в условиях инфекционного вивария с уровнем биологической безопасности BSL2. У уток ежедневно собирали мазки из глотки и клоаки в течение трехнедельного периода наблюдения. На 4-е сутки после заражения производилась эвтаназия трех животных путем дислокации шейных позвонков, у них были взяты органы (головной мозг, печень, легкое) для гистологического и вирусологического исследований. Образцы тканей и мазки из глотки и клоаки были исследованы с помощью обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) и ПЦР в реальном времени для определения наличия рибонуклеиновой кислоты вируса, титр вируса в положительных при ПЦР образцах определяли путем титрования на развивающихся куриных эмбрионах. Гистологические методы исследования проводились по стандартной методике с использованием световой микроскопии при окраске препаратов гематоксилин и эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение вируса A/duck/Omsk/1822/06 (H5N1) во внешнюю среду со слюзью из глотки и клоаки у диких уток было зарегистрировано в течение двух недель (рис. 1). Наибольшие титры вируса были отмечены в мазках из глотки на 3 сутки после инфицирования.

У диких уток в двух из трех исследованных образцов ткани легкого было выявлено наличие вируса гриппа в титре $lg\ 1,4 \pm 0,50$ ЭИД₅₀/мл. У кур наличие вируса гриппа было установлено во всех исследованных образцах тканей органов: в легком в титре $lg\ 7,2 \pm 0,61$ ЭИД₅₀/мл, в головном мозге в титре $lg\ 6,8 \pm 1,17$ ЭИД₅₀/мл, в печени в титре $lg\ 3,7 \pm 1,65$ ЭИД₅₀/мл.

В ткани легкого у дикой утки отмечались признаки гемодинамических нарушений, включая кровенаполненность сосудов, стаз эритроцитов в капиллярах, образование эритроцитарных тромбов в сосудах крупного калибра. Для воздухопроводящего отдела характерны незначительные изменения, проявляющиеся в том, что просветы парабронхов были расширены, но эпителиальная выстилка не повреждена, имелось лишь слабое разрастание мышечно-эластических образований. Дыхательные капилляры находились в расправленном состоянии, были свободны от слизи, клеточного детрита. Наблюдалось незначительное разрастание соединительно-тканых волокон в строме органа, где появлялись диффузно разбросанные гранулы тучных клеток, а также умеренно выраженная лимфоидная инфильтрация.

У кур в ткани легкого наблюдались более выраженные изменения в сосудистом компартменте, сопровождавшиеся периваскулярными отеками с выходом эритроцитов и лимфоцитов в околососудистую область, образованием тромбов в сосудах

среднего и крупного калибров. Одновременно с этим выявлялись признаки внутрисосудистого гемолиза и плазмолиза, кровенаполненность и стаз эритроцитов в капиллярах. Отмечалось разрастание соединительно-тканного каркаса органа с признаками стромальной пневмонии. В воздухопроводящем отделе наряду с широко раскрытыми парабронхами встречались нерасправленные парабронхи. В паренхиме органа выявлялись признаки дистелектаза.

Для ткани печени уток, инфицированных высоко патогенным вирусом гриппа A/H5N1, на 4-е сутки была характерна следующая картина: кровенаполненность сосудов, расширение синусоидальных пространств, стаз эритроцитов в синусоидах, а также периваскулярные отеки. В паренхиме органа выявлялись признаки гемосидероза, дистрофические изменения гепатоцитов от слабых до умеренно выраженных.

У кур на 4-е сутки после заражения высокопатогенным вирусом гриппа A/H5N1 изменения в печени были более заметные. Имелись явные признаки венозной гиперемии печени. Синусоидальные пространства были расширены в еще большей степени, в синусоидных капиллярах наблюдался стаз эритроцитов с начальными признаками гемолиза, в их просветах встречалось большое количество клеток гетерофильной природы, а также макрофагального ряда с гранулами гемосидерина. В сосудах крупного калибра отмечался периваскулярный отек, плазматическое пропитывание. В паренхиме печени при сохранении балочной структуры органа наблюдались расширенные желчные протоки, признаки баллонной дистрофии гепатоцитов, переходящие во множественные фокусы некрозов, также встречались лимфоидные инфильтраты.

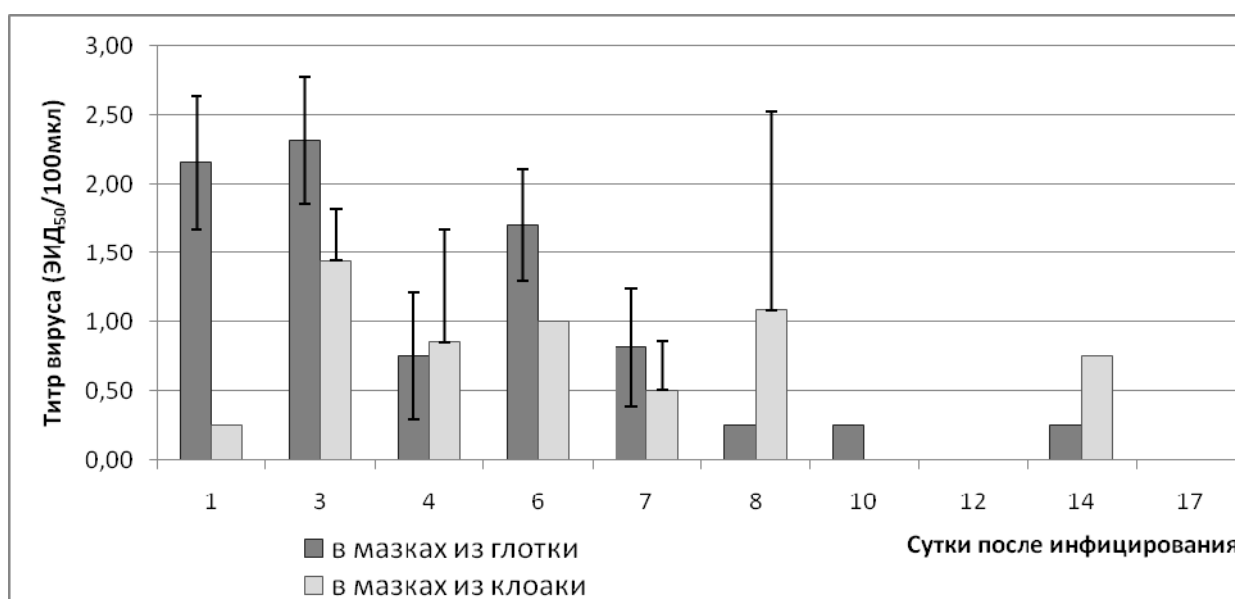


Рис. 1. Титры вируса гриппа A/duck/Omsk/1822/06 (H5N1) в мазках из глотки и клоаки у диких уток вида кряква). Титры вируса выражены в lg ЭИД₅₀/мл, в виде $M \pm SD$, где M – среднее значение, SD – стандартное отклонение, ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфекционная доза.

В ткани головного мозга диких уток отмечались явления множественных периваскулярных отеков, как вокруг мелких сосудов со стазом эритроцитов в их просветах, так и вокруг сосудов крупного калибра, в которых скопления эритроцитов образовывали целые конгломераты. Нервные клетки находились в состоянии дистрофии, в их цитоплазме выявлялись вакуоли, отмечался распад тигроидного вещества. Клетки микроглии были полигональной формы, что может косвенно свидетельствовать об их активации вследствие усиления фагоцитарной активности.

У кур в ткани головного мозга на 4-е сутки после заражения также отмечались множественные периваскулярные отеки, в просветах сосудов наблюдался стаз эритроцитов с признаками гемолиза. Изменения в нейронах носили уже дистрофически-некротический характер, то есть признаки тигролиза переходили в некротическое расплавление клеток, особенно в области периваскулярных отеков. Кроме того, имелось разрыхление волокнистых структур под мозговыми оболочками органа, что может являться признаком субарахноидального воспаления. Для глиальных клеток был характерен микрофагоцитоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ткани легкого у диких уток на 4-е сутки после инфицирования вирусом гриппа А/Н5N1 наблюдались воспалительно-дистрофические изменения, в основном, вследствие гемодинамических нарушений. У кур же появились выраженные воспалительно-деструктивные изменения. У уток в ткани печени имелись лишь гемодинамические нарушения и начальные признаки дистрофических изменений в паренхиме. У кур были признаки резко выраженных изменений в сосудистом отделе и в паренхиме печени, что дает

основания полагать о недостаточности функционирования всего органа. В ткани головного мозга у уток к четвертым суткам развивались нейрологические признаки инфекции, вызванной вирусом H5N1, которые подтверждались и клинической картиной заболевания. У кур течение заболевания было более тяжелым по сравнению с дикими утками вида кряква, а патологические особенности в головном мозге носили воспалительную, дистрофическую и некротическую природу.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties / G. Neumann [et al.] // J. Cell Research — 2010. — Vol. 20, Is. 1. — P. 51—61.
2. H5N1 subtype highly pathogenic avian influenza virus isolated from healthy mallard captured in South Korea / H.-R. Kim [et. al.] // J. Vet. Microbiology. — 2011. — Vol. 151. — P. 386—389.
3. Isolation and characterization of influenza A virus (subtype H5N1) that caused the first highly pathogenic avian influenza outbreak in chicken in Bhutan / S.C. Dubey [et. al.] // J. Vet. Microbiology. — 2012. — Vol. 155, Is. 1. — P. 100—105.
4. Межпопуляционные взаимодействия в системе вирусы гриппа А — животные — человек / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2005. — Т. 50, № 4. — С. 4—11.
5. Эволюция вирусов гриппа птиц H5N1 с 1997 по 2004 г. в Южной и Юго-Восточной Азии / А.С. Липатов [и др.] // Вопр. вирусологии. — 2005. — Т. 50, № 4. — С. 11—17.

Сведения об авторах

Абдуллазянова Эльвира Рейнатовна — аспирант, стажер-исследователь ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; e-mail: elvira.abd@mail.ru)
Зайковская Анна Владимировна — к.б.н., старший научный сотрудник ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)
Шестопалова Лидия Владимировна — д.б.н., профессор ГБОУ ВПО Новосибирский государственный университет
Шестопалов Александр Михайлович — д.б.н., заведующий отделом ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»)

Е.Ю. Абидуева, Л.П. Козырева, Д.Д. Цыренова, Б.Б. Намсараев, Б.Б. Батоболотова,
* Е.Б. Матюгина

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ СОДОВО-СОЛЕННЫХ ОЗЕР ЗАБАЙКАЛЬЯ

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)
Бурятский государственный университет (Улан-Удэ)
* Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН (Чита)

По микробиологическим и санитарно-бактериологическим показателям исследованные озера Забайкалья относятся к чистым, слабозагрязненным и умеренно-загрязненным водоемам. Однако в летнее время антропогенная нагрузка на водную экосистему некоторых озер увеличивается, что приводит к ухудшению качества воды.

Ключевые слова: содово-соленые озера, микробиологический анализ воды и илов

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF WATER QUALITY AND SEDIMENTS OF SODA-SALINE LAKES OF THE ZABAIKALYE

E.Yu. Abiduyeva, L.P. Kozyreva, D.D. Tsyrenova, B.B. Namsarayev, B.B. Batobolotova,
* E.B. Matyugina

Institute of General and Experimental Biology, Ulan-Ude
Buryat State University, Ulan-Ude
*Institute of Natural Resources, Environment and Cryology Academy of Sciences, Chita

On microbiological and sanitary-bacteriological parameters investigated include the Zabaikal region lakes to clean, mildly and moderately polluted waters. However, in the summer antropogenic pressures on the aquatic ecosystem of some lakes increases, which leads to deterioration of water quality.

Key words: soda-saline lakes, microbiological analysis of water and silt

Отличительной чертой современного этапа эволюции биосферы является все возрастающее воздействие человека на водные объекты, в том числе и на озера. Преобразование водосборной территории (сведение лесов, пожары, распашка земель, внесение удобрений, осушительно-оросительная мелиорация и др.) вызывает изменение стока воды и наносов водотоков, выноса биогенных и загрязняющих веществ, а это в свою очередь влияет на водный режим озер, содержание химических веществ и увеличение биологической продуктивности.

Для степной зоны Забайкалья, где сосредоточена большая часть солоноватых и соленых озер, любые виды хозяйственной деятельности усугубляются аридными природными климатическими условиями и способствуют процессу антропогенного эвтрофирования водоемов [5].

Содовые и соленые озера Забайкалья активно используются населением для отдыха и лечения. Поэтому особое значение приобретает долговременный мониторинг химических и микробиологических показателей вод и донных отложений для их бальнеологической характеристики.

При оценке антропогенного воздействия на озера и для их рационального использования необходимо владеть информацией о водном режиме, гидрохимии, микроорганизмах, механизмах первичного и вторичного загрязнения, в целом определяющих как функционирование всех звеньев трофической цепи, так и экологическое состояние водного объекта [1, 2].

В данной статье представлены результаты микробиологического анализа донных отложений содово-соленых озер Забайкалья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основными показателями оценки качества воды и донных отложений озер являются значения минерализации и pH, концентрация химических веществ, видовой состав, численность и активность микроорганизмов, как водной толщи, так и донных отложений (табл. 1).

Непосредственно на месте отбора проб измеряли температуру воды сенсорным электротермометром Prima (Португалия), pH среды — потенциометрическим портативным pH-метром (pHep2, Португалия), общую минерализацию — портативным рефрактометром MASTER-PM (Atago, Япония). Общая численность микроорганизмов определена при помощи микроскопического метода. Численность физиологических групп микроорганизмов определена методом десятикратных разведений на элективных средах [4].

Препарат ДНК для секвенирования выделяли с помощью комплекта реагентов «РИБО-сорб» и «ДНК-сорб» (AmpliSens biotechnologies) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию фрагментов проводили с использованием групп-специфичных праймеров в термоциклере БИС (Россия). Синтез праймеров осуществлен в ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск). Скорости общего и аноксигенного фотосинтеза, темновой

Таблица 1

Микробиологическая оценка качества воды и донных отложений

Показатели	Размерность	Методы
Концентрация химических веществ	мг/дм ³ , г/дм ³	аналитической химии, ВЭЖХ
Видовой состав микроорганизмов		микробиологический молекулярно-биологический
Численность микроорганизмов	клеток в мл	микробиологический, микроскопический
Содержание хлорофилла <i>a</i>	мг/мл	спектрофотометрический
Скорость процессов: фотосинтеза, темновой фиксации CO ₂ , сульфатредукции	мг С/дм ³ сутки – // – мг S/дм ³ сутки	радиоизотопный – // – – // –

фиксации CO₂ определяли радиоизотопным методом [3, 4]. Для определения хлорофилла *a* в пробы добавляли глицерин или 96 % спирт.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованные нами озера Забайкалья имеют рН в интервале 8,5–10,6. По классификации Валяшко, по минерализации вод относятся к соленоватым (сумма солей 1,0–25,0 г/л), соленым (26–50 г/л) и рассолам (свыше 50 г/л) (табл. 2). По химическому составу большинство озер принадлежит к карбонатному типу. Водно-солевое питание содовые озера Забайкалья получают за счет грунтовых вод и временных дождевых потоков.

Климат Забайкалья резко континентальный, отличается значительными суточными и годовыми колебаниями температуры, малым количеством осадков и неравномерным распределением их по сезонам (более 70 % выпадает летом), большой сухостью воздуха. Необходимо учитывать, что значительные сезонные и межгодовые колебания температуры воздуха и количества осадков в со-

четании с небольшой глубиной озер приводят к резким изменениям состояния озер в течение года. Значения химического состава, а, следовательно, и численности бактерий и интенсивностей биогеохимических процессов могут колебаться в одном и том же озере в широких пределах. Поэтому любые наблюдения, производимые на содовых озерах Забайкалья, должны учитывать особенности озера и привязываться к определенному времени и состоянию озера.

Озера являются местами активной деятельности различных физиологических групп микроорганизмов. Видовое разнообразие микроорганизмов в озерах было изучено с использованием классических микробиологических и молекулярно-биологических методов. Ранее было показано, что микробные сообщества содовых озер содержат все основные группы микроорганизмов, осуществляющих продукцию и деструкцию органического вещества вплоть до его полного разложения [5]. Микроскопическим методом выявлено и описано 28 видов цианобактерий, наибольшее их количе-

Таблица 2

Физико-химические параметры содовых озер Забайкалья и Монголии

Озеро	Местоположение	М, г/л	рН	Дата, месяц/год
Барун Торей	Читинская область	1,8	9,0	07.1995
Зун Холво	Агинский округ	45	9,4	07.2010
Илим Тором	Читинская область	2,5	9,5	07.1995
Нижнее Белое	Бурятия	3,8	9,1	06.2002
Ножий	Агинский округ	4,7	8,8	08.2009
– // –	– // –	8,7	9,0	08.2010
– // –	– // –	10,0	9,1	08.2011
Сульфатное	Бурятия	5,6	9,2	07.2001
Горбунка	Агинский округ	8,3	9,1	07.1995
– // –	– // –	41,3	8,7	07.2004
Верхнее Белое	Бурятия	9,4	9,8	– // –
Соленое	Бурятия	8	9,5	06.2002
– // –	– // –	11,4	9,3	09.2003
Хилганта	Агинский округ	46	9,5	07.1995
– // –	– // –	230	8,9	08.2004

ство зарегистрировано в озерах с минерализацией от 5 до 7 г/л, наименьшее — в рассолах [6]. Наиболее распространен род *Leptolyngbya* (7 видов). Другие роды были немногочисленны. Дополнительно к ранее обнаруженным видам цианобактерий соленоватых и соленых озер Южного Забайкалья нами выявлено еще 10 видов: *Leptolyngbya valderiana*, *L. voronichiniana*, *Phormidium breve*, *Ph. retzii*, *Anabaena bergii*, *Arthrospira jenneri*, *Chroococcus minutus*, *Jaaginema voronichinii*, *Pseudanabaena frigida* и *Trichodesmium lacustre*.

Методом пиросеквенирования по гену 16S рДНК определена филогенетическая структура и таксономический состав домена «bacteria» поверхностного слоя донных иловых отложений из центральной части озера Соленое. Всего выявлено 2821 нуклеотидных последовательностей, объединяемых в 552 ОТЕ. Доминирует в сообществе фил Proteobacteria. Субдоминантами являются филы Chloroflexi, Firmicutes и Bacteroidetes (рис. 1).

Среди протеобактерий преобладают гамма-протеобактерии (22 % в сообществе). Среди таксонов бактерий из класса дельта-протеобактерии (9,85 % нуклеотидных последовательностей) выявлены представители р. *Desulfosarcina*, *Desulfonatronum*, *Desulfobacterium*, *Desulfobacca*, *Desulfuromusa*, *Desulfurivibrio* и *Desulfobulbus*, принадлежащие к физиологической группе сульфатредуцирующих бактерий, отвечающих за бактериальное восстановление сульфатов с образованием сероводорода, являющегося важным агентом лечебного воздействия на организм человека.

Анализ показал отсутствие бактерий, влияющих на санитарно-эпидемиологическое состояние грязи, таких, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas spp.*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter coli*.

Вода озер, используемая для питьевых и рекреационных целей, должна соответствовать определенным стандартам [7]. Важнейшим показателем качества воды является численность

микроорганизмов и особенно содержание бактерий кишечной палочки как индикатора фекальных загрязнений (табл. 3). Представленные данные показывают, что коли-индекс возрастает в озерах, используемых для поения скота и отдыха населения. При интенсивном использовании водоемов населением для отдыха и животноводства возрастает поступление лабильного органического вещества. Так, максимальные значения численности этих бактерий (1000 кл/мл) выявлены в озере Ножий, в районе базы отдыха и поения скота.

Численность сапрофитных бактерий в различных обследованных минеральных озерах значительно колебалась и зависит, в первую очередь, от водного режима и антропогенного воздействия. При снижении уровня воды в озерах наблюдается увеличение численности сапрофитных бактерий. Содержание их, как и бактерий группы кишечной палочки, было выше в озере Ножий в засушливый период, когда водная акватория озера существенно уменьшилась.

О качестве воды в водоемах можно также судить по показателю соотношения количества сапрофитов к общему числу бактерий. Он тем меньше, чем чище вода. Поступление же в водоем легко окисляемых органических веществ вызывает развитие гетеротрофов, а затем — других групп бактерий, что и приводит к повышению этого показателя. В наших исследованиях в летний период это соотношение составляло 0,001 — 0,002 %, что соответствует чистой или слабозагрязненной воде.

Активность микроорганизмов является одним из основных показателей при оценке качества воды и донных отложений. В поверхностных слоях илов общая продукция органического вещества, измеренная с применением ^{14}C -бикарбоната, составляет 31 — 77,3 мг С/дм³ сут⁻¹ (табл. 4). Большая часть органического вещества синтезируется окисленными цианобактериями. Доля аноксигенного фотосинтеза, осуществляемая пурпурными фототрофными

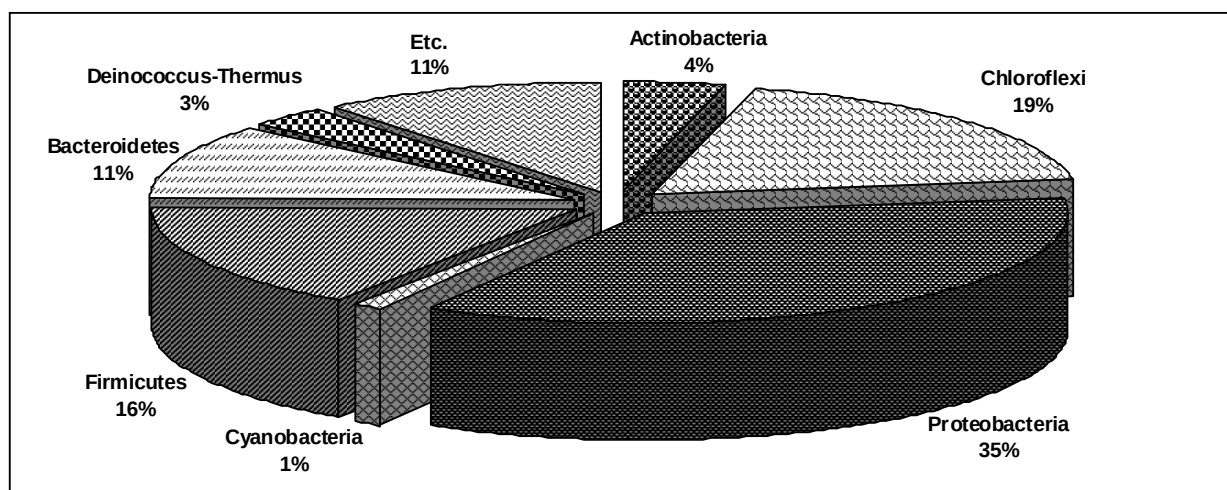


Рис. 1. Филогенетическое разнообразие поверхностного слоя донных отложений (иловых грязей) оз. Соленое (Кяхтинский район, Бурятия).

Таблица 3

Численность микроорганизмов в воде содово-соленых озер Забайкалья

Озеро	Дата анализа, месяц, год	Общее количество бактерий, млн.кл/мл	Количество сапрофитов, кл/мл	$N_{\text{бакт}}/N_{\text{сапр}}$, %	Коли-индекс	Классы загрязненности воды
Зун Холво	08.2009	1,233	1720	0,002	>100	II
Судунтуй Тором	07.2006	2,342	1350	0,001	>100	I–II
Хилганта	08.2005	2,871	2350	0,001	< 100	II
Хилганта	07.2008	2,912	1712	0,001	1000	III
Ножий	08.2009	2,771	2250	0,001	< 100	II
Ножий	08.2010	3,376	2416	0,001	< 1000	III–IV
Ножий	08.2011	3,676	2586	0,001	< 1000	III–IV
Горбунка	06.2010	3,012	2512	0,001	1000	III

Таблица 4

Скорость фотосинтеза и темновой фиксации в донных осадках содовых озер

Озера	Дата, месяц/год	Хлорофилл а, мг/л	Фотосинтез, мг С/дм ³ сут		Темновая фиксация, мг С/дм ³ сут
			общий	аноксигенный	
Хилганта	08.2007	0,67	68,8	–	0,42
Хилганта	04.2004	0,87	76,0	–	1,36
Горбунка	07.2008	0,81	24,5	12,5	8,7
Соленое	06.2002	0,74	23,5	11,6	8,5
Верхнее Белое	07.2005	0,94	68,0	18,3	7,74

Таблица 5

Скорости сульфатредукции и расход углерода в донных осадках содовых озер

Озеро	Дата, месяц/год	Минерализация, г/л	Скорость сульфатредукции, мг S/кг сут
Хилганта	07.1995	46	1,05–8,9
Хилганта	04.2004	30	1,45–38,33
Горбунка	– // –	20	0,08
Соленое	06.2002	11,4	0,35–0,64
Верхнее Белое	06.2002	9,0	51,0–69,04
Горбунка	07.1995	8,3	0,15–1,26
Сульфатное	06.2002	8	2,4–35,43
Нижнее Белое	– // –	3,8	30,97
Илим Тором	07.1995	2,5	0,39–29,0

бактериями, достигает 0,01 – 68,9 % органического вещества. Концентрация хлорофилла *a* в поверхностных слоях ила достигает 0,02 – 0,94 мг/л и, в целом, коррелирует со скоростью общего фотосинтеза.

Скорость темновой фиксации является характеристикой микробной активности донных отложений. Значения этого показателя варьирует от 0,42 до 8,7 мг С/кг сут [2]. Высокие скорости темновой фиксации выявлены в донных осадках озер Горбунка, Соленое и Верхнее Белое.

Содовые и соленые озера являются местами отдыха и лечения населения. Так, илы и воды озер Соленое, Верхнее Белое, Горбунка и Хилганта используются для лечения болезней опорно-

двигательного аппарата, кожи и т.д. Лечебными факторами являются углекислота, сероводород и другие физиологически активные вещества – продукты микробного метаболизма. Углекислота образуется при аэробном и анаэробном разложении органического вещества. Сероводород является продуктом микробного восстановления сульфатов.

Доминирующим процессом терминальной деструкции ОВ в содовых озерах является сульфатредукция. Скорость сульфатредукции в донных осадках изучена в разных типах озер (табл. 5). Наиболее интенсивно процесс восстановления сульфатов (до 69,04 мг S/кг сут) протекал в иловых отложениях при минерализации 3 – 30 г/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый комплексный подход оценки микробной деятельности в озерах позволяет всесторонне оценить деятельность микроорганизмов, участвующих в процессах продукции и деструкции органического вещества, трансформации веществ и круговороте химических элементов, формировании лечебных факторов вод и донных отложений.

При помощи микробиологического, микроскопического и молекулярно-биологического методов выявлены и описаны представители различных групп прокариот.

Исследуемые озера Забайкалья характеризуются высокой продукцией. Основными продуцентами органического вещества являются цианобактерии, которые синтезируют значительное количество кислорода. Однако бурное увеличение их численности в водоеме может приводить к неблагоприятным последствиям, таким как «цветение» воды, накопление токсических продуктов, образование многослойных структур — «матов» [5]. Вредоносность массового развития цианобактерий заключается в продуцировании большого числа опасных для здоровья людей и животных сильнодействующих токсинов, снижении качества воды, нарушении эстетического вида водоема, потере полезных для человека свойств водной экосистемы. Некоторые виды цианобактерий (*Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Artrospira*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Phormidium* и др.) образуют токсины, губительные для животных и опасны для человека.

Сульфатредукция является основным микробным процессом на конечных этапах деструкции. Они образуют химически и биологически активный сероводород. Часть этого токсичного вещества используется для вторичной продукции органического вещества.

Количественная оценка микробной активности показывает, что аэробные и анаэробные микроорганизмы активно участвуют в продукции метаболитов, имеющих лечебное значение. К ним относятся микробный синтез углекислоты, органических кислот, витаминов, сероводорода и т.д.

Проведенные исследования показали, что по гидрохимическим, микробиологическим и сани-

тарно-бактериологическим показателям исследованные озера в настоящее время можно отнести к чистым, слабозагрязненным и умеренно-загрязненным водоемам. Однако в летнее время антропогенная нагрузка на водную экосистему озер может увеличиваться, что приведет к ухудшению качества воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 10-04-01185а, 12-04-10048к, 12-05-00871а, интеграционных грантов Президиума СО РАН 56 и 94 и БГУ «Научная школа».

ЛИТЕРАТУРА

1. Водный режим и изменения гидрохимических показателей щелочного соленого озера Хилганта (Юго-Восточное Забайкалье) / З.Б. Намсараев [и др.] // Водные ресурсы. — 2010. — № 4. — С. 477 — 483.
2. Намсараев Б.Б., Намсараев З.Б. Микробные процессы круговорота углерода и условия среды обитания в щелочных озерах Забайкалья и Монголии // Алкалофильные микробные сообщества: Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. М., 2007. — Вып. 14. — С. 218 — 237.
3. Подавление процессов фотосинтеза цианобактерий и планктонных водорослей метаболитами бактерий *Brevibacillus laterosporus* / Н.И. Кузнецова [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2008. — Т. 421, № 2. — С. 262 — 266.
4. Практикум по микробиологии. Учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов [и др.]; под ред. А.И. Нетрусова. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 607 с.
5. Солоноватые и соленые озера Забайкалья / Б.Б. Намсараев [и др.]. — Улан-Удэ : Изд. БГУ, 2009. — 340 с.
6. Таксономическая и экологическая характеристика цианобактерий некоторых солоноватых и соленых озер Южного Забайкалья / Д.Д. Цыренова [и др.] // Микробиология. — 2011. — Т. 80, № 2. — С. 230 — 240.
7. Требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников / Санитарные правила (Сан.ПиН 2.1.4.544-96). — М.: Информ.-изд. центр Госкомсанэпиднадзора России, 1996. — 26 с.

Сведения об авторах

Намсараев Баир Бадмабазарович — доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел. (3012)434902; e-mail: bair_n@mail.ru)

Абидуева Елена Юрьевна — доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; e-mail: abidueva_l@mail.ru)

Козырева Людмила Павловна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, ученый секретарь Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)

Цыренова Дулма Доржиевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)

Батоболотова Бадарма Баировна — аспирант 3-го года обучения лаборатории микробиологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)

Матюгина Евгения Борисовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории водных экосистем, ученый секретарь Института природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН

Д. Абмэд¹, Ж. Батаа¹, Д. Ану¹, М.А. Хаснатинов², Г.А. Данчинова², П. Нимадаваа^{1,3},
Д. Нимахуу¹

ИТОГИ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В МОНГОЛИИ

¹Национальный центр по исследованию инфекционных болезней (Улан-Батор, Монголия)

²ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

³Монгольская академия медицинских наук (Улан-Батор, Монголия)

В 1999–2011 гг. проводили исследования с участием Российских ученых в основном на территории северной Монголии и частично центральной, восточной Монголии. Выявлены клещевые инфекции: клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, клещевой риккетсиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека и бабезиоз. Клещевые инфекции привлекают в последние годы все большее внимание исследователей из-за распространенности и роста заболеваемости.

Ключевые слова: Монголия, клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, клещевой риккетсиоз, гранулоцитарный анаплазмоз человека, бабезиоз

RESULTS OF INVESTIGATION OF TICK-BORNE INFECTIONS IN MONGOLIA

D. Abmed¹, Zh. Bataa¹, D. Anu¹, M.A. Khasnatinov², G.A. Danchinova², P. Nimidavaa^{1,3},
D. Nimahuu¹

¹National Center of Infection Diseases Research, Ulaanbaatar

²Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

³Mongolian Academy of Medical Sciences, Ulaanbaatar

During 1999–2011 we conducted the collaborative research in Northern, Central and Eastern Mongolia. Several tick-borne infections were revealed in ticks and human patients. Most important of them are tick-borne encephalitis, Lyme disease, tick-borne rickettsiosis, human granulocytic anaplasmosis and babesiosis. The importance, risk of infection and spread of tick-borne diseases in Mongolia are discussed in the paper.

Key words: Mongolia, tick-borne encephalitis, Lyme disease, tick-borne rickettsiosis, human granulocytic anaplasmosis, babesiosis

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Этиология. Были выделены и обнаружены: вирусы клещевого энцефалита (ВКЭ), штаммы 92М, 940М-Урал-Сибирский генотип, имеют близкое родство со штаммами Заусаева и Васильченко, штаммы MNG-TBE2008-107 и MNG-TBE2008-108-Дальневосточный генотип, боррелии — *B. garinii*, *B. afzelii*, риккетсии — *candidatus R. trasevichiae*, анаплазмы — *A. phagocytophilum* и бабезия — *B. microti*.

Переносчики. На территории, где проводили исследования, были определены 4 вида клещей: *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor nuttalli*, *D. silvarum*, *Haemaphysalis concinna*. Основным переносчиком возбудителей КЭ, КБ, ГЭЧ и бабезиоза в Монголии лесной клещ *I. persulcatus*. Численность клещей *I. persulcatus* в среднем составила 16,9 экз. на 1 флаг/км. Показатели обилия, достигающие в среднем до 150–161 экз. (до 380 экз.) на 1 флаг/км отмечены в Селенгинском аймаке, в селе Буганте. Зараженность *I. persulcatus* ВКЭ составила в среднем 3,4 %, возбудителями КБ — в среднем 12,4 %.

Эпидемиология. При характеристике сезонности заболеваний клещевыми инфекциями: КЭ, КБ 59,4 % отмечены в июне, 26,4 % — в июле, КР — 30 % в апреле, 59,1 % — в мае, 10,9 % — в июле. Большое обилие клещей, наряду с регулярными выездами населения в активные природные очаги клещевых инфекций с бытовыми и производственными це-

лями, такими, как, например, сбор оленьих рогов или золотодобыча, обеспечивают высокую частоту контактов с клещами и практически стопроцентную покусанность населения. Среди заболевших отмечены люди разных специальностей, однако преобладают пастухи, сельскохозяйственные работники, ученики и отдыхающие.

Клиника. Клиническая форма КЭ представлена: лихорадочной формой — 35,2 %, менингеальной формой — 14,2 %, менингоэнцефалитической формой — 36,4 %, полирадикулярной формой — 9,9 %, полимиелитической формой — 4,3 %; КБ — нервная форма — 57,1 %, кожная — 30,5 %, суставная — 7 % и сердечная форма — 5,4 %. Клиническая характеристика КР: первичный аффект на месте укуса клеща — лимфаденопатия, высыпания на коже. Особенностью клиники являются 3 симптома (20 % случаев), 2 симптома — первичный аффект + лимфаденопатия (80 % случаев). Суммарный показатель заболеваемости клещевых инфекций в Монголии: КЭ и КБ 0,01–0,2, КР 0,1–0,4 на 10 тыс. населения.

Основная причина роста заболеваемости клещевых инфекций в Монголии — увеличение видового разнообразия, численности и инфицированности возбудителями клещей и их прокормителей, усиление контактов населения с активными природными очагами клещевых инфекций, низкий уровень специфической и неспецифической профилактики.

Сведения об авторах

Абмэд Д. – д.б.н., руководитель группы паразитологии Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

Батаа Ж. – д.м.н., заведующий отделом эпидемиологии Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

Ану Д. – д.б.н., научный сотрудник Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

Хаснатинов М.А. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, а/я 525; Тел. (3952) 333971; e-mail: khasnatinov@yandex.ru)

Данчинова Г.А. – д.б.н., руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, а/я 525; Тел. (3952) 333971)

Нимадаваа П. – д.м.н., профессор, академик Монгольской академии медицинских наук

Нимахуу Д. – д.м.н., профессор, директор Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

С.Н. Адамович¹, А.П. Федосеев², Р.В. Киборт², Р.Г. Мирсков¹, А.Н. Мирскова¹ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА БАКТЕРИЙНОЙ МАССЫ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТЕИНА А)¹ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

Впервые изучено влияние 2-гидроксиэтиламмониевых солей биологически активных арилсульфанилуксусных кислот на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), биомассы бактерий Мережковского (*Salmonella typhi* *spermophilorum*) и кишечной палочки (*E. coli* М-17). Внесение стимуляторов роста в питательную среду в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % повышает выход бактериальной массы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* на 32–40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi* *spermophilorum* – на 47,5–140,4 %, кишечной палочки – на 11,4–59,4 %. Увеличение выхода биомассы микроорганизмов с использованием стимуляторов открывает путь к их практическому использованию в процессах крупномасштабного глубинного культивирования золотистого стафилококка с целью получения ценного протеина А, биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин, для производства лекарственных пробиотических препаратов, для уничтожения грызунов (переносчиков чумы, вредителей урожая зерна, продуктов питания).

Ключевые слова: стимуляторы повышения выхода ценной биомассы микроорганизмов

PROSPECTIVE GROWTH STIMULATORS OF BACTERIAL MASS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (TO PRODUCE PROTEIN A)S.N. Adamovich¹, A.P. Fedoseyev², R.V. Kibort², R.G. Mirskov¹, A.N. Mirskova¹¹ A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The influence of 2-hydroxyethylammonium salts of biologically active arylsulfanylacetic acids on the yield of bacterial mass of *Staphylococcus aureus* (strain 209), biomass of Merezhevsky's bacteria (*Salmonella typhi* *spermophilorum*) and *E. coli* (*E. coli* M-17) has been studied for the first time. The introduction of growth stimulators (in concentration of 10^{-3} – 10^{-8} wt. %) into nutrient medium increases the yield of microorganisms bacterial mass: *Staphylococcus aureus* by 32–40 %, Merezhevsky's bacteria *Salmonella typhi* *spermophilorum* by 47,5–140,4 %, *E. coli* by 11,4–59,4 %. The increase of yield of the microorganisms biomass reached by application of the growth stimulators opens the route to their utilization in large-scale processes of *Staphylococcus aureus* cultivation for the production of valuable protein A, biopreparations, diagnostic agents, serum, vaccines, probiotic drugs as well as for the struggle with rodents (plaque carriers, pests).

Key words: growth stimulators of valuable microorganisms mass

Разработка и совершенствование процессов производства биопрепаратов, в частности, бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (для получения протеина А) является актуальной задачей. В настоящее время бактериальная масса стафилококка широко используется как источник белка А-протеина, который является важнейшим компонентом современных бактериальных биопрепаратов, биоспецифических иммуно- и гемосорбентов, диагностических средств, питательных и защитных сред, сывороток, вирусных вакцин. На его основе разработаны новые иммуноплазмасорбенты с зафиксированным на них девитализированным золотистым стафилококком, высокоэффективные при острых отравлениях, заболеваниях печени и почек, хирургических эндогенных интоксикациях, аутоиммунных и психоневрологических заболеваниях.

А-протеин, выделяемый из клеточной стенки золотистого стафилококка, где его содержание составляет 1,7 % сухого веса клетки или 6,7 % веса клеточной стенки, имеет неограниченное значение в качестве детектора иммуноглобулина IgG при иммунодиагностике для определения IgG-фракции человека, для очистки, иммобилизации и детекции

иммуноглобулинов, при иммуноферментном анализе, в биосенсорах.

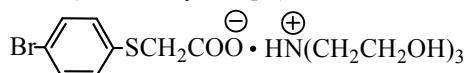
В решении задачи повышения выхода бактериальной массы стафилококка для получения протеина А положительную роль может сыграть использование стимуляторов роста. Благодаря огромному биологическому [2] потенциалу перспективны для этих целей

2-гидроксиэтиламмониевые соли органикокси(сульфанил)(сульфонил)уксусных кислот с общей формулой $R_n(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_{3-n}\text{N}^+\text{H} \cdot \text{O}^-(\text{O})\text{CCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}$; R = H, Me, X = O, S, SO₂; n = 0–2.

Проведенные ранее лабораторные и опытно-промышленные испытания ряда соединений из класса 2-гидроксиэтиламмоний органикокси(сульфанил)(сульфонил)ацетатов показали их существенное влияние на выход биомассы дрожжей [3, 5, 7]. Так, например, при добавлении указанных выше соединений в питательные среды в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % увеличился выход бактериальной массы дрожжей рода *Candida* на 14–18 %, содержание в ней протеина на 10–12 %, а суммы аминокислот на 7–7,5 %; выход биомассы дрожжей рода *Saccharomyces*

cerevisiac возрастал на 15–18 %, суммарное содержание аминокислот на 20–29 % по сравнению с контролем. Соединения указанной структуры повышали также выход биомассы бактерий рода *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Acetobacter* и др., гриба *Aspergillus niger* — продуцента пищевой лимонной кислоты, ускоряли проращивание ячменя в техно-логии получения пивоваренного солода, рост тутового и дубового шелкопрядов [3], рост микроорганизмов рода *Bacillus mucilaginosus* (Bm), биомасса которых является высоко-эффективной белково-витаминно-ферментной добавкой в корм сельскохозяйственных животных и птиц на 22–44 % [3]. С добавкой стимулятора нарастание биомассы бифидо-бактерий происходит быстрее в 3–4 раза, при этом достигается концентрация бифидо-бактерий 10^{12} – 10^{14} клеток в мл продукта, что на 4–6 порядков выше, чем в контроле за более длительное время [4]. Получены первые результаты по существенному стимулированию роста (в 2–2,5 раза) эмбриональных человеческих клеток, используемых в лечении многих заболеваний методами клеточной терапии [8]. При этом не обнаружено даже признаков дистрофии клеток.

Влияние 2-гидроксиэтиламмоний органилокси(сульфанил)(сульфонил)ацетатов на повышение выхода биомассы *Staphylococcus aureus* практически не изучено. Известен единичный пример: профессор С.-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера д.м.н. Виноградов Е.Я. впервые обнаружил стимулирующее действие на рост стафилококка *Staphylococcus Coowan* синтезированного нами нового соединения — 4-бромфенилсульфанилацетата трис(2-гидроксиэтил)аммония, который в концентрации 4×10^{-4} вес. % в мясопептонном бульоне увеличивал выход сухой бактериальной массы на 25–28,8 % по сравнению с контролем (без стимулятора):



Развивая эти исследования с целью поиска перспективных стимуляторов повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus*, мы из-

учили влияние 2-гидроксиэтил-аммониевых солей биологически активных арилсульфанилуксусных кислот на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), бактерий Мережковского (*Salmonella typhi spermophilorum*) и кишечной палочки (*E. coli* М-17).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения, использованные для испытаний в качестве потенциальных стимуляторов повышения выхода бактериальной массы микроорганизмов, впервые синтезированы в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Испытания их стимулирующей активности проведены на кафедре микробиологии Иркутского государственного медицинского университета.

В работе использовали тестовые культуры *St. aureus* (штамм № 209), а также бактерий Мережковского *Salmonella typhi spermophilorum* и кишечную палочку (*E. coli* М-17).

Готовили последовательные серийные разведения стимуляторов от 10^{-3} до 10^{-8} вес. % в 4,5 мл питательной среды — мясопептонный агар (МПА). В качестве контроля — 4,5 мл МПА без стимулятора. В каждую пробирку делали посев суточной бульонной культуры по одной калиброванной бактериологической петле. Термостатировали 24 ч при 37 °С. После этого содержимое пробирок высушивали во взвешенных на аналитических весах чашках Петри в сушильном шкафу при 90 °С до постоянного веса. Стимулирующее действие препаратов учитывали через 24 часа по увеличению биомассы в % по отношению к контролю (вес микробной массы в МПА без стимуляторов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано влияние 8 соединений из ряда 2-гидроксиэтиламмоний органилокси-(сульфа-нил)(сульфонил)ацетатов на выход биомассы микроорганизмов в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % в питательной среде. Все соединения данного ряда проявляют различный по величине стимулирующий эффект по отношению к микроорганизмам, величина которого зависит от строения стимуля-

Структура активных стимуляторов 1–3.

Таблица 1

Соединение	Формула
1. Трис(2-гидроксиэтил)аммония 4-хлорфенилсульфанилацетат	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SCH}_2\text{COO}^\ominus \cdot \text{HN}^\oplus(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
2. Диметил-(2-гидроксиэтил)аммония 2,4-динитрофенилсульфанилацетат	$\text{NO}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)-\text{SCH}_2\text{COO}^\ominus \cdot \text{HN}^\oplus(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
3. L-(+)-трео-1-пара-нитрофенил- 2-аммоний-пропандиола-1,3 4-хлорфенилсульфанилацетат	$\text{O}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_3^\oplus)-\text{CH}_2\text{OH} \cdot \text{OOCCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$

Таблица 2

Увеличение выхода бактериальной массы микроорганизмов (в % к контролю)

№ соединения	Концентрация соединений, вес. %	<i>St. aureus</i> (штамм № 209)	Бактерии <i>Salmonella typhi</i> <i>spermophilorum</i>	Кишечная палочка
2	10^{-3}	9,3	63,25	59,64
	10^{-4}	28,5	63,13	
	10^{-5}	16,01	21,3	41,4
	10^{-6}	26,17	65,4	41,08
	10^{-7}	31,96	140,39	12,24
	10^{-8}	17,4	120,81	16,72
3	10^{-3}	4,31	50,09	
	10^{-4}	9,03	59,0	13,16
	10^{-5}		47,52	
	10^{-6}	40,39	52,92	11,39
	10^{-7}	36,41	53,16	2,56
	10^{-8}		60,83	

торов, их концентрации и от вида бактерий. Так, соединение 1 повышает выход биомассы кишечной палочки в концентрации $10^{-3} - 10^{-5}$ на 19,2–28,5 % и лишь на 1,5–2,5 % выход биомассы стафилококка. Большое влияние из испытанных веществ на выход биомассы *Staphylococcus aureus*, бактерий Мережковского и кишечной палочки проявили алканоламмониевые соли серосодержащих 4-хлор и 2,4-динитрофенилсульфанилуксусных кислот (табл. 1). Показатели увеличения выхода биомассы микроорганизмов под влиянием стимуляторов 2, 3 по сравнению с контролем через 24 часа культивирования при 37 °C представлены в таблице 2.

Таким образом, внесение стимуляторов роста (2, 3) в питательную среду в концентрациях $10^{-3} - 10^{-8}$ вес. % повышают выход бактериальной массы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* на 32–40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi* *spermophilorum* — на 47,5–140,4 %, кишечной палочки — на 11,4–59,4 %. Стимулирующий эффект соединений 1–3 обусловлен, по-видимому, их активностью как антиагрегантов, стабилизаторов клеточных мембран, антиоксидантов, уменьшающих интенсивность процессов перекисного окисления липидов биологических мембран [1, 6].

Полученные результаты по увеличению выхода ценной биомассы микроорганизмов с использованием стимуляторов открывают путь к их практическому использованию в биотехнологических процессах получения биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин и др. Так, стимуляторы повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus* перспективны для применения в процессах крупномасштабного глубинного культивирования золотистого стафилококка с целью получения ценного препарата — протеина А.

Биомасса бактерий Мережковского (*Salmonella typhi* *spermophilorum*), безвредных для человека и домашних животных, но вызывающих тиф грызунов со смертельным исходом, находит применение

в биологическом методе дератизации для уничтожения вредных грызунов (переносчиков чумы и др. опасных заболеваний, вредителей урожая зерна, продуктов питания) в местах их массовых скоплений (продовольственные склады, морские порты, города).

Биомасса кишечной палочки *E.coli* M-17 используется для производства лекарственных пробиотических препаратов, например, колибактерина, бификола, биофлора, которые применяются в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. Пробиотики способствуют нормализации микрофлоры, стимулируют местные репаративные процессы в кишечнике; улучшают пищеварение и обмен веществ; стимулируют естественные факторы защиты. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по использованию кишечной палочки для производства биотоплива.

Используемые для культивирования микроорганизмов природные стимуляторы дефицитны и дороги. Преимуществом химических стимуляторов является их доступность благодаря разработанным нами способам получения и технологии производства из промышленного сырья, безвредность, постоянный состав, высокая активность при добавлении в питательные среды в низких концентрациях. Введение стимуляторов в питательные среды позволяет сократить добавление дорогостоящих витаминов, аминокислот — цистеина, триптофана, ферментативных гидролизатов казеина, сои, мяса, нативной сыворотки крови и др. Разработаны лабораторные технологические регламенты производства, технические условия на ряд препаратов. Технология опытного производства стимуляторов опробована на Усолье-Сибирском химфармкомбинате. Применение данных стимуляторов не требует капитальных вложений на дополнительное оборудование и изменение технологической схемы производства.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлен стимулирующий эффект 2-гидроксиэтиламмониевых солей 4-хлорфенилсульфанилуксусной кислоты на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), биомассы бактерий Мережковского (*Salmonella typhi* *spermophilorum*) и кишечной палочки (*E. coli* М-17).

2. Внесение стимуляторов в питательную среду в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % увеличивает выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* на 32–40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi* *spermophilorum* — на 47,5–140,4 %, кишечной палочки — на 11,4–59,4 %, что открывает путь к повышению эффективности процессов крупномасштабного культивирования золотистого стафилококка (с целью получения ценного протеина А, биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин), кишечной палочки (для производства лекарственных пробиотических препаратов), препаратов для уничтожения грызунов (переносчиков чумы, вредителей урожая зерна, продуктов питания).

ЛИТЕРАТУРА

1. 2-Гидроксиалкил-аммониевые соли арилтиоуксусных кислот и их влияние на функциональную активность тромбоцитов / Г.Г. Левковская [и др.] // Хим.-фарм. журнал. — 1986. — № 3. — С. 295–300.

2. 2-Гидроксиэтиламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот — но-

вых фармакологически активных соединений / А.Н. Мирскова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. — 2011. — Т. 19, № 5. — С. 467–478.

3. Алканоламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот — новые стимуляторы биологических процессов / А.Н. Мирскова [и др.] // Ж. оп. Х. — 2008. — Т. 44. — Вып. 10. — С. 1501–1508.

4. Влияние трис-(2-гидроксиэтил)аммоний ароксид-, арилтио- и арилсульфонилацетатов на жизнедеятельность бифидобактерий / А.Н. Мирскова [и др.] // Докл. АН. — 2003. — Т. 390, № 2. — С. 280–282.

5. Воронков М.Г., Горбалинский В.А., Дьяков В.М. Крезацин — новый биостимулятор микробиологического синтеза // Докл. АН. — 2003. — Т. 369, № 6. — С. 831–832.

6. Синтез и биологическая активность трис-(2-оксиэтил)аммониевых солей органилтиоуксусных кислот / Г.Г. Левковская [и др.] // Хим.-фарм. ж. — 1983. — № 6. — С. 679–683.

7. Способ получения хлебопекарных дрожжей / А.Н. Мирскова [и др.]. — А.с. СССР 1350172 (1987). — Бюлл. изобр. 1987. — № 41.

8. Экспериментальное изучение влияния некоторых биологически активных веществ на рост фибробластов / В.Ю. Кассин [и др.] // Российская оториноларингология. — 2004. — Т. 5, № 12. — С. 85–88.

Сведения об авторах

Адамович Сергей Николаевич — к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

Киборт Рудольф Вадимович — д.м.н., заслуженный профессор кафедры микробиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»

Мирсков Рудольф Григорьевич — д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ)

Мирскова Анна Николаевна — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)

В.А. Алешкин, О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, И.К. Мазурова

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ШТАММОВ
BORDETELLA PERTUSSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ КОКЛЮШЕМ В РОССИИ**

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

На основании изучения особенностей структуры 7 генов, детерминирующих основные факторы патогенности возбудителя коклюша, — *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу A-комплекса; *ptxB*, *ptxC*, *ptxD* и *ptxE*, кодирующих S2, S3, S4 и S5 субъединицы B-комплекса коклюшного токсина, его промоторной области (*ptxP*), и *prn*, кодирующего пертактин, показаны особенности генотипической изменчивости штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России. Прослежена динамика формирования популяции штаммов возбудителя коклюша и установлено, что популяция формируется путем клональной экспансии штаммов с новой генетической структурой основных факторов патогенности — коклюшного токсина и пертактина. Установлен состав популяции штаммов *B. pertussis*, вызывающих заболевание коклюшем на современном этапе эпидемического процесса коклюшной инфекции — доминирование штаммов с новыми «невакцинными» аллелями генов — *ptxA1* (97,7 %), *ptxC2* (87,4 %), *prn2* (89,5 %) и *ptxP3* (93,3 %), в 2,2 % случаях с *ptxB2* аллелем и в 1,3 % случаях с *prn9* аллелем.

Ключевые слова: *Bordetella pertussis*, генотипирование, ген, аллели

**FEATURES OF GENOTYPING VARIABILITY OF STRAINS OF BORDETELLA PERTUSSIS
ALLOCATED FROM PATIENTS WITH WHOOPING COUGH IN RUSSIA**

V.A. Aleshkin, O.Yu. Borisova, N.T. Gadua, I.K. Mazurova

G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

On the basis of studying of features of structure of 7 genes determining major factors of pathogenicity of the causative agent of whooping cough — *ptxA*, *ptxB*, *ptxC*, *ptxD*, *ptxE*, *ptxP* and *prn*, features of genotyping variability of strains of *B. pertussis* allocated from patients with whooping cough in Russia are shown. Dynamics of formation of population of strains of the causative agent of whooping cough is tracked and is established that population of strains of *B. pertussis* is formed by clonal expansion of strains with new genetic structure of major factors of pathogenicity — pertussis toxin and pertactin. The structure of population of strains of *B. pertussis* causing a disease by whooping cough at the present stage of epidemic process of a pertussis infection — domination of strains with new «non-vaccine» alleles genes — *ptxA1* (97,7 %), *ptxC2* (87,4 %), *prn2* (89,5 %) and *ptxP3* (93,3 %), in 2,2 % cases with *ptxB2* allele and in 1,3 % cases with *prn9* allele circulate.

Key words: *Bordetella pertussis*, genotyping, gene, alleles

Коклюш до середины 1950-х годов прошлого столетия представлял серьезную проблему для здравоохранения в различных странах мира. Введение специфической вакцинопрофилактики коренным образом изменило характер течения эпидемического процесса коклюшной инфекции и способствовало уменьшению не только количества случаев заболеваний, но и летальности. Однако коклюш по-прежнему остается одной из 10 причин младенческой смерти во всем мире и продолжает быть проблемой здравоохранения даже в странах с высоким уровнем охвата профилактическими прививками, где с середины 1990-х годов отмечается рост заболеваемости коклюшем, который стал наиболее распространенным среди вакциноуправляемых инфекций [1, 4, 6, 11, 12, 14].

В России решающую роль в проблеме борьбы с коклюшем сыграла специфическая массовая иммунизация детского населения АКДС-вакциной, которая введена в 1958 — 1960 гг. Благодаря увеличению охвата вакцинацией детей заболеваемость снизилась в первые годы иммунизации в 3,5 раза, а в последнее десятилетие — более чем в 60 раз, по сравнению с допрививочным периодом. Если в 1990-х годах привитость против коклюша не достигала 88 %, то с 2001 года показатель по стране вырос

до 95 %. В 2000-е годы в многолетней динамике наблюдались маловыраженные подъемы заболеваемости, а в 2008 — 2011 гг. она стабилизировалась на уровне 2,5 — 3,8 на 100 тыс. населения. Показатель смертности по сравнению с 1990-ми годами снизился в 2,4 раза. Однако по-прежнему регистрируются единичные летальные исходы; в возрастной заболеваемости в 92 % случаях преобладает детское население; заболеваемость регистрируется как среди не привитых, так и привитых лиц; тяжелые формы заболевания (в среднем 73,5 %) и осложнения (46 %) преобладают у детей первого года жизни [15, 17, 18, 20, 21, 23]. Следовательно, даже на фоне высокого уровня охвата профилактическими прививками коклюшная инфекция остается актуальным инфекционным заболеванием. Это свидетельствует о сохраняющейся циркуляции возбудителя, что, по мнению зарубежных и отечественных исследователей, связано с изменением его биологических, как фенотипических, так и генотипических, свойств [1 — 7, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 22]. Поэтому наблюдения за возбудителем коклюша остается по-прежнему одним из важнейших элементов в системе эпидемиологического надзора за коклюшной инфекцией.

В ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора на протяжении многих лет осу-

ществляется микробиологический мониторинг и молекулярно-генетическое типирование штаммов *B. pertussis*, выделенных на территории России. Анализ генетической структуры циркулирующей популяции штаммов *B. pertussis* проводится путем изучения особенностей структуры 7 генов, детерминирующих основные факторы патогенности возбудителя коклюша, — гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу А-комплекса; генов *ptxB*, *ptxC*, *ptxD* и *ptxE*, кодирующих S2, S3, S4 и S5 субъединицы В-комплекса коклюшного токсина, соответственно, промоторной области коклюшного токсина (*ptxP*), а также гена *prn*, кодирующего пертактин. Изучено 371 штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в России, как в последние десять лет (2000 — 2010 гг.), так и в прошлые годы (музейные штаммы из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора). Штаммы *B. pertussis* выделены в различные периоды эпидпроцесса коклюшной инфекции: I период — допрививочный и первые десять лет проведения массовой иммунизации детского населения АКДС-вакциной (1948 — 1969 гг.), II — период стабилизации заболеваемости в 1970-е годы и роста заболеваемости в 1980-е годы при резком уменьшении охвата профилактическими прививками (1970 — 1999 гг.) и III — период относительной стабилизации заболеваемости на фоне роста охвата прививками, который к настоящему времени достиг 95,6 % (2000 — 2010 гг.).

При проведении молекулярно-генетического типирования среди изученных штаммов *B. pertussis*, выделенных в различные периоды эпидпроцесса, выявлены штаммы, имеющие один из трех аллелей гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу А-комплекса коклюшного токсина, — *ptxA2*, *ptxA4* или *ptxA1* аллели. Из них *ptxA2*/*ptxA4* аллели являются «вакцинными» аллелями, а *ptxA1* аллель — «невакцинным» аллелем, который отличается от «вакцинного» *ptxA4* аллеля значимыми мутациями в четырех положениях — 204, 586, 684 и 969 нуклеотидной последовательности, а от «вакцинного» *ptxA2* аллеля в положении 204 нуклеотидной последовательности, приводящими к изменениям на аминокислотном уровне коклюшного токсина — глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту (E68D) и метионина на изолейцин (M228I). Эти изменения затрагивают Т- и В-эпитопы коклюшного токсина, имеющие непрерывные иммунодоминантные структуры, распознаваемые протективными моноклональными mAbs-антителами к этим эпитопам [8, 10, 11]. Поэтому замены одной или двух аминокислот в этих областях предотвращает связывание с этими протективными антителами. Было показано, что в допрививочный период (1948 — 1959 гг.) вся циркулирующая популяция и все три вакцинных штамма характеризовались старыми «вакцинными» *ptxA2*/*ptxA4* аллелями гена *ptxA*, кодирующего S1 субъединицу А-комплекса коклюшного токсина (рис. 1). В конце 1960-х годов в популяции штаммов *B. pertussis* стали регистрироваться единичные

штаммы (9,5 %) с новым «невакцинным» *ptxA1* аллелем. В 1970-е годы большинство циркулирующих штаммов имели старые «вакцинные» аллели *ptxA* гена: 48,4 % штаммов — «вакцинный» *ptxA4* аллель, 35,5 % штаммов — «вакцинный» *ptxA2* аллель и 16,1 % штаммов характеризовались «невакцинным» *ptxA1* аллелем. Все изученные штаммы *B. pertussis*, выделенные в 1980 — 1990-е гг. прошлого столетия и в начале нового столетия 2000 — 2005 гг., имели «невакцинный» *ptxA1* аллель гена. В настоящее время в популяции доминируют (в 92,1 % случаях) штаммы с «невакцинным» *ptxA1* аллелем и зарегистрированы единичные штаммы со старыми «вакцинными» *ptxA2*/*ptxA4* аллелями. По-видимому, выявление таких штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в различных регионах нашей страны, со старым «вакцинным» аллелем свидетельствует о том, что такие штаммы продолжают циркулировать. Вероятно, однородность популяции в 1980 — 1990-е годы и в начале 2000-х годов объясняется тем, что не были выявлены все аллельные варианты у штаммов *B. pertussis*.

Также существенные изменения произошли у штаммов *B. pertussis* в структуре гена пертактина (*prn*), являющегося поверхностным белком, ответственным за адгезию возбудителя. Нуклеотидные последовательности гена *prn* циркулирующих штаммов *B. pertussis* соответствовали одному из четырех выявленных аллелей — *prn1*, *prn3*, *prn2* и *prn9* (рис. 1). Все штаммы *B. pertussis* допрививочного периода и вакцинные штаммы характеризовались наличием «вакцинного» *prn1* аллеля гена. В последующие годы отмечалось постепенное сокращение доли таких штаммов и увеличение штаммов с новой генетической структурой. Среди штаммов *B. pertussis*, выделенных в 1970-е годы, 96,9 % штаммов имели «вакцинный» *prn1* аллель и 3,1 % штаммов — «невакцинный» *prn3* аллель гена, к концу 1980-х годов в популяции появились также штаммы с другим «невакцинным» *prn2* аллелем. Среди штаммов *B. pertussis*, выделенных в 1990 — 1999 гг., 44,5 % штаммов имели «вакцинный» *prn1* аллель, 22,2 % штаммов — «невакцинный» *prn2* аллель и 33,3 % штаммов — «невакцинный» *prn3* аллель, т.е. значительно увеличилась доля циркулирующих штаммов *B. pertussis* с «невакцинным» *prn2* аллелем гена. «Невакцинные» *prn2* и *prn3* аллели отличались от «вакцинного» *prn1* аллеля значимыми мутациями в положениях 828, 831, 832 — 834, приводящими к контрастным заменам аминокислот в двух положениях — валина на глицин в V279G и аланина на фенилаланин (A278F). Последовательность нуклеотидов *prn2* аллеля отличается от последовательности нуклеотидов *prn3* аллеля наличием одного дополнительного фрагмента в 15 п.н. (повторяющаяся последовательность) в 1 области гена, т.е. удлиняющего ген *prn* и, следовательно, Prn белок. Такой фрагмент, по-видимому, появился в гене пертактина у штаммов *B. pertussis*, уже имеющих *prn3* аллель, что подтверждается данными литературы, свидетельствующими о более раннем появлении штаммов

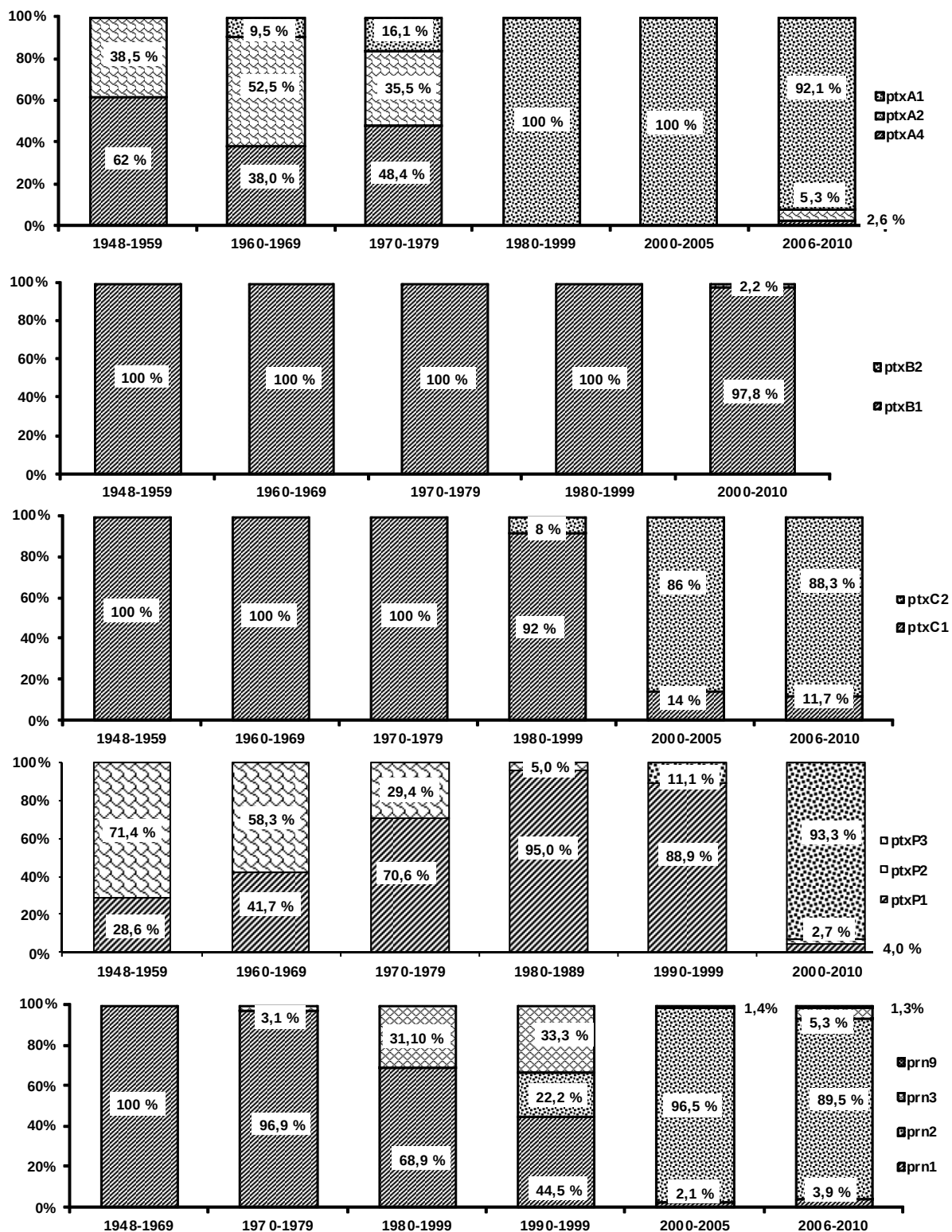


Рис. 1. Удельный вес штаммов *B. pertussis* с аллельными вариантами ptxA, ptxB, ptxC, ptxP и prn генов в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции.

с prn3 аллелем, по сравнению со штаммами с prn2 аллелем [1, 2, 4, 11, 14]. Изучение структуры гена prn у штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем в начале этого века, показало, что большинство (97,9 %) штаммов *B. pertussis* характеризовались «невакцинными» prn2 и prn3 аллелями гена пертактина. В 2006 – 2010 гг. у цир-

кулирующих штаммов *B. pertussis* наблюдается большая гетерогенность «невакцинных» аллелей: 89,5 % штаммов характеризуются «невакцинным» prn2 аллелем, 5,3 % штаммов – «невакцинным» prn3 аллелем, и впервые выявлены 1,3 % штаммов с другим «невакцинным» prn9 аллелем, последовательность нуклеотидов которого соответствует

последовательности нуклеотидов рпn2 аллеля, но имеющим дополнительный фрагмент в 30 п.н. и, следовательно, более удлиненный Рпn белок, что существенно отличает его от «вакцинного» рпn1 аллеля. Все эти изменения произошли в иммуногенных областях, которые участвуют в инициации иммунного ответа. Эти повторяющиеся области сближены в полипептидной цепи и формируют единый конформационный эпитоп, который участвует во взаимодействии с протективными антителами, поэтому произошедшие изменения оказывают существенное влияние на процесс формирования иммунного ответа [9, 13].

При изучении структуры гена *ptxB*, кодирующего S2 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина, оказалось, что вплоть до настоящего времени вся циркулирующая популяция штаммов *B. pertussis* и все три вакцинных штамма несли «вакцинный» *ptxB1* аллель этого гена (рис. 1). Однако впервые в 2007 г. были выявлены два современных штамма *B. pertussis* с новым «невакцинным» *ptxB2* аллелем, имеющим значимые мутационные изменения в структуре гена *ptxB*. Этот аллель характеризуется наличием значимых мутаций в положениях 65-ом и 290-ом нуклеотидной последовательности, которые сопровождаются контрастными заменами на аминокислотном уровне — серина на цистеин (S22C) и валина на глутаминовую кислоту (V97Glu), что оказывает существенное влияние, как на скорость сборки самой субъединицы, так и на транспорт А-комплекса внутрь клетки хозяина. Следует отметить, что штаммы *B. pertussis*, имеющие такие значимые мутационные изменения в структуре гена *ptxB*, также появились в единичных случаях и в других странах Европы (не опубликованные данные F.R. Mooi)

Наименьшие различия у современных циркулирующих штаммов *B. pertussis*, выделенных от больных коклюшем, отмечены в структуре гена *ptxC*, кодирующего S3 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина (рис. 1). Структура этого гена у штаммов *B. pertussis* соответствовала одному из двух аллелей гена *ptxC* — *ptxC1* или *ptxC2*. Все штаммы *B. pertussis*, выделенные в 1948 — 1979 гг., и три вакцинных штамма характеризовались наличием «вакцинного» *ptxC1* аллеля гена. В 1980 — 1999 гг. удельный вес таких штаммов составил 92,0 %. Вместе с тем, в начале 1980-х годов в циркулирующей популяции стали регистрировать единичные штаммы (8,0 %) с новым «невакцинным» *ptxC2* аллелем. Среди штаммов, выделенных в 2000 — 2005 гг., только 14,0 % штаммов несли старый «вакцинный» *ptxC1* аллель и 86,0 % штаммов характеризовались новым «невакцинным» *ptxC2* аллелем, удельный вес которых в 2006 — 2010 гг. увеличился до 88,3 %. «Невакцинный» *ptxC2* аллель отличается наличием незначимой мутации в положении 681 нуклеотидной последовательности, однако, как показано зарубежными исследованиями [2, 5], штаммы с «невакцинным» *ptxC2* аллелем относятся к определенному PFGE-профилю, обозначенному как BpSR11, и вызвали рост заболева-

емости коклюшем с 1990-х годов прошлого века в Европейском регионе.

Нами не были обнаружены изменения в структуре генов *ptxD* и *ptxE*, кодирующих S4 и S5 субъединицы В-комплекса коклюшного токсина. Все изученные штаммы *B. pertussis*, так же, как и производственные вакцинные штаммы, по структуре этих генов были однородны, т.е. генетической вариабельности не выявлено, что коррелирует с результатами, полученными при изучении штаммов *B. pertussis*, выделенных в различных странах мира [1].

Учитывая многочисленные данные, свидетельствующие о значимости для адаптации патогенных возбудителей, наличия у них регуляторных систем, оказывающих влияние на уровень продукции факторов патогенности, нами изучены особенности структуры промоторной области коклюшного токсина (*ptxP*), которая отвечает за связывание с димером BvgA, являющимся глобальным регулятором экспрессии факторов патогенности у возбудителя коклюша. При секвенировании выявлены штаммы *B. pertussis*, имеющие один из трех аллелей промотора — *ptxP1*, *ptxP2* или *ptxP3* аллели. Среди штаммов *B. pertussis*, выделенных в допрививочный период, 71,4 % штаммов имели «невакцинный» *ptxP2* аллель и 28,6 % штаммов — «вакцинный» *ptxP1* аллель. Два вакцинных штамма характеризовались наличием «вакцинного» *ptxP1* аллеля (рис. 1). Один штамм *B. pertussis*, вошедший в состав АКДС-вакцины через 10 лет после введения массовой иммунизации, имеет «невакцинный» *ptxP2* аллель, отличающийся от «вакцинного» *ptxP1* аллеля значимой мутацией, но расположенной вне области, отвечающей за связывание с BvgA димером. В последующие годы отмечается постепенное увеличение удельного веса штаммов с *ptxP1* аллелем до 41,7 % в 1960 — 1969 гг. и 70,6 % в 1970 — 1979 гг. и уменьшение удельного веса штаммов с *ptxP2* аллелем до 58,3 % в 1960 — 1969 гг. и 29,4 % в 1970 — 1979 гг. В 1980 — 1989 гг. удельный вес штаммов с *ptxP1* аллелем составил 95,0 %, а с *ptxP2* аллелем снизился до 5,0 %. В 1990 — 1999 гг. впервые зарегистрированы в 11,1 % случаев штаммы *B. pertussis*, несущие новый «невакцинный» *ptxP3* аллель, который характеризуется наличием значимой мутации в (–65) положении нуклеотидной последовательности промотора. Такая замена находится в одном из основных сайтов связывания с димером BvgA, который расположен в коровой области в чувствительной зоне промотора. Точность присоединения димера на такой сайт и прочность образуемой связи влияют на экспрессию оперона *ptx* и, следовательно, на уровень продукции коклюшного токсина. Среди штаммов *B. pertussis*, выделенных в последние десять лет, большинство (93,3 %) штаммов характеризуются «невакцинным» *ptxP3* аллелем, 2,7 % штаммов — «невакцинным» *ptxP2* и 4,0 % штаммов — «вакцинным» *ptxP1* аллелями. Следовательно, в современной популяции штаммов *B. pertussis*, вызывающих заболевание коклюшем, доминируют штаммы с

новым «невакцинным» *ptxP3* аллелем промотора. Нами проанализировано влияние обнаруженных мутационных изменений, произошедших в промоторе коклюшного токсина, на вирулентные свойства современных штаммов. Оказалось, что большинство изученных штаммов *B. pertussis*, характеризующихся «невакцинным» *ptxP3* аллелем, имели высокую степень вирулентности, т.е. можно сказать, что мутационные изменения в структуре *ptxP* влияют на высокую продукцию современными штаммами коклюшного токсина. Подтверждением значимости произошедших в *ptxP* мутационных изменений являются исследования, проведенные в Нидерландах с помощью ELISA [2, 6, 10], по сравнительному анализу количества продукции белков пертактина и коклюшного токсина штаммами *B. pertussis* с различными аллельными вариантами промотора. Установлено, что штаммы *B. pertussis*, несущие новый «невакцинный» *ptxP3* аллель, продуцировали значительно больше коклюшного токсина, чем штаммы со старым «вакцинным» *ptxP1* аллелем. Кроме того, клинико-лабораторные сопоставления показали, что штаммы *B. pertussis*, несущие новый «невакцинный» *ptxP3* аллель, были более вирулентными и вызывали более тяжелое клиническое течение заболевания коклюшем.

Для понимания эволюционных процессов, происходящих в популяции возбудителя коклюша, проведен анализ динамики распространения штаммов *B. pertussis* в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции. Установлено, что появление мутационных изменений с формированием новых аллелей генов происходит поступательно, затрагивая как гены детерминант, определяющих основные патоморфологические процессы в клетках, так и гены, кодирующие детерминанты адгезии возбудителя (рис. 2). Так, для штаммов *B. pertussis*, выделенных в допрививочный период, характерным было наличие «вакцинных» *ptxA4/ptxA2*, *ptxB1*, *ptxC1* аллелей генов, кодирующих А- и две (S2 и S3) субъединицы В-комплексов коклюшного токсина, *ptxP1* аллель промотора и *prn1* аллель гена пертактина. С середины 1960-х

годов, т.е. через 10 лет проведения массовой иммунизации, в популяции появились штаммы с новым «невакцинным» *ptxA1* аллелем гена, кодирующим А-комплекс. В последующие годы (1970-е) - удельный вес таких штаммов увеличился до 16,1 %, а начиная с 1980-х годов штаммы, несущие «невакцинный» *ptxA1* аллель гена, стали доминирующими в популяции.

Далее изменения затронули ген *prn*, кодирующий пертактин — главный адгезин возбудителя коклюша, с появлением в 1970-е годы, т.е. через 20 лет проведения массовой иммунизации, штаммов *B. pertussis* сначала с новым «невакцинным» *prn3* аллелем, а затем к концу 1980-х годов с другим «невакцинным» *prn2* аллелем гена, которые в последующие годы заняли доминирующее положение в популяции. В последние годы произошли дальнейшие изменения в структуре этого гена — появились единичные штаммы также с новым «невакцинным» *prn9* аллелем гена, имеющим еще более значимые мутации. Изучение штаммов *B. pertussis*, выделенных в последние пять лет (2006 — 2010 гг.), показало, что новый «невакцинный» *ptxA1* аллель характеризует структуру гена, кодирующего А-комплекс КТ, современных штаммов в 92,1 % случаев; в 96,1 % случаях преобладают штаммы с «невакцинными» *prn2*, *prn3* и *prn9* аллелями гена пертактина; постепенно увеличивается удельный вес (до 88,3 %) штаммов с «невакцинным» *ptxC2* аллелем, кодирующим S3 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина, и новым «невакцинным» *ptxP3* аллелем промотора (93,3 %), а также среди циркулирующих штаммов появились единичные штаммы с «невакцинным» *ptxB2* аллелем, S2 субъединицу В-комплекса коклюшного токсина.

Полученными нами данные коррелируют с исследованиями, проводимыми в более чем 30 странах мира на четырех континентах и показавшими подобные изменения в основных генах патогенности *B. pertussis*. Смена циркулирующих штаммов *B. pertussis* со старыми «вакцинными» аллелями основных генов патогенности, характерными для штаммов, входящих в цельноклеточные вакцины, на штаммы с новыми «невакцинными» аллелями

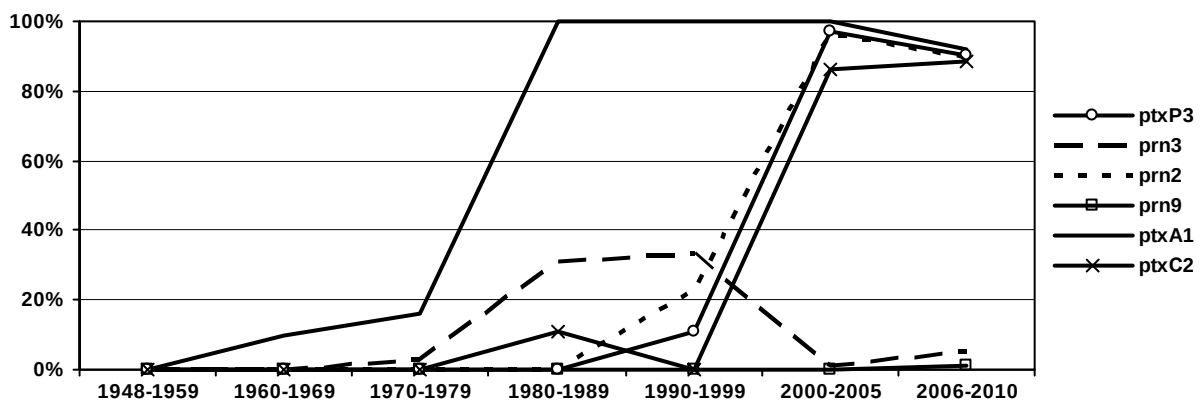


Рис. 2. Динамика появления штаммов *B. pertussis* с новыми «невакцинными» аллелями генов, кодирующих А- (*ptxA*) и В- (*ptxC*) комплексы коклюшного токсина, его промоторную область (*ptxP*) и пертактин (*prn*).

этих генов носит глобальный «общемировой» характер [1–7, 10, 11, 14]. Все это свидетельствует о необратимости эволюционных процессов изменчивости основных детерминант патогенности штаммов *B. pertussis*, что расширяет приспособительные возможности возбудителя коклюша и способствует его адаптации в меняющихся условиях существования, и прежде всего, в условиях длительной массовой иммунизации. Учитывая математическое моделирование, можно говорить о селективном давлении массовой иммунизации населения на эволюцию возбудителя с высокой степенью вирулентности. Происходит клональная экспансия штаммов возбудителя коклюша с новой генетической структурой основных факторов патогенности, которая не соответствует генетической структуре штаммов *B. pertussis*, используемых для производства вакцинных препаратов. Это указывает на необходимость продолжения исследований по выявлению генетических изменений в штаммах возбудителя коклюша с целью установления механизмов формирования популяции в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции и обосновывает замену штаммов при производстве новых перспективных вакцинных препаратов для профилактики коклюша с учетом генотипических свойств штаммов, как дополнительного критерия их отбора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Analysis of *Bordetella pertussis* Populations in European Countries with Different Vaccination Policies / S.C.M. van Amersfoort [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2005. — N 43. — P. 2837–2843.
2. Analysis of Swedish *Bordetella pertussis* isolates with three typing methods: characterization of an epidemic lineage / A. Advani [et al.] // J. of Microbiological Methods. — 2009. — Vol. 78. — P. 297–301.
3. Antigenic divergence between *B. pertussis* clinical isolates from Moscow, Russia, and vaccine strains / O. Borisova [et al.] // J. Clin. and Vaccine Immunology. — 2007. — Vol. 14, N 28. — P. 234–238.
4. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children / P. Mastrantonio [et al.] // Microbiology. — 1999. — Vol. 145. — P. 2069–2075.
5. *B. pertussis* strains circulating in Europe in 1999 to 2004 as determined by pulsed-field gel electrophoresis / H. Hallander [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2007. — Vol. 45, N 10. — P. 3257–3262.
6. *Bordetella pertussis* with increased pertussis toxin production associated with pertussis resurgence / F.R. Mooi [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2009. — Vol. 15. — P. 1206–1213.
7. Comparison of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Isolates circulating in Saint Petersburg between 1998 and 2000 with Russian vaccine strains / N. Kourova [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2003. — N 41. — P. 3706–3711.
8. Human T cell clones define S1 subunit as the most immunogenic moiety of pertussis toxin and determine its epitope map / M.T. de Magistris [et al.] // J. Exp. Med. — 1989. — Vol. 169. — P. 1519–1532.
9. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P. 69) from *Bordetella pertussis* / I.G. Charles [et al.] // Eur. J. Immunology. — 1991. — Vol. 21. — P. 1147–1153.
10. Mooi F.R., *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen // J. Infection, genetics and evolution. — 2009. — P. 1–14.
11. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and *pertussis* toxin virulence factors in the United States, 1935–1999 / P. Cassidy [et al.] // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 182. — P. 1402–1408.
12. Resurgence of pertussis in Europe / L.P. Celen-tano [et al.] // J. Pediatr. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 24 (9). — P. 761–765.
13. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity / A.J. King [et al.] // J. Microbiology. — 2001. — Vol. 147. — P. 2885–2895.
14. Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK / E.R. Packard [et al.] // J. Med Microb. — 2004. — N 53. — P. 355–365.
15. Герасимова А.Г., Петрова М.С., Тихонова Н.Т. Клинико-эпидемиологическая характеристика современного коклюша // Новости вакцинопрофилактики: Вакцинация. — 2004. — Т. 5, № 35. — С. 4–5.
16. Динамика изменчивости основных генов патогенности штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных от больных коклюшем в г. Москве (1948–2005 гг.) / И.К. Мазурова [и др.] // Журнал молекулярной медицины. — 2008. — № 1. — С. 40–45.
17. Лыткина И.Н., Чистякова Г.Г., Филатов Н.Н. Заболеваемость коклюшем в Москве и организация мероприятий по ее снижению // Новости вакцинопрофилактики: Вакцинация. — 2004. — Т. 5, № 35. — С. 8–9.
18. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bordetella pertussis*, выделенных в различные периоды эпидемического процесса коклюшной инфекции / И.К. Мазурова [и др.] // Ж. молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2005. — № 4. — С. 21–25.
19. Особенности коклюшной инфекции в различные периоды эпидемического процесса в г. Москве / О.Ю. Борисова [и др.] // Журнал эпидемиологии и вакцинопрофилактика. — 2010. — № 4. — С. 33–39.
20. Особенности эпидемиологии и клиники коклюша в период эпидемического неблагополучия / М.С. Петрова [и др.] // Проблемы инфекционных болезней : сб. научн. тр. — 2000. — Ч. 1. — С. 80–86.
21. Особенности эпидемического процесса коклюшной инфекции в Москве на современном этапе / Г.Г. Чистякова [и др.] // ЖМЭИ. — 2005. — № 5. — С. 35–40.

22. Семенов Б.Ф., Захарова Н.С., Мазурова И.К. Подъем заболеваемости коклюшем на фоне массовой вакцинации. Гипотезы, объясняющие этот феномен // ЖМЭИ. — 2003. — № 6. — С. 70 — 73.

23. Сигаева Л.А., Кузнецова Л.С., Окиншевич Е.А. Заболеваемость коклюшем и состояние привитости // Ж. микробиологии. — 1986. — № 3. — С. 43 — 47.

Сведения об авторах

Алешкин Владимир Андрианович – доктор биологических наук, профессор, директор Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10)

Борисова Ольга Юрьевна – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; тел. 8 (495) 4592146, 8(916)1471960; e-mail: olgborisova@mail.ru,

Гадуа Натия Торникеевна – младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10)

Мазурова Изабелла Константиновна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией диагностики дифтерийной инфекции Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10)

Е.В. Анганова^{1,2}, Е.Д. Савилов^{1,2}, Н.Н. Чемезова², А.В. Духанина²

ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА РЕКИ ЛЕНЫ ПО СТЕПЕНИ ДОМИНИРОВАНИЯ И ВИДОВОМУ РАЗНООБРАЗИЮ

¹Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)

²Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

В статье показаны результаты изучения условно-патогенных микроорганизмов реки Лены. Установлено, что микробное сообщество водоема представлено бактериями различных семейств, среди которых абсолютно доминировали представители Enterobacteriaceae. Энтеробактерии разных видов относились к четырем классам доминирования. В многолетнем аспекте колебания частоты их встречаемости не выходили за пределы класса. В то же время выявлены изменения их популяций на уровне разнообразия.

Ключевые слова: водные объекты, условно-патогенные энтеробактерии, доминирование, разнообразие

CHARACTERISTICS OF OPPORTUNISTIC BACTERIA OF MICROBIAL COMMUNITIES OF THE LENA RIVER ON THE DEGREE OF DOMINANCE AND DIVERSITY

E.V. Anganova^{1,2}, E.D. Savilov^{1,2}, N.N. Chemezova², A.V. Duhkanina²

¹Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

²Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

The results of the study of opportunistic bacteria of the Lena river are show in the article. The microbial community of the river is represented by bacteria of different families. Opportunistic Enterobacteriaceae is absolutely dominated. Enterobacteria of different type belonged to four classes of dominance. The fluctuations in the frequency of their occurrence did not extend beyond the class for the period of observation. At the same time the changes in their populations at the level of diversity are identified.

Key words: water objects, opportunistic Enterobacteriaceae, domination, diversity

АКТУАЛЬНОСТЬ

Условно-патогенные энтеробактерии широко распространены в окружающей среде, характеризуются вариабельностью биологических свойств, возможностью формирования эпидемических вариантов возбудителей [2]. Особое значение имеет изучение циркуляции бактерий данной группы в водных объектах, оказывающих существенное влияние на жизнедеятельность человеческой популяции [6].

Цель работы — изучение распространенности, степени доминирования условно-патогенных энтеробактерий, разнообразие, значимости в трансформации природных микробных сообществ на примере реки Лены.

МЕТОДИКА

В период с 1999 по 2008 гг. были проведены экспедиционные исследования по изучению микробиоценоза водоема. С этой целью была отобрана 151 проба воды в 57 точках в створах 33 населенных пунктов. Отбор проб воды проводили через каждые 100 км. Всего выделено более 6500 штаммов микроорганизмов. Отбор проб воды, фильтрацию через мембранные фильтры, выделение культур микроорганизмов, их идентификацию проводили по общепринятым методикам [3–5]. Биохимические свойства микроорганизмов определяли с помощью коммерческих тест-систем «Enterotest» фирмы Lachema (Чехия). Для выборочной иден-

тификации использовали баканализатор Sceptor (Becton Dickinson, USA). Для количественной оценки степени доминирования микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам, использовали шкалу Е.Л. Любарского [1], для определения разнообразия — индекс видового разнообразия Margalef (d) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований установлено, что грамтрицательная составляющая микробного сообщества реки Лены была представлена бактериями семейств Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae, Aeromonadoceae, Alcaligenaceae. Согласно количественной оценке степени доминирования микроорганизмов, принадлежащих к различным семействам, по шкале Е.Л. Любарского (по доле таксономической группы микроорганизмов в общей численности) было выделено пять классов доминирования: абсолютные доминанты, доминанты, субдоминанты, второстепенный и редкий классы. Абсолютными доминантами (5 баллов) оказались бактерии семейства Enterobacteriaceae, составившие около 80 %, что свидетельствует об их широком распространении в микробных популяциях водных экосистем. Второстепенными по степени доминирования (2 балла) оказались представители семейства Aeromonadoceae (почти каждый десятый выделенный штамм относился к данному семейству). Ука-

занное семейство было представлено бактериями рода *Aeromonas* (типовой вид *A. hydrophila*). Также к второстепенному классу доминирования были отнесены представители семейства *Alcaligenaceae* (около 8 %). Бактерии семейств *Pseudomonadaceae* и *Moraxellaceae* вошли в редкий класс доминирования (1 балл). Среди псевдомонад были идентифицированы бактерии нескольких видов — *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. diminuta*. Семейство *Moraxellaceae* представлено микроорганизмами одного рода — неферментирующими оксидазотрицательными штаммами *Acinetobacter*.

Наиболее широким оказался спектр микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*. Учитывая, что представители данного семейства составляли значимо большую часть ($p < 0,05$) микробного сообщества реки Лены, а также отличались наиболее широким спектром, проведена оценка степени их доминирования.

Результаты проведенных исследований показали, что среди представителей *Enterobacteriaceae* были идентифицированы энтеробактерии, относящиеся к 7 родам данного семейства: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*. Бактерии данного семейства, являясь абсолютными доминантами при анализе степени доминирования по принадлежности микроорганизмов к такой таксономической группе, как семейство, при учете по родовой принадлежности были отнесены к четырем классам: доминанты, субдоминанты, второстепенный и редкий классы. При этом среди энтеробактерий разных родов к классу доминант (4 балла) принадлежали только штаммы рода *Escherichia* (вид *E. coli*), составившие около половины всех штаммов данного семейства (табл. 1).

Субдоминантами (3 балла) оказались бактерии рода *Enterobacter*, составившие пятую часть от всех выделенных штаммов энтеробактерий. Микроорганизмы данного рода были представлены бактериями трех видов: *E. cloacae*, *E. aerogenes* и *E. gergoviae*. Наиболее частой среди энтеробактеров была встречаемость штаммов *E. cloacae* (11,9 %). На долю *E. aerogenes* и *E. gergoviae* пришлось 5,6 % и 2,1 % соответственно. Также в класс субдоминант вошли представители рода *Klebsiella* (около 14 %), среди них преобладали штаммы *K. ozaenae*. Энтеробактерии рода *Pantoea* (вид

P. agglomerans) вошли во второстепенный класс доминирования (2 балла).

Как видно из таблицы 1, микроорганизмы других родов по степени доминирования относились к редкому классу (1 балл). В частности, редкой оказалась частота встречаемости бактерий родов *Proteus*, *Morganella* и *Citrobacter*. При этом цитробактеры и морганеллы были представлены штаммами одного вида (*C. freundii* и *M. morganii*), а протеи — двух видов (*P. mirabilis* и *P. vulgaris*).

Следует отметить, что за период наблюдения не отмечалось смены таксономического спектра УПЭ микробиоценозов изучаемых водоемов, и колебания частоты встречаемости отдельных представителей семейства *Enterobacteriaceae* находились в пределах класса. В то же время выявлены изменения их популяций на уровне разнообразия.

Проведено сравнение видового разнообразия микроорганизмов, выделенных на всей протяженности реки Лены и в районе г. Якутска. Территории, прилегающие к реке Лене в районе города Якутска и соседних с ним районов, являются наиболее обжитыми и, следовательно, испытывают наиболее выраженное антропогенное и техногенное воздействие. Результаты изучения спектра грамотрицательных условно-патогенных бактерий в микробных сообществах на всей ее протяженности в сравнении с участком реки в районе г. Якутска с прилегающими территориями, показал, что в районе г. Якутска и пригородов индекс видового разнообразия бактерий микробиоценоза реки составил 5,86; а на всей протяженности водоема — 4,47. При этом наиболее демонстративно различия микробных сообществ различных участков реки показывают индексы видового разнообразия условно-патогенных энтеробактерий по сравнению с бактериями других семейств.

Таким образом, показатели индекса видового разнообразия характеризуют изменение содержания грамотрицательных УПЭ в микробных сообществах водных экосистем и отражают направленность их трансформации.

Информативной характеристикой микробиоценозов водных экосистем является также и их ранговое распределение по параметрам «доминирования — разнообразия» условно-патогенных представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Таблица 1
Шкала доминирования бактерий семейства *Enterobacteriaceae* микробного сообщества реки Лены

Балл	Класс доминирования	Границы классов по доле рода	Родовая принадлежность микроорганизма
5	Абсолютный доминант	$64 < N < 100$	«-»
4	Доминант	$36 < N < 64$	<i>Escherichia</i>
3	Субдоминант	$14 < N < 36$	<i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>
2	Второстепенный	$6 < N < 14$	<i>Pantoea</i>
1	Редкий	$0 < N < 6$	<i>Proteus</i> <i>Citrobacter</i> <i>Morganella</i>

Примечание: «-» — отсутствие; N — доля группы микроорганизмов в общей численности (%).

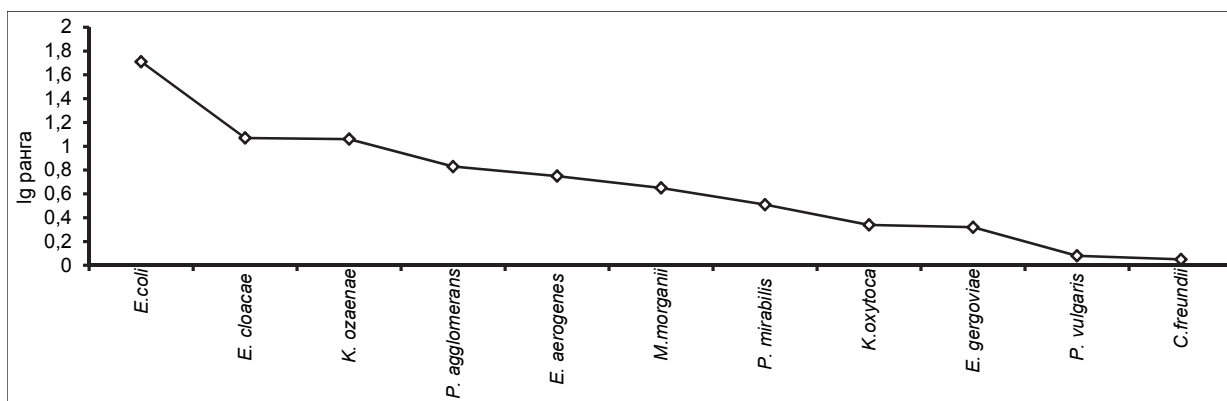


Рис. 1. Ранговое распределение «доминирования – разнообразия» условно-патогенных энтеробактерий микробиоценозов реки Лены.

Так, установлено, что для микробиоценоза реки Лены (по сравнению, например, с рекой Ангарой) характерна менее «уплотненная» кривая (меньшее разнообразие энтеробактерий при данном числе видов) (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования позволили оценить качественный и количественный состав микробиоценоза реки Лены. Установлено, что граммотрицательная составляющая микробного сообщества р. Лены была представлена бактериями нескольких семейств, среди которых абсолютными доминантами являлись бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (около 80 %). По степени доминирования основными представителями условно-патогенных энтеробактерий оказались бактерии родов *E. coli* (класс доминант), *Enterobacter* и *Klebsiella* (класс субдоминант), *Pantoea* (второстепенный класс), *Proteus*, *Citrobacter* и *Morganella* (редкий класс). Колебания частоты встречаемости отдельных представителей семейства *Enterobacteriaceae* в многолетнем аспекте не выходили за пределы класса. Для расширения возможностей, повышения информативности биотестирования циркуляции УПЭ в водных экосистемах целесообразен комплексный подход, отражающий оценку структуры микробиоценоза водных экосистем (доля условно-патогенных микроорганизмов), таксономическую характеристику условно-патогенной составляющей микробиоценоза, структурированность сте-

пени доминирования различных представителей УПЭ и их оценку с использованием различных дополнительных показателей (видовое разнообразие, ранговое распределение «доминирования – разнообразия» и др.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баканов А.И. Количественная оценка доминирования в экологических сообществах // ИБВВ АН СССР. — 1987. — 63 с. Деп. в ВИНТИ. 08.12.1987, № 8593-B87.
2. Бухарин О.В., Литвин В.Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. — Екатеринбург: УрО РАН. — 1997. — 277 с.
3. Марри П.Р., И.Р. Шей. Клиническая микробиология. Краткое руководство. — Пер. с англ. — М.: Мир, 2006. — 425 с.
4. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. акад. РАМН В.И. Покровского. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — 768 с.
5. Приказ МЗ СССР «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» № 535 от 22.04.85
6. Савилов Е.Д., Анганова Е.В. Микробиологический мониторинг водных экосистем // Гигиена и санитария. — 2010. — № 5. — С. 56–58.
7. Margalef R. Information theory in ecology // Trans. Soc. Gen. Syst. Res. 1958. — Vol. 3. — P. 36–71.

Сведения об авторах

Анганова Елена Витальевна — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии ГБОУ ДПО ИГМАПО, с.н.с. ФГБУ НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

Савилов Евгений Дмитриевич — д.м.н., профессор, проректор по научной и лечебной работе ГБОУ ДПО ИГМАПО, в.н.с. ФГБУ НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

Чемезова Наталья Николаевна — к.м.н., н.с. ФГБУ НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

Духанина Алла Владимировна — к.б.н., с.н.с. ФГБУ НЦ ПЗСРЧ СО РАМН

Н.М. Андреевская, В.А. Михайлова, Э.С. Каретникова, А.Г. Атлас, Л.М. Михайлов,
А.И. Калиновский, Н.Г. Гефан, Н.Л. Баранникова

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПЫТАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ СЕРИЙ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ СЫВОРОТКИ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
(Иркутск)

В настоящее время коммерческая поливалентная бруцеллезная сыворотка на территории России не выпускается. Нами разработана технология производства поливалентной бруцеллезной высокоактивной и специфичной сыворотки, не требующей адсорбции. Экспериментально-производственные серии соответствуют требованиям проекта технических условий.

Ключевые слова: поливалентная бруцеллезная сыворотка, специфическая активность и специфичность сыворотки, тест-культуры

EXAMINATION AND TESTING OF EXPERIMENTAL-PRODUCTION SERIES OF POLYVALENT BRUCELLOSIS SERUM

N.M. Andreevskaya, V.A. Mikhailova, E.S. Karetnikova, A.G. Atlas, L.M. Mikhailov,
A.I. Kalinovsky, N.G. Gefan, N.L. Barannikova

Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

At present no commercial polyvalent brucellosis serum is produced in Russia. We developed a technology of polyvalent brucellosis high-effective and specific serum production without adsorption. Experimental-production series are obeyed the technical specification project.

Key words: polyvalent brucellosis serum, specific activity, serum specificity, test-culture

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез — острое инфекционное заболевание человека и животных, при развитии которого формируется общий генерализованный процесс, протекающий в острой форме с высокой вероятностью перехода в хроническую. Из-за несвоевременной лабораторной диагностики бруцеллез регистрируется под другим диагнозом. В связи с этим важное значение имеют данные лабораторных исследований на бруцеллез [1].

Лабораторная диагностика бруцеллеза предусматривает индикацию возбудителя в объектах окружающей среды и патологическом материале, выделение чистой культуры, ее идентификацию и дифференциацию [3]. В этих исследованиях используют диагностические поливалентную и моноспецифические бруцеллезные сыворотки. В настоящее время для диагностики бруцеллеза применяют только экспериментальные серии сывороток, не прошедшие Государственную регистрацию. Поэтому исследования по получению диагностической поливалентной бруцеллезной сыворотки, разработка методов лабораторного контроля ее качества и испытания эффективности актуальны.

Цель работы — изучение и испытание активности и специфичности экспериментально-производственных серий поливалентной бруцеллезной сыворотки, подбор тест-культур для определения качества препарата при выпуске.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве животных-продуцентов диагностической поливалентной бруцеллезной сыворотки

использовали кроликов породы шиншилла весом 2,5 — 3 кг. Для иммунизации животных применяли корпускулярный антиген из вакцинного штамма *Brucella abortus* 19 ВА, выращенного на эритроцит агаре в течение 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, и инактивированного 2,5 % раствором формалина или прогреванием при температуре $(90 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 20 минут.

В работе использовали разработанную нами оптимальную схему иммунизации животных для получения высокоактивной поливалентной бруцеллезной сыворотки с применением полного адьюванта Фрейнда [5].

Активность и специфичность поливалентной бруцеллезной сыворотки определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА) и реакции агглютинации на стекле в соответствии с МУК 3.1.7.1189-03 [3]. Для определения активности препаратов при их выпуске использовали тест-культуры вирулентных и авирулентных видов бруцелл в S-форме: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. rangiferi*, *B. canis*, а специфичности: *B. ovis* (R-форма), *B. abortus* (L-форма), *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia enterocolitica* 03 628/1.

Физико-химические свойства сыворотки проверяли по МУК 4.1/4.2.588-96 [2].

Для изучения стабильности сывороток применяли изотермический тест на ускоренное разрушение антител [6].

Статистическую обработку результатов проводили по В. Монцевичюте-Эрингене [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке технологии производства сыворотки приготовлено 18 лабораторных серий и 3 экспериментально-производственные серии, необходимые для проведения медицинских и технических испытаний с целью Государственной регистрации препарата в Росздравнадзоре. Изучена возможность повышения стабильности препарата и улучшения его растворимости путем использования в качестве стабилизаторов сорбита в конечной концентрации 2,5 %, сахарозы — 3 %, натрия тиосульфата — 1 %, поливинилпирролидона — 1 %, а также смесь сахарозы и натрия тиосульфата в различных соотношениях. Стабилизаторы вносили в сыворотку до стерилизующей фильтрации, после чего ее разливали в ампулы и лиофилизировали.

Установлено, что в тесте ускоренного разрушения антител все испытанные вещества обладали стабилизирующим действием при хранении в условиях повышенных температур, хотя степень его выраженности значительно варьирует. Наиболее заметный стабилизирующий эффект наблюдался при внесении в сыворотку смеси сахарозы (3 %) и натрия тиосульфата (1 %), при этом значительно улучшалась растворимость сыворотки.

Используя результаты изотермического теста, мы выбрали экспоненциальную регрессию и определили в готовом препарате срок годности, путем хранения сывороток при температуре 70 °С в течение 30 суток [6]. Показатели стабильности сыворотки представлены в таблице 1.

В таблице 1 показано, что все серии кроличьей бруцеллезной сыворотки проявили исключительную стабильность в течение 30 суток, титр

антител оставался на уровне исходного. По экспоненциальной регрессии определили, что срок годности сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой 5 и более лет. Титр специфических антител у экспериментальных бруцеллезных сывороток в РА на стекле составлял не менее 1 : 25, в пробирочной РА колебался от 1 : 800 до 1 : 3200.

При контроле качества вышеуказанных серий изучали физико-химические свойства и определяли набор тест-культур для определения активности и специфичности. Данные физико-химических показателей по проекту ТУ и результаты наших испытаний представлены в таблице 2.

В результате исследований установлено, что по физико-химическим показателям изученные серии сыворотки соответствуют требованиям, заложенным в проекте ТУ на сыворотку диагностическую поливалентную бруцеллезную сухую для РА.

При определении специфической активности и специфичности сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой выявлено, что титры антител сыворотки с вирулентными и авирулентными штаммами бруцелл не отличаются. Поэтому в производстве бруцеллезной сыворотки считаем возможным использовать биологически безопасные авирулентные штаммы. Сыворотки, получаемые от кроликов, иммунизированных антигеном из вакцинного штамма, высокоспецифичны и не нуждаются в адсорбции групповых антител.

За период с 2005 по 2010 гг. изучено 185 культур подозрительных на бруцеллез, изолированных от больных людей и животных (северные

Таблица 1
Термостабильность сыворотки диагностической поливалентной бруцеллезной сухой в тесте ускоренного разрушения антител при температуре 70 °С

№ п/п	№ серии	Исходный титр	Обратные значения средне-арифметических титров антител в РА через интервалы времени в сутках						Титры сыворотки при температуре хранения 8 °С в течение 30 суток (контроль)
			5	10	15	20	25	30	
1	33	1 : 3200	3800 ± 980	3600 ± 720	3200 ± 811	3255 ± 700	3782 ± 603	3636 ± 724	1 : 3200
2	36	1 : 800	1600 ± 651	1705 ± 327	1435 ± 200	1411 ± 327	1512 ± 655	1408 ± 524	1 : 800
3	39	1 : 3200	3650 ± 620	3555 ± 534	3300 ± 811	3712 ± 500	3560 ± 288	3380 ± 381	1 : 3200

Таблица 2
Физико-химические показатели бруцеллезной сыворотки

№ п/п	Наименование показателя	Характеристика показателей по проекту ТУ	Результаты испытаний серий 33, 36, 39
1	Внешний вид	Аморфная масса белого цвета с розоватым или желтоватым оттенком	Аморфная масса белого цвета с розоватым или желтоватым оттенком
2	Растворимость	В течение 3 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения – прозрачная или слегка опалесцирующая жидкость от светловато-кремового до розовато-желтого цвета	В течение 1 мин в 1 мл стерильной дистиллированной воды. После растворения – слегка опалесцирующая жидкость от светловато-кремового до розовато-желтого цвета
3	pH	7,5–8,5	с. 33 – 8,1, с. 36 – 7,76, с. 39 – 8,1
4	Герметизация	Ампулы с препаратом должны быть герметичны	Ампулы с препаратом герметичны
5	Потеря в массе при высушивании	Не более 2 %	с. 33 – 1,8 %, с. 36 – 1,7 %, с. 39 – 1,9 %
6	Микробиологическая чистота	Допускается рост не более 20 любых колоний на одной чашке Петри	Сыворотки стерильны

олени, крупный рогатый скот, собаки). Среди них идентифицировано 58 бруцеллезных штаммов, выделенных от животных в S-форме, с использованием поливалентной бруцеллезной сыворотки и таксономических тестов, рекомендованных ФАО/ВОЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенного констатируем, что сыворотка поливалентная бруцеллезная сухая производства Иркутского научно-исследовательского противочумного института может успешно применяться для идентификации штаммов бруцелл в санитарной, клинической и ветеринарной микробиологии, при эпизоотолого-эпидемиологическом мониторинге бруцеллеза.

Сыворотка прошла медицинские и технические испытания в Волгоградском и Ставропольском научно-исследовательских противочумных институтах, ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава», ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора, дана положительная оценка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Желудков М.М. Бруцеллез в России: Современная эпидемиология и лабораторная диа-

гностика : автореф. дисс. ... док. мед. наук. — М., 2009. — 50 с.

2. Методические указания «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». МУК 4.1/4.2.588-96. — М., 1996. — 127 с.

3. Методические указания «Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза». МУ 3.1.7. 1189-03. — М., 2003. — 38 с.

4. Монцевичюте-Эрингене В. Статистическая обработка результатов // Патология, физиология и экспериментальная терапия. — 1965. — № 4. — С. 71 — 78.

5. Получение бруцеллезных поливалентной и монорецепторных сывороток / Н.М. Андреевская [и др.] // Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных заболеваний. Биотехнология : матер. Всероссийской научной конф. — Киров, 2008. — С. 284 — 288.

6. Thermal stability of freeze-dried mammalian interferons: analysis of freeze-drying conditions and accelerated storage test for murine interferon / P. Jameson [et al.] // J. Criobiology. — 1979. — N 16. — P. 301 — 314.

Сведения об авторах

Андреевская Нина Михайловна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78; тел. 22-01-38)

Михайлова Вера Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Каретникова Эльвира Семеновна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Атлас Александр Гилельевич — заведующий научно-производственным отделом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Михайлов Леонид Михайлович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Калиновский Александр Иннокентьевич — доктор медицинских наук, заведующий отделом зоонозных инфекций ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Гефан Наталья Геннадьевна — кандидат медицинских наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Баранникова Наталья Леонидовна — врач бактериолог ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, улица Трилиссера, 78)

Л.П. Базанова, А.Я. Никитин

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ У ЧУМНОГО МИКРОБА В ОРГАНИЗМЕ БЛОХИ *CITELLOPHILUS TESQUORUM ALTAICUS*

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
(Иркутск)

Для выявления особенностей формирования биопленки (конгломератов, «глыбок») у чумного микроба в организме основного переносчика в Тувинском природном очаге чумы — блохи *Citellophilus tesquorum altaicus* — проанализированы данные экспериментальных исследований, проведенных с типичными для очага вирулентными штаммами *Yersinia pestis* subsp. *pestis*. Установлено, что биопленка (бактериальные «глыбки») играет важную роль не только в обеспечении трансмиссии чумы с помощью блох, но и в сохранении возбудителя этими насекомыми. Результаты анализа указывают на преобладающее значение самок *C. tesquorum altaicus* в сохранении чумного микроба и раскрывают некоторые механизмы его переживания в организме блох в холодное время года в Тувинском природном очаге. Микроб в виде биопленок («глыбок») при неоптимальных условиях в осенний период накапливается преимущественно в желудочно-кишечном тракте самок основного переносчика и в таком виде может длительное время сохраняться в блохах.

Ключевые слова: биопленка, возбудитель чумы, блоха

FEATURES OF *YERSINIA PESTIS* BIOFILM FORMATION IN *CITELLOPHILUS TESQUORUM ALTAICUS* FLEA

L.P. Bazanova, A.Ya. Nikitin

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Data of the experimental investigation using typical for the focus virulent *Yersinia pestis* subsp. *pestis* strains were analyzed to detect special features of a plague microbe biofilm formation (conglomerates, «blocks») in the main plague carrier, *Citellophilus tesquorum altaicus* fleas, in Tuva natural focus. It was established that biofilm (bacterial «blocks») played the important role both in plague transmission by fleas and also in the agent preservation by these insects. Results of the analysis indicated the prevailing significance of *C. tesquorum altaicus* females in plague agent preservation and explained some mechanisms of its survival in fleas during a cold season in Tuva natural plague focus. Under adverse conditions during the autumn period *Y. pestis* biofilms («blocks») accumulate mainly in a digestive tract of the main carrier females and so can survive in fleas for a long time.

Key words: biofilm, plague agent, flea

Согласно современным представлениям, бактерии способны существовать как в виде свободноживущих планктонных клеток, так и в виде биопленок [6]. Считают, что становление способности к образованию биопленки в блохах произошло уже на ранних этапах эволюции вида *Yersinia pestis* и обеспечило развитие трансмиссивного механизма передачи чумного микроба. Биопленка имеет значение не только для обеспечения трансмиссии с помощью блох, но и для сохранения *Yersinia pestis* во внешней среде вне организма теплокровного хозяина [3]. Исследование процесса формирования биопленки и образования блока в преджелудке блохи представляет собой сложную задачу. При этом в экспериментальных исследованиях при просмотре инфицированных блох с помощью световой микроскопии после подкормки на животном в желудке и преджелудке насекомого на фоне алой крови отмечают четко очерченные конгломераты («глыбки» или «микроколонии») представляющие собой скопление бактериальных клеток, покрытое общей внеклеточной оболочкой — биопленкой [4]. Однако исследователи, отмечая «глыбки» микроба в желудках зараженных чумой блох, не анализировали при этом частоту и динамику их формирования.

Для выявления особенностей формирования биопленки (конгломератов, «глыбок») в организме блохи и ее роли в обеспечении трансмиссии и сохранения возбудителя чумы проанализированы данные многолетних экспериментальных исследований с основным переносчиком в Тувинском природном очаге — *Citellophilus tesquorum altaicus*. В опытах использованы насекомые лабораторной популяции, начало которым положили имаго, добытые непосредственно в природном очаге, а в качестве прокормителя — основной хозяин данной блохи — длиннохвостый суслик. Инфицировали блох и зверьков типичными для очага вирулентными штаммами *Yersinia pestis* subsp. *pestis*.

Установлено, что у *C. tesquorum altaicus* наблюдается выраженная сезонная динамика частоты и сроков блокообразования, инфекциозности укусов «блокированных» особей, частоты передачи инфекции блохами и генерализации инфекционного процесса у заболевших носителей. Максимальные значения этих показателей в экспериментах, проведенных на сусликах, совпадают по времени с пиком активизации эпизоотического процесса в природном очаге [1].

Рассмотрим динамику выявления особей с «глыбками» чумного микроба среди экспериментально зараженных блох в разные сезоны года (осень — весна — лето). Осенью среди блох, инфицированных 14 сентября, доля особей с конгломератами микроба возросла к концу эксперимента (3–4 октября) почти до 70 % (рис. 1а). В этот период имаго блох заканчивают физиологическую перестройку для переживания зимнего периода в состоянии оцепенения, что, видимо, приводит к изменению взаимодействия микроба с организмом переносчика, возрастанию его способности к агрегированию и сохранению в таком состоянии в *C. tesquorum altaicus* зимой. Это предположение подтверждают данные опытов с инфицированными осенью и перезимовавшими в состоянии оцепенения блохами весной следующего года (рис. 1б). Зараженность «перезимовавших» блох весной составила 64,3 %. Три первые подкормки после выхода блох из диапаузы, приходились на 228, 232 и 235 сутки от заражения насекомых. Осенью за три последние подкормки выявлено $45,8 \pm 1,17$ % особей с «глыбками» микроба, весной за три первых подкормки «перезимовавших» насекомых — $49,1 \pm 15,39$. Очевидны различия в доле блох, у которых наблюдались конгломераты возбудителя за три первые подкормки осенью (0) и весной ($45,8 \pm 1,17$ %). По своим начальным результатам весенний опыт с «перезимовавшими» блохами (рис. 1б) ближе к данным, полученным в конце осеннего эксперимента (рис. 1а). Этот факт позволяет предположить, что именно в агрегированном состоянии возбудитель чумы находится в блохах весь неблагоприятный зимний период. Представляет интерес, что достоверных различий в доле особей с «глыбками», регистрируемых среди

инфицированных блох летом (в среднем за одну подкормку $15,2 \pm 4,25$ %) и осенью ($13,4 \pm 3,06$ %) не выявлено. При этом блокообразование отмечали у $1,7 \pm 0,53$ % особей за одну подкормку в летнем опыте и у $0,4 \pm 0,13$ % — в осеннем. Различия по данному показателю достоверны ($t = 2,34$; $p < 0,05$). Сезонные различия в частоте формирования «блоков» могут отражать изменения во взаимоотношениях возбудителя чумы с переносчиком в тот или иной период. Так, в осенний период для чумного микроба «более выгодна» адаптация к организму блохи для сохранения, чем образование «блока» и дальнейшая трансмиссия [1].

Выявлены особенности переживания возбудителя чумы в организме самок и самцов *C. tesquorum altaicus* в период зимней диапаузы. В эксперименте показано, что самки *C. tesquorum altaicus*, по сравнению с самцами, более приспособлены к выживанию в условиях низкой температуры и принудительного голодания [2]. По результатам опытов чумной микроб переживает холодный период года в имаго *C. tesquorum altaicus* в агрегированном состоянии («глыбках»), при этом чаще в самках, чем в самцах (рис. 2). Данный факт установлен как весной, так и летом следующего после заражения насекомых года. Половые различия у блох в сохранении возбудителя достоверны (весной $t = 2,9$; $p < 0,01$, летом $t = 2,5$; $p < 0,05$). Аналогично результатам весенних наблюдений, максимальное число особей с возбудителем в агрегированном состоянии среди перезимовавших блох летом отмечено во время первых трех подкормок, затем число таких особей у обоих полов снижается [1–2].

Таким образом, биопленка (бактериальные «глыбки») играет важную роль не только в обеспечении трансмиссии чумы с помощью блох, но и

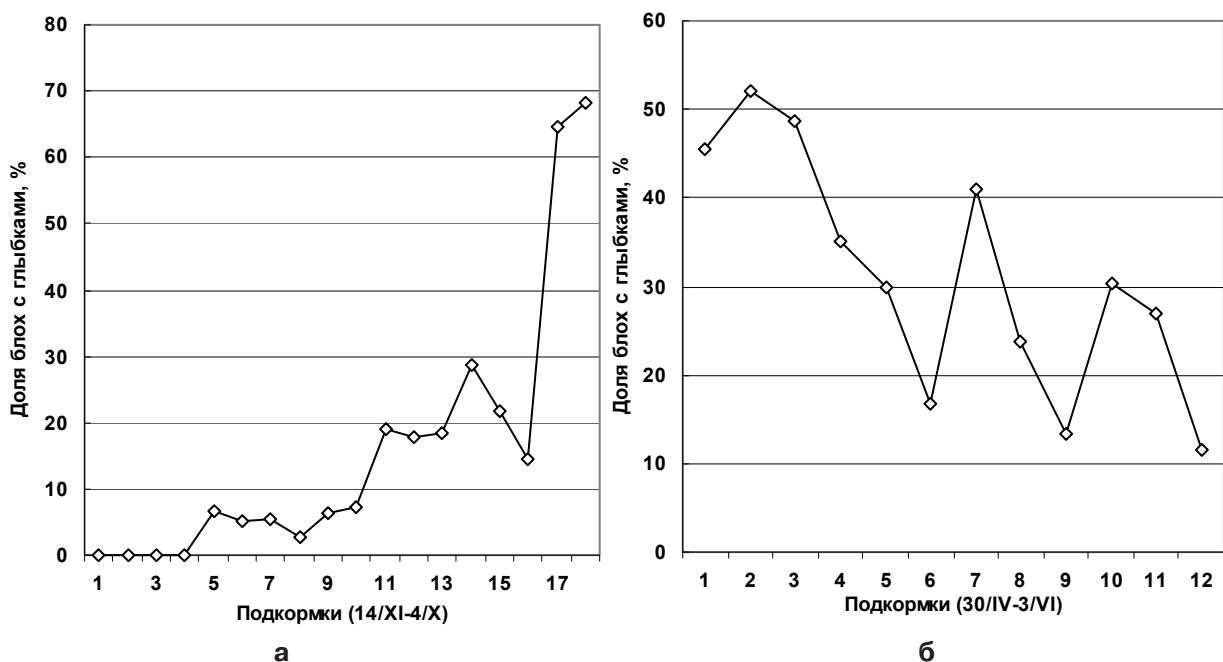


Рис. 1. Выявление «глыбок» чумного микроба у *C. tesquorum altaicus*: а – блох выплода текущего года осенью; б – перезимовавших блох весной следующего года.

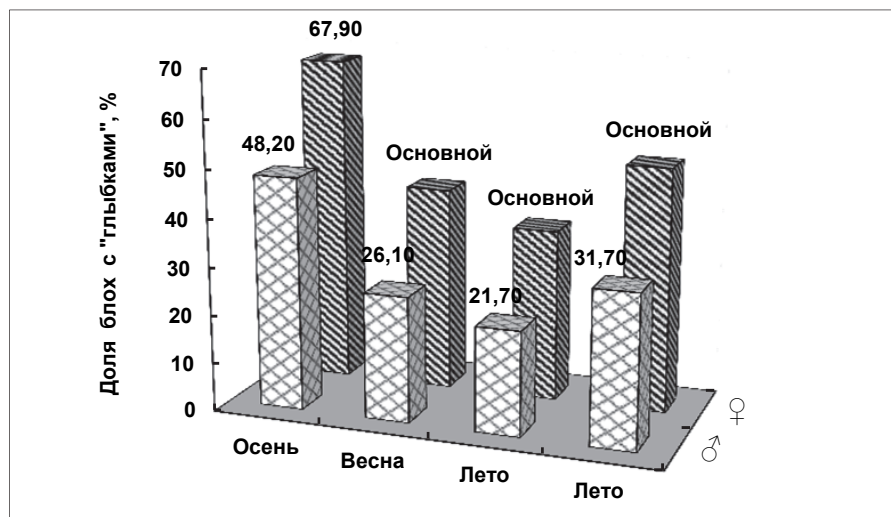


Рис. 2. Накопление у самок и самцов *C. tesquorum altaicus* бактериальных «глыбок» осенью и сохранение их до весны и лета следующего года.

в сохранении возбудителя этими насекомыми. Результаты проведенного анализа указывают на преобладающее значение самок *C. tesquorum altaicus* в сохранении чумного микроба и раскрывают некоторые механизмы его переживания в организме блох в холодное время года в Тувинском природном очаге чумы. Микроб в виде биопленок («глыбок») при неоптимальных условиях в осенний период накапливается преимущественно в желудочно-кишечном тракте самок основного переносчика. В период зимовки имаго в их организме продолжается процесс появления измененных клеток возбудителя [5] и агрегирования отдельных клеток в конгломераты. В таком состоянии чумной микроб может длительное время сохраняться в блохах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Маевский М.П. Сезонные особенности динамики агрегированного состояния возбудителя чумы в организме

Citellophilus tesquorum altaicus (Siphonaptera) // Мед. паразитол. — 2004. — № 2. — С. 3–6.

2. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Маевский М.П. Сохранение возбудителя чумы в зимний период самками и самцами *Citellophilus tesquorum altaicus* // Мед. паразитол. — 2007. — № 4. — С. 34–36.

3. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний / Л.М. Куклева [и др.] // Пробл. особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 110. — С. 5–11.

4. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. — М.: Медицина, 2007. — 224 с.

5. Изменчивость *Yersinia pestis* в организме блохи / М.П. Маевский [и др.] // Журн. микробиол. — 1994. — № 3. — С. 16–21.

6. Costerton J., Stewart P., Greenberg E. Bacterial biofilms: a common case of persistent infections // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318–1322.

Сведения об авторах

Базанова Любовь Петровна — д.б.н., старший научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Никитин Алексей Яковлевич — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (664047, г. Иркутск, Трилиссера, 78; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Д.Д. Бархутова ¹, Б.В. Дармаева ², Б.Б. Намсараев ¹

САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ХОЛОДНЫХ АРШАНОВ И ГОРЯЧИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПРИБАЙКАЛЬЯ

¹ ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)² ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия (Улан-Удэ)

Изучение распространения и численности индикаторных микроорганизмов позволило дать оценку качества воды источников по микробиологическим показателям. Общие колиформные бактерии были обнаружены в воде и донных осадках горячих и холодных источников. Выделены условно-патогенные микроорганизмы *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus* (биогруппа 2), *Citrobacter freundii*.

Ключевые слова: холодные и горячие источники, индикаторные микроорганизмы

SANITARY AND MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT OF COLD AND HOT MINERAL SPRINGS OF PRIBAIKALYE

D.D. Barkhutova ¹, B.V. Darmayeva ², B.B. Namsarayev ¹¹ Institute of General and Experimental Biology, Ulan-Ude² Center of Hygiene and Epidemiology, Ulan-Ude

Studying of distribution and number of indicator microorganisms has allowed to estimate springs water quality by microbiological indicators. The koliformal bacteria have been found in water and ground precipitation of hot and cold springs. Opportunistic microorganisms have been allocated — *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus* (biogroup 2), *Citrobacter freundii*.

Key words: cold and hot springs, indicator microorganisms

Минеральные источники являются местами активной деятельности микроорганизмов, которые участвуют в продукции и деструкции органического вещества, трансформации газов, образовании биологически активных веществ. Огромно их значение в создании лечебного фактора минеральных вод и в процессах самоочищения. Микроорганизмы различных физиологических групп выступают в роли индикаторов состояния окружающей среды.

Возрастающее антропогенное воздействие на минеральные источники в связи с их широким использованием местным населением для лечения и отдыха и создающаяся особая зона туристско-рекреационного типа в Байкальском регионе делает актуальной оценку качества воды и донных осадков в минеральных источниках.

Целью данной работы было выявление и учет индикаторных микроорганизмов для санитарно-микробиологической оценки холодных и термальных минеральных источников Прибайкалья.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение общих колиформных (ОКБ) и термотолерантных колиформных бактерий (ТКБ) в воде проводилось мембранным и титрационным методами согласно ГОСТ 18963-73. В качестве накопительной универсальной среды для определения колиформных бактерий использовалась лактозо-пептонная среда.

Исследование общих колиформных бактерий в донных осадках и микробных матах проводилось согласно МУ МЗ СССР № 143-9/316-17-1985. В целях идентификации и дифференциации микробных культур изучали биохимические свойства с применением систем индикаторных бумажек (СИБ). Видовое разнообразие энтеробактерий определяли по определителям бактерий Берджи (1997).

Определение титра *Clostridium perfringens* в донных осадках и микробных матах производили методом посева в среду Вильсон-Блера согласно МУ МЗ СССР № 143-9/316-11985.

Определение колифагов проводили титрационным методом с предварительным их накоплением в среде обогащения на культуре *E. coli*.

Определение *Pseudomonas aeruginosa* проводили на плотной селективно-дифференциальной среде Эндо с предварительным накоплением их в жидкой лактозо-пептонной среде согласно МУ № 96/225-1997-1985 и МР 1986 «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях».

Определение патогенных стафилококков проводили методом высева в чашки Петри 0,2 мл основного разведения (донных осадков и микробных матов) на желточно-солевой агар и кровяной агар и 1 мл — в сахарный бульон с дальнейшей инкубацией при температуре 37 °С в течение 48 ч.

Определение патогенных энтеробактерий проводили методом предварительного обогащения на селенитовой и магниевой средах с последующим высевом на висмут-сульфит агар и плотные среды Плоскирева и Левина (МУК 4.2.1884-04).

Определение цист патогенных кишечных простейших проводили методом фильтрации 50 л воды через мембранный фильтр и с дальнейшей идентификацией согласно МУК 4.2.964-00.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Условно-патогенные

бактерии семейства *Enterobacteriaceae*

Общие колиформные бактерии были обнаружены в воде горячих и холодных источников. В гидротерме Горячинск из исследованных 37 проб воды не соответствовали нормативным показателям 13 проб, что составило 35 %, а в 8 пробах обнаружены термотолерантные колиформные бактерии. Из 39 проб донных осадков и микробных матов нормативным показателям не соответствовали 12, что составило 31 %. Из них в 4 пробах были выявлены термотолерантные колиформные бактерии. Обнаружение клостридий в донных осадках и микробных матах подтверждает фекальное загрязнение.

В холодных аршанах в Кумыске и Серебряном из исследованных 68 проб превышали нормативные показатели 12, что составило 7 %, из них в 4 обнаружены термотолерантные бактерии. Следует отметить, что в холодном источнике Серебряном, который находится в лесу и меньше подвергается антропогенной нагрузке, не были выявлены термотолерантные колиформные бактерии. В сезонной динамике наиболее часто колиформные бактерии в источниках обнаруживались в осенне-весенний период.

Из гидротермы Горячинск и холодных источников Кумыска и Серебряный (Прибайкалье) были выделены и идентифицированы условно-патогенные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, которые относились к родам *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* и *Citrobacter* (рис. 1).

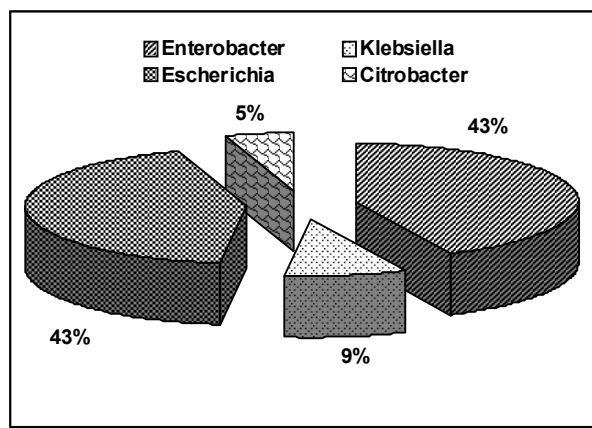


Рис. 1. Выделенные культуры бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в холодных и горячих источниках, %.

Среди выделенных культур из проб воды, донных осадков и микробных матов бактерии рода *Escherichia* составили 43 %, *Enterobacter* — 43 %, *Klebsiella* — 9 %, *Citrobacter* — 5 %.

Следует отметить, что в воде, донных осадках и микробных матах гидротермы Горячинск не встречались бактерии рода *Citrobacter*, а в воде холодных аршанов — бактерии рода *Klebsiella*. Был определен видовой состав выделенных энтеробактерий (табл. 1).

Наиболее широко представлены условно-патогенные бактерии рода *Enterobacter* в источнике Горячинск. В воде гидротермы Горячинск встречались все виды выделенных бактерий кроме *Citrobacter Freundi*. В то же время в микробных матах и донных осадках гидротермы не обнаружены микроорганизмы *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus* (буогруппна 2), *Citrobacter Freundi*. Кроме того, в матах источника не обнаружены бактерии *E. coli*, а в осадках — *K. oxytoca*.

В холодном источнике Серебряном был выявлен только *E. agglomerans* (табл. 2). В воде аршана Кумыска обнаружены 3 вида — *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* и *Citrobacter Freundi*.

Таблица 1

Энтеробактерии в термальных и холодных источниках Прибайкалья

Источники	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. amnigenus</i> буогруппна 2	<i>C. freundii</i>
Кумыска (колодец)	—	—	+	—	+	—	+
Кумыска (ручей)	—	—	—	—	—	—	+
Серебряный (озерко)	—	—	—	+	—	—	—
Серебряный (ручей)	—	—	—	—	—	—	—
Горячинск (вода)	+	+	+	+	+	+	—
Горячинск (донные осадки)	+	—	+	+	—	—	—
Горячинск (микробные маты)	+	+	—	—	—	—	—

Таблица 2

Биохимическая характеристика выделенных культур семейства *Enterobacteriaceae*

Тест	<i>E. aerogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. amnigenus</i> биограмма 2	<i>C. freundii</i>
Окраска по Граму	–	–	–	–	–	–	–
Оксидаза (24 ч)	–	–	–	–	–	–	–
Образование индола	–	+	+	–	–	–	–
Проба с метиленовым красным	–	–	+	–	–	–	+
Реакция Фогеса – Проскауэра	+	+	–	+	+	+	–
Цитрат (среда Симмонса)	+	+	–	+	–	+	+
Образование H ₂ S	–	–	–	–	–	–	–
Гидролиз мочевины	–	+	–	–	–	–	+
Фенилаланиндезаминаза	–	–	–	–	–	–	–
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	–	–	–	–
Орнитиндекарбоксилаза	+	–	–	–	+	+	–
Подвижность	+	–	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+
Использование ацетата	–	+	+	–	+	–	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+	+
Окисление-брожение	F	F	F	F	F	F	F
Образование газа из D-глюкозы	+	+	+	+	+	+	+
Образование кислоты из D-глюкозы	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «–» – отрицательный, «+» – положительный, «F» – ферментация

ДРУГИЕ ИНДИКАТОРНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Pseudomonas aeruginosa. В последние годы возрастает значение *Pseudomonas aeruginosa* в патологии человека. Обнаружение *Ps. aeruginosa* в объектах окружающей среды сигнализирует одновременно об эпидемическом (как патоген) и санитарном (как индикатор биологического загрязнения) неблагополучии. В исследованных пробах воды горячих и холодных источников не были обнаружены *Pseudomonas aeruginosa*.

Clostridium perfringens. В донных осадках и микробных матах гидротермы Горячинск обнаружены бактерии *Clostridium perfringens*, титр которых варьировал от 0,1 до 0,0001 г (табл. 3). В зимний период на всех обследованных станциях титр *Clostridium perfringens* был равен 0 – 0,1 г, что не превышало допустимые нормы. В другие сезоны отмечено увеличение количества сульфитредуцирующих клостридий (титр составлял 0,1 – 0,0001 г). Наиболее загрязненными были пробы осадков (ст. 5а, 5б и 6а) в июне, августе и октябре 2005 г.

Одновременное обнаружение общих колиформных бактерий и *Clostridium perfringens* свидетельствует о том, что загрязнение имеет фекальный характер.

В пробах донных осадков и микробных матов ручья (станции 3 – 6) одновременно присутствовали колиформные бактерии и *Clostridium perfringens* (июнь, август, октябрь 2005 г, май 2006 г.). В зимний период (февраль) вода в пруду (не полностью) и в ручье после него замерзает. В этот период тоже

обнаружено совместное присутствие ОКБ и клостридий в одной пробе.

На других станциях в ручье, где были обнаружены клостридии, но не выявлены колиформные бактерии, имеются также загрязнения антропогенного происхождения, но более отдаленного характера.

Колифаги. Бактериофаги по своим биологическим свойствам, устойчивости к химическим и физическим факторам, особенностям жизнедеятельности в условиях окружающей среды приближаются к энтеровирусам. На основании многолетних исследований водоемов рекомендовано использовать фаги кишечных бактерий в качестве санитарно-показательных организмов в отношении энтеровирусов.

На наличие колифагов были исследованы пробы воды гидротермы Горячинск (весной, летом, осенью и зимой) и холодных источников Серебряный и Кумыска (ежемесячно). В исследуемых источниках колифаги не были обнаружены.

Патогенные энтеробактерии. Контроль минеральных вод на присутствие в них патогенных энтеробактерий осуществляют по обнаружению бактерий рода *Salmonella*, как наиболее устойчивых из патогенных представителей этого семейства, и учитывают их отсутствие в 1000 мл воды. В исследованных пробах воды источников патогенные энтеробактерии не были обнаружены.

Патогенная кокковая микрофлора. Стафилококки определяли в донных осадках и микробных матах как показатель загрязнения микрофлорой

Таблица 3

Численность общих колиформных бактерий и клостридий в донных осадках и микробных матах гидротермы Горячинск, коли-титр (г)

Станции	Тип пробы	Дата отбора 06.2005		Дата отбора 08.2005		Дата отбора 10.2005		Дата отбора 02.2006		Дата отбора 05.2006	
		<i>C. perfringens</i>	ОКБ	<i>C. perfringens</i>	ОКБ	<i>C. perfringens</i>	ОКБ	<i>C. perfringens</i>	ОКБ	<i>C. perfringens</i>	ОКБ
Ст. 1аС	осадки	–	–	–	0	–	0	0	0	0,1	0
	маты	–	–	0	0,0001	0,01	0	0	0	0,1	0
Ст. 3а	осадки	0	0	0,1	10	–	–	–	–	–	–
	маты	0	0	0,1	10	–	–	–	–	–	–
Ст. 3б	осадки	–	–	0,1	0,001	0,1	0	0,1	0	0,01	0
	маты	–	–	–	–	0,1	0	0	0,01	0,1	1,0
Ст. 4	осадки	0,1	–	0,01	0,1	0,1	0	0,1	0,01	0,1	–
Ст. 5а	осадки	0,0001	0	0,001	0,001	0,001	10	–	–	0,01	0,001
Ст. 5б	осадки	0,001	0,01	0,0001	0	0,0001	10	–	–	0,01	0,001
Ст. 6а	осадки	0,001	0,01	0,0001	0	0,01	0	–	–	0,1	1,0
Ст. 6б	осадки	0,1	0	0	0	–	0	–	–	0,1	10

верхних дыхательных путей и кожных покровов человека. В донных осадках и микробных матах не были обнаружены *Staphylococcus aureus*.

Цисты патогенных кишечных простейших. В исследованных пробах воды гидротермы Горячинска и холодных источников Серебряный и Кумыска не обнаружены цисты патогенных кишечных простейших (цисты лямблий, амёбы дизентерийной и цисты балантидия кишечного).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изученные минеральные источники подвержены антропогенному воздействию, о чем свидетельствует выявление колиформных бактерий в воде источников, донных осадках и микробных матах гидротерм.

В исследуемых источниках распространены условно-патогенные бактерии, относящиеся к родам *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* и *Citrobacter*. В горячих источниках не обнаружены бактерии рода *Citrobacter*, а в холодных аршанах – *Klebsiella*. В воде источников не выявлены патогенные энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa* и колифаги. В донных осадках источника Горячинск обнаружены бактерии *Clostridium perfringens*, которые являются показателем антропогенного загрязнения.

Сведения об авторах

Бархутова Дарима Дондоковна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФГБУН Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, ИОЭБ СО РАН; тел. (3012) 434902; e-mail: darima_bar@mail.ru)

Дармаева Бальжима Витальевна – кандидат биологических наук, зав. отделением регистрации, учета и кодирования ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия

Намсараев Баир Бадмабазарович – доктор биологических наук, зав. лабораторией ФГБУН Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6, ИОЭБ СО РАН; тел. (3012) 434902)

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционных грантов СО РАН № 94, № 5 и гранта РФФИ_сибирь 12-04-98079.

ЛИТЕРАТУРА

- ГОСТ 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно-бактериологического анализа. – М.: Изд-во стандартов, 1993. – 24 с.
- МУ МЗ СССР № 143-9/316-17-1985. Оценка санитарно-бактериологического состояния лечебных грязей различных типов. – М.: Тип.м-ва здравоохранения СССР, 1985. – 23 с.
- МУ № 96/225-1997-1985 и МР 1986. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях. 1986. – 22 с.
- МУК 4.2.1884-04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2005. – 5 с.
- МУК 4.2.964-00. Санитарно-паразитологическое исследование воды хозяйственного и питьевого использования. – М.: Федеральный центр государственного санитарного эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения России, 2000. – 19 с.

С.В. Генералов, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова, О.А. Лобовикова

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ОСТАТОЧНОГО ЭТАНОЛА В ПРЕПАРАТЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов)

Представлены результаты определения остаточного этилового спирта в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием портативного фотоионизационного газового хроматографа ФГХ-1. К преимуществам метода следует отнести точность, чувствительность, экспрессность, отсутствие специальной пробоподготовки, возможность автоматизации при обработке результатов.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, остаточный этанол, газовая хроматография

GAS CHROMATOGRAPHY TECHNIQUE OPTIMIZATION FOR CHECKING RESIDUAL ETHANOL IN THE PREPARATION OF HETEROLOGOUS ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN

S.V. Generalov, M.N. Kireyev, E.G. Abramova, O.A. Lobovikova

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The article presents the results of determination of residual ethanol in the preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin, using portable photoionization gas chromatograph PGC-1. The advantages of the method are as follows: accuracy, sensitivity, promptness. It does not require sample preparation; the results can be processed automatically.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, residual ethanol, gas chromatography

ВВЕДЕНИЕ

Антирабические сывороточные препараты для постэкспозиционной профилактики бешенства были внедрены в практику здравоохранения в середине 50-х годов прошлого столетия. Внедрению антирабических сывороточных препаратов способствовала разработка методов концентрирования и очистки специфических антител, обеспечивающая повышение активности и снижение реактогенности. Для удаления балластных белков и получения высокоактивных препаратов иммуноглобулина были предложены различные методы фракционирования: Диаферм и его модификации, спиртовой, сульфатный, риванольный, полиэтиленгликолевый, каприлатный [1]. Для извлечения антител могут быть использованы различные сочетания методов хроматографии, однако их высокая стоимость затрудняет широкое практическое применение.

Методы фракционирования специфических антител, основанные на использовании этанола, позволяют получить стандартный, однородный очищенный препарат антирабического иммуноглобулина (АИГ) [12].

Спиртовой метод для получения антирабического иммуноглобулина, предложенный М.А. Селимовым, изложен в руководстве ВОЗ [6]. Модификация спиртового метода сотрудниками Томского НИИ вакцин и сывороток позволила на 30–35 % повысить выход гамма-глобулина без снижения специфической активности [1]. Для производства коммерческого препарата АИГ из

сыворотки крови лошади на территории СНГ с успехом используют риванол-спиртовой метод, который на сегодняшний день представляется наиболее эффективным методом фракционирования специфических антител [9]. Для эффективного удаления спирта из растворов иммуноглобулина используют методы диализа, ультрафильтрации, лиофильного высушивания [9, 10].

Согласно нормативной документации на «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», концентрация остаточного этилового спирта не должна превышать 4,5 %. Данный показатель имеет немаловажное значение для сохранения стабильности свойств, поскольку наличие остаточного спирта в готовом препарате может вызывать агрегацию иммуноглобулина, а именно агрегаты в препаратах иммуноглобулина способствуют проявлению различных побочных анафилактических реакций [3, 8].

В настоящее время для определения этанола в фармацевтических препаратах рекомендованы методы дистилляции [2], газовой хроматографии [2], а также метод, основанный на окислении этилового спирта дихроматом калия [5]. Последний достаточно трудоемок, требует длительной пробоподготовки исследуемого материала. Метод дистилляции является достаточно простым в исполнении, однако, на наш взгляд, он не обладает высокой чувствительностью, его применение оправдано при определении достаточно больших концентраций этилового спирта. Для определения остаточного этанола в препарате гетерологичного

АИГ необходим точный, чувствительный и достаточно экспрессный метод. Таким методом является газовая хроматография (ГХ). В Государственной Фармакопее XII [2] описано проведение анализа остаточного этанола в жидких фармацевтических препаратах методом газовой хроматографии, предусматривающее непосредственное нанесение подготовленной пробы в испаритель хроматографа. Следует отметить, что иммуноглобулин представляет собой высококипящее органическое соединение, а, следовательно, его выведение из колонки затруднено. В связи с этим более удобным представляется хроматографический анализ паровой фазы гетерологичного антирабического иммуноглобулина [7], разработка подобной модификации данного метода явилась целью настоящего исследования.

МЕТОДИКА

В работе использовали портативный газовый хроматограф ФГХ-1 (Россия, НПП «Экан») с фотоионизационным детектором и капиллярной колонкой длиной 25 м, предназначенный для качественного и количественного определения примесей в воздухе и газовых смесях как в лабораторных, так и в полевых условиях. Газовое обеспечение хроматографа осуществляется от встроенного баллона. В качестве газа-носителя применяют особо чистый газообразный азот. Режим работы хроматографа — изотермический. Хроматографические колонки термостатируют при температуре от 50 до 80 °С. Отбор анализируемой пробы в колонку осуществляют у границы раздела фаз через кран-дозатор с помощью микрокомпрессора, встроенного в хроматограф. Разделенные компоненты проходят через ячейку детектора, где они ионизируются под действием ультрафиолетового излучения. По величине измеряемого ионизационного тока происходит определение количества вещества, проходящего через ячейку детектора.

Для определения значения концентрации проводили от 4 до 5 измерений, затем измеряли среднюю высоту пиков и определяли зависимость концентрации этанола в газовой фазе от его концентрации в жидкой фазе.

Управление прибором, сбор, обработку и хранение результатов осуществляли на ЭВМ с использованием программы FGN 4 (НПП «Экан»).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Водный раствор этанола представляет собой двухкомпонентную двухфазную систему, которая состоит из жидкой фазы и насыщенного пара, находящегося в равновесии с жидкостью. Согласно третьему закону Коновалова при постоянных температуре и давлении имеет место однонаправленное изменение состава раствора и пара [11]. Таким образом, количественное определение этанола в жидкости становится возможным при непосредственном измерении его содержания в насыщенном паре методом газовой хроматогра-

фии. Для бинарной смеси этанол — вода ранее установлены значения содержания компонентов для каждой фазы [4].

Раствор антирабического иммуноглобулина представляет собой сложную поликомпонентную систему, в которой протекают физико-химические взаимодействия между ее составляющими: водой, белком, хлоридом натрия, гликоколом, остаточным этанолом. По этой причине содержание последнего в насыщенном паре раствора АИГ может отличаться от его содержания в насыщенном паре бинарной смеси этанол-вода при одинаковом его содержании в жидкой фазе [11].

Таким образом, наиболее удобным вариантом определения концентрации этанола в растворе АИГ явилась предварительная градуировка прибора. Градуировочные смеси готовили из раствора антирабического иммуноглобулина, восстановленного из лиофилизированной формы, к которому добавляли этанол до конечной объемной концентрации 0,5 %; 1 %; 3 %; 5 %; 10 %; 20 %. Использование лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина обосновано тем, что она является наиболее свободной от остаточных количеств этанола [10].

Для установления оптимальных условий градуировку прибора выполняли при следующих значениях температур исследуемых образцов (4 ± 2); (22 ± 3) и (35 ± 2) °С.

На рисунке 1 представлены калибровочные графики, на которых отображена зависимость содержания этанола в насыщенном паре в зависимости от его содержания в белковом растворе при заданном температурном значении.

Из рисунка 1 следует, что на результат эксперимента определенное влияние оказывает температура исследуемых образцов, от которой зависит состав насыщенного пара. Так, при температуре образцов (4 ± 2) °С уменьшение содержания этанола в насыщенном паре приводит к снижению угла наклона калибровочной кривой, что делает проведение анализа затруднительным. При значениях температур исследуемых образцов (22 ± 3) °С имеет место подъем угла наклона калибровочной кривой, однако при дальнейшем повышении температуры образцов до (35 ± 2) °С имело место смещение кривой практически параллельно ее положению при температуре (22 ± 3) °С, при этом заметного изменения угла наклона калибровочной кривой не происходило. Таким образом, на наш взгляд, оптимальным является проведение эксперимента при температуре анализируемых образцов (22 ± 3) °С.

После градуировки прибора выполняли измерения концентрации остаточного этанола в образцах производственных серий антирабического иммуноглобулина. Измерение проводили при температуре проб (22 ± 3) °С. Исследовали содержание этанола как в готовом препарате антирабического иммуноглобулина, так и в его растворе на различных стадиях производства. Результаты экспериментов представлены в таблице 1.

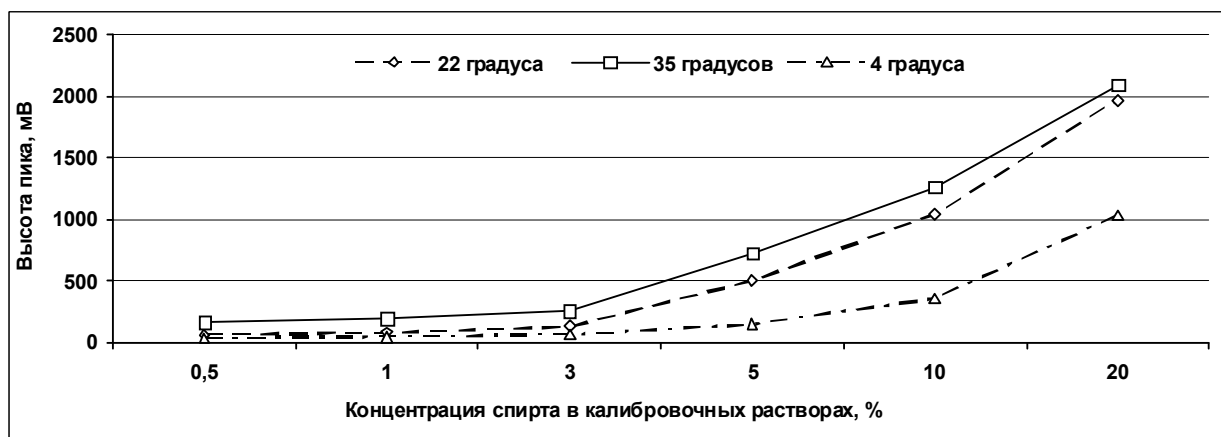


Рис. 1. Определение концентрации спирта в жидкости в калибровочных растворах. 1 – измерение при температуре образцов $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$, 2 – измерение при температуре образцов $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$, 3 – измерение при температуре образцов $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Таблица 1

Исследование остаточного этанола в производственных сериях антирабического иммуноглобулина методом газовой хроматографии

Наименование образца	Высота пика, мВ	Содержание этанола, %
АИГ, серия 76, готовый препарат	97 ± 3	$1,0 \pm 0,3$
АИГ, серия 77, готовый препарат	398 ± 3	$3,6 \pm 0,1$
АИГ, серия 124, полуфабрикат	920 ± 44	$9,0 \pm 0,5$
АИГ, серия 124, готовый препарат	63 ± 6	$0,5 \pm 0,1$
АИГ, серия 125, полуфабрикат	570 ± 49	$5,5 \pm 0,5$
АИГ, серия 125, готовый препарат	134 ± 23	$3,0 \pm 0,5$

Результаты исследований, представленные в таблице 1, согласуются с результатами определения остаточного этанола методом дистилляции, применяемым в настоящее время в соответствии с нормативной документацией на препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, рассматриваемый метод, обеспечивающий измерение количества остаточного этанола в диапазоне объемных концентраций от 0,5 до 20 %, является возможной альтернативой другим способам определения остаточного этанола в препарате гетерологичного АИГ. К достоинствам метода следует отнести точность и воспроизводимость результатов, экспрессность, позволяющую быстро оценить эффективность проведения процесса ультрафильтрации, отсутствие этапа специальной пробоподготовки, сравнительную простоту аппаратного оформления, возможность автоматизации при обработке результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гипериммунные сыворотки / С.П. Карпов. — Томск, 1976. — 380 с.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, издание XII, ч. 1. — М.: Научный центр

экспертизы средств медицинского применения, 2008. — С. 49–51.

3. Змачинская Т.Б., Анастасиев В.В. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского — 2001. — № 1. — С. 70–73.

4. Людмирская Г.С., Барсукова Т.А., Богомольный А.М. Равновесие жидкость — пар. — Л.: Химия, 1987. — 468 с.

5. Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96. — М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. — С. 107–108.

6. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методы лабораторных исследований по бешенству / Под ред. Каплан М.М., Копровски Н. Пер. с англ. — 3-е изд. — Женева: ВОЗ, 1975. — 360 с.

7. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. — М.: Медицина, 1978. — 600 с.

8. Пилявская Е.А. Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине // Научные основы производства гипериммунных сывороток. — Томск, 1979. — С. 60–61.

9. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина — итоги первых пяти лет

/ Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — № 3 (105) — С. 58—62.

10. Разработка сухой формы получения глобулина противосибиреязвенного / А.В. Комиссаров // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 74—79.

11. Физическая химия. Теоретическое и практическое руководство / Под ред. Б.П. Никольского. — Л.: Химия, 1987. — 880 с.

12. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. — Geneva, 2004. — 121 p.

Сведения об авторах

Генералов Сергей Вячеславович — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора (e-mail: svgeneraloff@gmail.com)

Киреев Михаил Николаевич — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии и протеомики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Абрамова Елена Геннадьевна — кандидат биологических наук, заведующий лабораторией профилактических иммуноглобулинов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора

Лобовикова Оксана Анатольевна — кандидат биологических наук, заведующий отделом биологического и технического контроля

О.В. Громова, И.А. Кузьмиченко, М.Н. Киреев, С.А. Нижегородцев, В.Н. Корсуков

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПЛЕКСА ФЕРМЕНТОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОТЕОВИБРИНА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Разработана технология выделения комплекса низкомолекулярных ферментов холерного вибриона, относимых к факторам патогенности, из отходов производства холерной вакцины с помощью концентрирующей ультрафильтрации. Данная технология позволяет получать стандартные серии препарата, названного протеовибрином, который свободен от основного иммуногена холерного вибриона – О-антигена и обладает высокой активностью протеазы и фосфолипаз A₂ и C. Показано, что протеовибрин хорошо растворим в воде и 0,14 М растворе NaCl, вызывает образование антител у кролика и токсичен для белых мышей. Является перспективным его дальнейшее исследование и возможное применение в качестве дополнительного источника ферментов холерного вибриона и трипсиноподобного препарата, пригодного для гидролиза белкового сырья при получении микробиологических питательных сред.

Ключевые слова: холерная вакцина, ферменты, протеовибрин, ультрафильтрация

NEW WAY OF ISOLATION OF ENZYME COMPLEX OF CHOLERA VIBRIO – PROTEOVIBRIN BY MEANS OF ULTRAFILTRATION

O.V. Gromova, I.A. Kuz'michenko, M.N. Kireev, S.A. Nizhegorodtsev, V.N. Korsukov

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

The technology of isolation of the cholera vibrio complex of low-molecular enzymes related to pathogenicity factors, from cholera vaccine production wastes by means of concentrating ultrafiltration was developed. This technology allows to obtain standard series of the preparation termed proteovibrin which is free from the basic *Vibrio cholerae* immunogen – O-antigen, and possesses high activity of protease and phospholipases A₂ and C. It is shown that proteovibrin is highly soluble in water and 0.14 molar NaCl solution, causes the production of antibodies in rabbits and is toxic for white mice. Its further examination seems to be promising, as well as its possible use as additional source of the cholera vibrio enzymes and as trypsin-like preparation, applicable for protein raw material hydrolysis in production of microbiological nutrient media.

Key words: cholera vaccine, enzymes, proteovibrin, ultrafiltration

ВВЕДЕНИЕ

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. В технологию производства холерной химической таблетированной вакцины института «Микроб» с целью повышения рентабельности производства внедрен способ концентрирования О-антигенсодержащей культуральной жидкости штамма *Vibrio cholerae* M41 серовара Огава на установке из шести ультрафильтрационных колонок УВА-20ПС-1040 [4]. При ультрафильтрации центрифугата формализированной культуральной жидкости холерного вибриона образуются две фракции, одна из которых – концентрат – обогащена нативным целевым продуктом – О-антигеном. Вторая фракция – ультрафильтрат – по объему значительно превосходит первую фракцию и в настоящее время является отходом производства холерной вакцины. Ранее нами было показано, что данный ультрафильтрат содержит ряд низкомолекулярных ферментов, среди которых преобладает активность протеазы и фосфолипаз A₂ и C [8]. Известно, что последние принимают участие в развитии инфекционного процесса, на что указывают многочисленные данные литературы [1, 7, 9, 12]. Некоторыми авторами также рассматривается возможность приме-

нения ферментов, в частности, протеаз холерного вибриона, в качестве компонентов бесклеточных холерных вакцин [11, 12]. Поэтому разработка щадящих методов получения комплекса факторов патогенности ферментативной природы является актуальной.

Целью данной работы явилась разработка технологии получения комплекса экзоферментов холерного вибриона с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах и его характеристика.

МЕТОДИКА

При выполнении работы использовали производственный штамм *Vibrio cholerae cholerae* M41 серовара Огава, продуцент О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в реакторе-ферментере Р170 (г. Фастов, з-д «Красный Октябрь», Украина) объемом 250 л на среде из ферментативного гидролизата казеина (ГОСТ 17626-81, ЗАО «Клейт», Москва) pH 7,6 в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Первичный ультрафильтрат получали при ультрафильтрации центрифугата формализированной культураль-

ной жидкости штамма М41 в процессе получения О-антигенного компонента на волоконном аппарате марки УВА-ПС-20-1040 (производитель ВНИИ полимерных волокон, г. Мытищи, Московской области).

Для определения активности протеазы и фосфолипаз A_2 и С использовали плотные тест-среды с молоком или яичным желтком соответственно. За единицу активности фермента принимали количество белка в мкг, дающее за 20 ч инкубации при 37 °С зону визуального изменения вокруг лунки шириной 2 мм. Удельную активность выражали количеством единиц на мг белка препарата [6]. Содержание белка в пробах контролировали методом Лоури, количество полисахарида определяли с помощью тимолового реактива. Для определения общих липидов использовали биотест «Lachema» (Чехия, Хемапол). Количество нуклеиновых кислот измеряли по методу, описанному А.С. Спириным [5]. Специфическую активность очищенных антигенов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД), антисыворотку к протеовибрину получали путем 3-кратной иммунизации кроликов породы шиншилла массой 2,5 кг. Токсичность определяли на белых мышах по LD_{50} , введение препаратов проводили внутрибрюшинно. Манипуляции с животными проводили в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2003). Белковый спектр препаратов и молекулярную массу белков определяли с помощью электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, используя стандартные маркеры молекулярных масс от 12 до 67 кДа («Serva», Германия). Белки на электрофореграммах окрашивали кумасси R-250. Наличие углеводов в препаратах определяли, окрашивая электрофореграммы аммиачным серебром с предварительным перйодатным окислением полисахаридов. Разделение белковых компонентов препарата проводили на TSK-геле HW-60 (Toyo Soda MFG, Co LTD, Япония) и сефакриле S-300 («Sigma», США), элюцию вели фосфатным буфером 0,01 М рН 7,2 и 0,01 М фосфатным буфером с 0,01 М NaCl рН 7,0 соответственно, а также методом проточного электрофореза на аппарате Эльфор — VAP 5 (Германия) в 0,01 М трис-буфере рН 8,75 при напряжении 500 В, токе 50 мА на скорости потока разделительного буфера 500 мл/ч и подаче образца 2 мл/ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первый этап работы был связан с выделением ферментного комплекса. Поскольку объем ультрафильтрата с одного реактора превышал 200 л, для дальнейшей работы его необходимо было сконцентрировать. В предварительных экспериментах ультрафильтрат штамма М41 концентрировали в лабораторных условиях на автоматической установке АУФ-01 (Россия). Однако низкая мощность установки и малые объемы не позволяли получить

значимые количества препарата. Для повышения эффективности процесса выделения препарата нами были использованы ультрафильтрационные колонки марки УВА-ПС-17-1040 (Россия) с меньшей селективностью волокон, с производительностью по воде 210 л/ч. С целью их калибровки нами была проведена ультрафильтрация растворов коммерческих ферментов и БСА. Выявлено, что α -амилаза (48 кДа) («Serva», Германия), пепсин (35 кДа) («Serva», Германия), трипсин (23 кДа) («Serva», Германия) поступали в ультрафильтрат, в то время как БСА (67 кДа) («Serva», Германия) оставался в концентрате, что дало нам основание использовать данные колонки для концентрирования белков с низкой молекулярной массой из ультрафильтрата штамма М41. Для этих целей была разработана и смонтирована установка фильтрационного модуля. Ультрафильтрационная установка состояла из полуволоконного аппарата; баллона с газообразным азотом вместимостью 40 л; регулятора давления азота БКО-54-4 (Россия); реактора (ферментера) РЗРЯ-6/630 (Россия); насоса с магнитным приводом НШМП (Россия); ротаметра РС — 250 (Россия) и приемной емкости для фильтрата. Объем полых волокон колонки составлял 800 мл, объем внутреннего контура — 130 мл, размер колонки — 140 см. Материал волокон — нейлон. Подача насоса — 1 л 800 мл в мин. Давление азота над препаратом — 0,3 атм, в конце фильтрации — 0,1 атм.

Концентрирование 240 л фильтрата культуральной жидкости штамма М41 Огава проводили при температуре 6–8 °С. Начальная скорость фильтрации составила 0,76 л/мин, затем она снизилась и конце достигла 0,35 л/мин. Время концентрирования одного реактора составило 11 ч при средней скорости фильтрации 0,43 л/ч.

С целью дальнейшей оптимизации процесса фильтрации (повышения скорости фильтрации, сокращения времени одного цикла) нами была смонтирована установка с использованием двух колонок, соединенных последовательно. На данной установке проведено концентрирование фильтрата штамма М41 в количестве 200 л в двух циклах. На установке из двух колонок начальная скорость фильтрации составляла 1,7 л/мин, конечная скорость фильтрации составляла 0,5 л/мин. Использование установки позволило сконцентрировать 200 л фильтрата до 10 л в течение 6 ч со средней скоростью 0,78 л/мин.

В процессе ультрафильтрации каждые 30 мин производили отбор проб вторичного фильтрата, который контролировали по мутности (что позволяло определять целостность волокон колонки) и содержанию ферментов холерного вибриона. В результате сравнительного анализа исходного и сконцентрированного ультрафильтрата, а также вторичного фильтрата выявлено, что ферменты, содержащиеся в исходном ультрафильтрате (протеаза, фосфолипазы) накапливались в процессе ультрафильтрации и при концентрировании их общая активность возрастала. Соответственно во вторичном ультрафильтрате они отсутствовали.

Таким образом, используя последовательную ультрафильтрацию на колонках с различной селективностью из исходного центрифугата культуральной жидкости штамма М41 получен материал, обладающий высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и С. В нем отсутствовали ферменты, обнаруженные нами ранее в культуральной жидкости штамма М41 — твиназа (липаза), лизофосфолипаза, ДНК-аза, РНК-аза и амилаза [3]. Выделение ферментного комплекса из сконцентрированного ультрафильтрата проводили путем осаждения сернокислым аммонием при 80 % насыщения, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на СГО-100 (Россия) при 15000 g, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Ферментный комплекс назван нами протеовибрином. В дальнейшем использовали три серии лиофилизированного комплекса ферментов, полученные из сконцентрированных ультрафильтратов после осаждения белков сернокислым аммонием. Ферментативная активность препаратов после двустадийной ультрафильтрации культуральной жидкости штамма М41 показана в таблице 1. Все препараты характеризовались высокой активностью протеазы, фосфолипазы A_2 и С и хорошей растворимостью. Результаты изучения химического состава, серологической активности и токсичности для белых мышей (табл. 2) полученных препаратов выявили, что основным компонентом ферментных комплексов являлся белок, помимо которого обнаружены углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты. По содержанию белка препараты трех серий были близки (68–72 %). Токсичность препаратов для белых мышей в трех сериях практически была однозначной (0,25–0,35 мг белка).

Как показали данные РИД с кроличьей анти-сывороткой, полученной на ферментный комплекс, выявлено, что препараты трех серий обладают иммунохимической идентичностью, образуя совпадающие двойные линии преципитации. Серологическая активность препаратов была практически одинаковой, титр реакции 1:32. При электрофоретическом разделении всех серий препарата обнаруживали белковые фракции, соответствующие 45, 40 и 25 кДа. Как известно, молекулярные массы таких ферментов холерного вибриона, как протеаза, фосфолипаза [10, 11, 3] лежат как раз в этом диапазоне. На окрашенной серебром электрофореграмме углеводы располагались единой компактной зоной, молекулярной массой около 25 кДа и менее.

Очистку протеовибрина и разделение его компонентов проводили различными методами. При геле-фильтрации препарата на TSK-геле HW-60 в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,2 профиль элюции имел два пика, при этом основную долю активности протеазы и фосфолипазы A_2 и С обнаруживали в первом пике, в одних и тех же пробах. При геле-фильтрации на другом носителе — на колонке с гелем сефакрила S-300 в 0,01 М фосфатном буфере с 0,01 М NaCl pH 7,0 профиль элюции имел 4 пика, самый крупный из которых — второй содержал все три изучаемых фермента с наибольшей активностью. Следовательно, разделить ферменты по молекулярной массе не удалось. Такой же отрицательный результат мы получили при попытке их разделить по заряду молекул. При проведении проточного электрофореза на аппарате Эльфор — VAR 5 в 0,01М трис-буфере pH 8,75 получено два разновеликих белковых пика, активность всех трех ферментов была сосредоточена в малом пике (рис. 1). На основании этих данных протеовибрин можно рассматривать как ферментный комплекс.

Таблица 1
Ферментативная активность препаратов, полученных при двустадийной ультрафильтрации культуральной жидкости штамма М41 холерного вибриона

Этап	Препарат	Содержание белка*, мг/мл	Удельная активность ферментов, ед/мг белка (среднее из 3-х серий)		
			Протеаза	Фосфолипаза A_2	Фосфолипаза С
I	Центрифугат	0,26	2066	2266	308
II	Первичный ультрафильтрат	0,07	2700	2590	262
III	Концентрат ультрафильтрата	0,57	2930	2957	285
IV	Ферментный комплекс протеовибрин	5,86	14200	12500	770

Примечание: * – среднее из 3–5 определений, средняя ошибка не превышает 12 %.

Таблица 2
Химический состав и серологические свойства ферментного комплекса – протеовибрина штамма V. cholerae М41

Серия	Химические компоненты в %				Титр в РИД	LD ₅₀ мг белка
	Белок	Углеводы	Липиды	Нуклеиновые кислоты		
1	72,7 ± 0,9	10,9 ± 0,4	5,2 ± 0,15	2,1 ± 0,1	16	0,25
2	69,3 ± 0,7	11,2 ± 0,35	3,9 ± 0,3	2,8 ± 0,15	32	0,3
3	68,4 ± 0,8	9,7 ± 0,4	4,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1	32	0,35

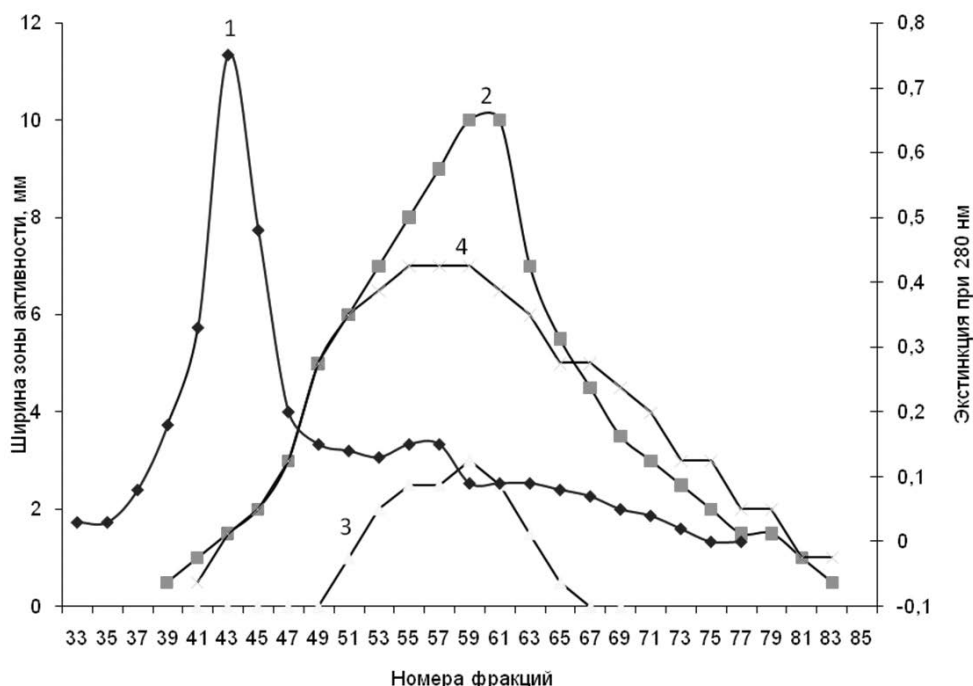


Рис. 1. Электрофоретическое разделение компонентов протеовибрина в свободном потоке. 1 – кривая экстинкции белка; 2 – активность протеазы; 3 – активность фосфолипазы A_2 ; 4 – активность фосфолипазы C.

В результате нами из трех серий сконцентрированного ультрафильтрата после осаждения белков сернокислым аммонием получен диализованный лиофилизированный комплекс ферментов с высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и C и хорошей растворимостью в воде и 0,14 М растворе NaCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом нами разработана технология выделения комплекса низкомолекулярных ферментов холерного вибриона, относимых к факторам патогенности, из отходов производства холерной вакцины с помощью концентрирующей ультрафильтрации, которая позволяет получать препараты с высокой активностью протеазы и фосфолипаз A_2 и C. Является перспективным его дальнейшее исследование и возможное применение в качестве дополнительного источника ферментов холерного вибриона. В практическом плане нами разработан способ получения питательной основы для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio* (патент № 2360962 Бюлл. № 19, 2009 г.) [2], в котором гидролиз белкового сырья производится протеовибрином, что позволяет сократить сроки гидролиза, уменьшить количество переваривающего агента и расширить ассортимент питательных сред.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимическая и иммунохимическая характеристика новой оральной холерной химической бивалентной вакцины и результаты испытания препарата на добровольцах // М.Н. Джапаридзе [и др.] // Журн. микробиол. — 1982. — № 11. — С. 29 – 33.

2. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Червякова Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В., изобретатели. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ № 2360962, МКП С 12N 1/20. Опубл. 10.07.09. Бюл. № 19.

3. Протеолитическая активность холерных вибрионов О1 и не О1 групп / С.Н. Дегтярева [и др.] // Холера. Матер. Росс. науч. конф. — Рн/Д; Изд. ПТК «Искусство». — 1992. — С. 129 – 133.

4. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцины / И.А. Дятлов [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — Саратов, 2001. — Вып. 2 (82). — С. 133 – 139.

5. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. — 1958. — Т. 23. — Вып. 5. — С. 656 – 662.

6. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — Саратов, 2002. — Вып. 1 (83). — С. 148 – 153.

7. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ продукции основных протективных антигенов у рекомбинантных и производственных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара // Журн. микробиол. — 2005. — № 1. — С. 53 – 57.

8. Экзоферменты ультрафильтрата культуральной жидкости вакцинного штамма М-41 холерного вибриона / И.А. Кузьмиченко [и др.]

// Холе́ра : материалы VIII Российской научн.-практ. конф., 4–5 июня 2003 г., Ростов-на Дону. — РН/Д, 2003 г. — С. 229–230.

9. Booth B.A., Finkelstein R.A. Presence of hemagglutinin/protease and other potential virulence factor in O1 and non O1 *Vibrio cholerae* // J. Infect. Dis. — 1986. — Vol. 154, N 1. — P. 183–186.

10. Cloning, characterization and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced

by *Vibrio cholerae* / A.E. Fiore [et al.] // Infect. Immunity. — 1997. — Vol. 65, N 8. — P. 3112–3117.

11. Stewart-Tull D.E., Bleakley C.R., Galloway T.S. Characteristics of *Vibrio cholerae* proteinases: potential, candidate vaccine antigens // Vaccine. — 2004. — Vol. 22, N 23–24. — P. 3026–3034.

12. Young D.B., Broadbent D.A. Extracellular protease activity of *Vibrio cholerae* // J. Pathol. — 1982. — Vol. 138, N 1. — P. 60–63.

Сведения об авторах

Громова Ольга Викторовна – к.м.н., с.н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212; e-mail: microbe@san.ru)

Кузьмиченко Инна Александровна – к.б.н., с.н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Нижегородцев Сергей Анатольевич – к.б.н., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Киреев Михаил Николаевич – к.м.н., зав. лабораторией биохимии и протеомики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Корсуков Владимир Николаевич – к.б.н., н.с. Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; тел. раб: (845-2) 262-131; факс (845-2) 515-212)

Г.А. Данчинова¹, М.А. Хаснатинов¹, Е.В. Арбатская¹, Р.С. Шобоева², С.С. Ханхареев²,
Д. Абмэд³, Ж. Бата³, Д. Цэрэнноров⁴, Д. Отгонбаатор⁴

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ В БАССЕЙНЕ р. СЕЛЕНГА НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИК БУРЯТИЯ И МОНГОЛИЯ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия (Улан-Удэ)

³ Национальный Центр инфекционных заболеваний МЗ Монголии (Улан-Батор, Монголия)

⁴ Национальный Центр природно-очаговых заболеваний МЗ Монголии (Улан-Батор, Монголия)

В статье приводятся обобщенные результаты исследования в бассейне р. Селенга — наиболее опасной территории в отношении природно-очаговых инфекций в Республиках Бурятия и Монголия. Как пример, максимальные показатели заболеваемости клещевым энцефалитом для обеих республик отмечены в Прибайкальском районе Бурятии и Селенгинском районе Монголии, расположенных на р. Селенга. На этих территориях в бассейне р. Селенга с высоким риском заражения клещевыми инфекциями распространены все известные к настоящему времени в Бурятии и Монголии переносчики и возбудители этих инфекций. Показано наличие сходных процессов, происходящих в природных очагах этих инфекций независимо от наличия административных границ.

Ключевые слова: клещевые инфекции, природные очаги, заболеваемость, распространение

THE SPREAD OF THE TICK-BORNE INFECTIONS IN THE BASIN OF SELENGA RIVER IN BURYATIA AND MONGOLIA

G.A. Danchinova¹, M.A. Khasnatinov¹, E.V. Arbatskaya¹, R.S. Shoboyeva²,
S.S. Khankhareyev², D. Abmed³, J. Bataa³, D. Tserennorov⁴, D. Otgonbaatar⁴

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Department of Rospotrebnadzor in Republic of Buryatia, Ulan-Ude

³ The National Center for Infectious Diseases, Ulaanbaatar

⁴ The National Center of Infectious Diseases with Natural Foci, Ulaanbaatar, Mongolia

The results of the research of Selenga river basin as territory of highest risk of human infection with diseases with natural focality in Buryatia and Mongolia are present in this paper. Both in Buryatia and in Mongolia the highest incidence rate for tick-borne encephalitis is associated with districts situated in the basin of Selenga river — Pribaykalskiy district and Selenge aimag respectively. All tick-borne infections and every vector tick species detected in Buryatia and Mongolia so far are present on the territories of these two districts. The epidemiological processes in the natural foci of these territories are shown to be very similar in spite of national and administrative borders.

Key words: tick-borne infections, natural foci, incidence, distribution

Природные очаги клещевых инфекций, среди которых наиболее изучены клещевой энцефалит (КЭ), клещевой боррелиоз (КБ) и клещевой риккетсиоз (КР), распространены в бассейне р. Селенга на территории Республик Бурятия и Монголия.

Селенга — крупнейшая водная артерия Бурятии и Монголии, самая большая река, впадающая в озеро Байкал и принадлежащая к бассейну Северного Ледовитого океана. В Монголии она стоит на первом месте по водности, в пределах ее бассейна находится самое глубокое (262 м) и самое крупное по запасам пресных вод в стране озеро Хубсугул [16]. Общая длина Селенги составляет свыше 1 тыс. км, из них 409 — по России (по 5 районам Бурятии: Джидинскому, Селенгинскому, Улан-Удэнскому, Прибайкальскому, Кабанскому) [8]. Через Селенгу и ее приток Эгийн гол озеро Хубсугул соединяется с озером Байкал. Природную провинцию сводово-глыбовых гор и котловин бассейна р. Селенга характеризует сложная ландшафтная структура. Здесь представлены: экспозиционно-горно-лесостепные, горно-сухостепные, горно-лесные и горно-степные ландшафты.

В Бурятии наблюдается неуклонный рост заболеваемости клещевыми инфекциями. Так, например, в 2002 г. показатель заболеваемости КЭ в республике вырос по сравнению с 70-ми гг. прошлого столетия в 31 раз и составил 21,2 на 100 тыс. населения, сейчас находился на уровне 2,1—4,8, хотя и эти показатели выше общероссийских. Прослеживается не только рост количественного показателя, но и увеличивается число районов, в которых выявляется заболеваемость КЭ. Если в 1992—93 гг. КЭ болели на 5—8 административных территориях (из 21), то в 2000 г. — на 18. Ежегодно с 1996 г. диагноз КЭ подтверждается у 1—2 человек, проживающих на бурятском отрезке БАМ. Летальность от КЭ в республике составляет 3,2 %. Среди районов, стабильно обеспечивающих высокую заболеваемость КЭ, в первую очередь, необходимо отметить Кабанский район, расположенный в дельте р. Селенги на юго-восточном побережье оз. Байкал. Здесь за последние 13 лет, включая 2011 г., показатель заболеваемости колеблется от 3,1 (2008 г.) до 38,4 (2006 г.) на 100 тыс. населения. Всего в пяти районах, расположенных в бассейне

р. Селенга, с 1999 г. зарегистрировано 768 случаев заболеваний КЭ. Максимальные показатели заболеваемости отмечены в Прибайкальском районе в 2001 – 2005 гг. (от 57,1 до 71,4), а в 2002 г. – свыше 109 случаев на 100 тыс. населения.

Уровень заболеваемости КБ по Бурятии ниже, чем по России, а КР – с 1997 г. превышает общероссийский.

Таким образом, бассейн р. Селенга характеризуется существованием всех известных к настоящему времени нозологических форм клещевых инфекций, заболеваемость которыми в Бурятии растет в последние годы и превышает общероссийский уровень.

Как на территории Бурятии, так и на территории Монголии наиболее напряженные природные очаги клещевых инфекций приурочены к районам, прилегающим к бассейну р. Селенга.

Успешное развитие природных очагов клещевых инфекций в Восточной Сибири и Монголии обеспечивается наличием разнообразных возбудителей, переносчиков, прокормителей [12, 13, 15]. В дельте Селенги известны иксодовые клещи трех родов: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*. Из них наибольшее эпидемиологическое значение имеет широко распространенный *I. persulcatus* P. Sch – таежный клещ, основной переносчик КЭ и КБ, вторым по численности и значимости на этой территории является *D. nuttalli* Ol. Также встречаются клещи *I. lividus* – птичий клещ, *I. trianguliceps*, *D. silvarum* Ol. – лесостепной клещ, *H. concinna* Koch. Виды прокормителей разнообразны в различных ландшафтно-географических зонах и включают множество мелких, средних и крупных млекопитающих из числа диких и домашних животных и птиц.

В ходе наших совместных исследований было установлено большое обилие клещей в Селенгинском аймаке Монголии, которое, наряду с регулярными выездами населения в активные природные очаги с бытовыми и производственными целями, такими как, например, сбор оленьих рогов или золотодобыча на старых приисках, обеспечивало высокую частоту контактов с клещами и почти стопроцентную «покусанность» населения клещами. При опросе этих людей встречались пациенты, отмечающие до 30 и более присасываний клещей за один весенне-летний сезон. Нередко они имели жалобы на головные боли, боли в сердце, в суставах, ухудшение зрения, слуха и т.п. Также регистрировались случаи инвалидности по причине нейроинфекций неясной этиологии у людей, в анамнезе которых отмечались случаи присасывания клещей в разные периоды их жизни.

В течение многих лет на стационаре в предгорьях северного склона хр. Хамар-Дабан, в окрестностях пос. Горный проводились мониторинговые исследования. Средняя численность таежного клеща на этом участке имеет самые высокие показатели в Бурятии и колеблется по годам от 130 до 340 экз. на 1 флаго/км [7], в отдельные годы достигая запредельных величин – 900 и выше [10]. Индивидуальная зараженность таежных клещей

вирусом КЭ – от 0,6 до 3,5 % [14], зараженность возбудителем КБ в районах, расположенных в долине р. Селенга, колеблется от 0 в Джидинском, до 29 % в Прибайкальском районе, 20 % – в Селенгинском [13]. Высокая численность клещей сохраняется до начала июля (205 экз. на 1 фл/км в 2005 г.). Возможно, высокое обилие клещей обеспечиваются достаточной увлажненностью и оптимальной температурой, характерными для приречных пойменных биотопов. Численность мелких млекопитающих на стационаре имеет 3 – 4-летнюю цикличность и характеризуется устойчивой тенденцией к росту (до 16 – 18 %). Высокие показатели прокормления личинок и нимф таежного клеща обнаружены у лесных полевков: красной (показатель прокормления – 6,0), красно-серой (4,5), бурозубок (3,0). Прямая связь между показателем прокормления личинок и нимф и активностью взрослых клещей не прослеживается.

Существенное влияние на заболеваемость трансмиссивными клещевыми инфекциями в г. Улан-Удэ и прилегающих районах оказывает степень контакта населения с природными очагами. В конце 80-х гг. прошлого столетия нами отмечалось, что в регионах, граничащих с Иркутской областью, наблюдается менее интенсивное, но сходное по форме хозяйственное освоение территории и прогнозировалось, что по мере увеличения степени антропогенной нагрузки будут наблюдаться процессы, аналогичные изученным в Предбайкалье [11]. Высокий контакт населения с очагами на начальных этапах рекреационного освоения территории зависит от улучшения условия обитания и прокормления клещей. Многократно увеличивается численность мелких млекопитающих в окрестностях этих садоводств. Четвертая часть лиц, обратившихся по поводу укусов, занималась сбором дикоросов (черемши, папоротника, ягод, грибов, лекарственных трав).

Это предположение было доказано исследованиями, проводимые нами и нашими монгольскими коллегами на территории Монголии с 1998 г. К настоящему времени выявлено наличие активных природных очагов клещевых инфекций [1 – 7, 9, 12, 18 – 20, 22 – 25]. Из них наибольшую опасность для населения представляют КЭ и КБ. Результаты серологических анализов сывороток крови людей, пострадавших от укусов клещей, указывают на заболевания КЭ, КБ или микст-инфекций (КЭ + КБ). Эти данные подтверждаются опросами населения, медперсонала соматических и аймачных больниц, осмотрами пациентов, находящихся на лечении в этих учреждениях. Начиная с апреля, укусам клещей подвергается практически все население поселков, расположенных в лесной и лесостепной зоне. У многих из них после укуса клеща развивается стойкое ухудшение здоровья – от слабости, головной боли, лихорадочного состояния до менингоэнцефалита, парезов, параличей и пр.

Примерно у третьей-четвертой части людей, постоянно проживающих на территории таежной и лесостепной зон в долине Селенги Селенгинского

аймака и подвергшихся одному или нескольким укусам клещей в сроки антигенемии выявлен антиген вируса КЭ, у 5 % из них содержание его высокое, антитела к вирусу КЭ (РТГА) обнаружены у 17, 4 % людей [19]. Из года в год наблюдается высокая численность таежного клеща в характерных для клещей биотопах припойменных участков бассейна р. Селенги, местами обилие клещей достигает весьма больших показателей (сомон Худэр — свыше 90, сомон Бугант — 380 экз. на 1 фл/км), в Центральном аймаке — от 0 до 20 экз. на 1 фл/км. В среднем около 16 % клещей заражено возбудителем КБ. Изоляция и генотипирование боррелий из таежных клещей показало, что в Монголии циркулируют боррелии геновидов *Borrelia garinii* и *B. afzelii* [9, 18]. В очагах в северной и центральной части Монголии встречаются единичные экземпляры *Dermacentor nuttalli* и *D. silvarum*. Численность *D. nuttalli* в степных и лесостепных очагах в марте-апреле бывает значительной — до нескольких сотен особей на 1 фл/км [12]. Также нами обнаружены единичные особи клещей *H. concinna*.

Кроме этого нами проанализировано 309 клещей родов *Ixodes* и *Dermacentor*, отловленных в лесных и лесостепных ландшафтах на территории Селенгинского, Центрального и Булганского аймаков Монголии. Более чем три четверти степных клещей были инфицированы риккетсиями (78 %). Зараженность клещей *I. persulcatus* составила риккетсиями — 46 % и микроорганизмами семейства *Anaplasmataceae* — 43 % [2].

При этом инфицированность клещей рода *Dermacentor* микроорганизмами семейства *Anaplasmataceae* была значительно ниже, чем таежных клещей и составила соответственно 2 %. Риккетсии, инфицирующие клещей *I. persulcatus* в Прибайкалье и Монголии, принадлежат к одному виду и имеют идентичную структуру гена rOmpA. Нуклеотидная последовательность фрагментов этого гена наиболее близка, но не идентична, *R. canadiensis* (85 % сходства).

Анализ 3 фрагментов гена 16S rRNA от клещей, отловленных в Монголии, позволил идентифицировать два из них как *Ehrlichia muris* и один — как риккетсиеподобный микроорганизм *Montezuma* [25].

Более поздние кросс-секционные исследования в Алтан-Булагском и Худерском сомонах Селенгинского аймака показали, что после укуса клеща 21,2 % жаловались на ухудшение здоровья (лихорадка, головная боль, ригидность затылочных мышц) и при этом 93 % не обращались в медицинские учреждения, что в купе с результатами анализа образцов крови от 50 человек, у 26 % которых обнаружены антитела к клещевому энцефалиту и у 12 % — к клещевому боррелиозу, свидетельствует о недостоверности статистических данных о заболеваемости как клещевым энцефалитом, так и другими клещевыми инфекциями [4, 6].

Природные очаги трансмиссивных инфекций, расположенные в бассейне р. Селенга на территории Монголии, испытывают меньший пресс

антропогенного воздействия, чем очаги, расположенные на российской территории бассейна р. Селенга, хотя уже прошли начальные этапы последовательных преобразований и подверглись достаточно ощутимой трансформации таежных и степных ландшафтов.

Полученные материалы свидетельствуют о наличии сходных процессов, происходящих в природных очагах клещевых инфекций в бассейне р. Селенга, независимо от наличия административных границ.

Исследование проведено при поддержке грантов РФФИ: № 08-04-90206 (2008–2009 гг.) и № 11-04-92226 (2011–2012 гг.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Environmental influences to the morbidity of tick borne encephalitis in Mongolia and prevention from them / D. Abmed [et al.] // Public Health-Zoonosis infection (Materials of conference). — Ulaanbaatar, 2003. — P. 74–78.
2. Genetic diversity of tickborne bacteria in Mongolia and Russia (Irkutsk region) / T.V. Glushenkova [et al.] // Current issues on Zoonotic Diseases : International conference. — Ulaanbaatar, 2010. — S. 179–184.
3. Molecular detection of zoonotic anaplasma in vector tick in Mongolia / G. Javkhlan [et al.] // Журнал инфекционной патологии, 2012. — Т. 19, N 3. — С. 82–83.
4. Population based epidemiological survey of tick borne disease in Selenge aimag, Mongolia, 2011 / A. Dolgorkhand [et al.] // Журнал инфекционной патологии, 2012. — Т. 19, № 3. — С. 77.
5. Serological evidence for tick-borne encephalitis, borreliosis, and human granulocytic anaplasmosis in Mongolia / G. Walder [et al.] // International Journal of Medical Microbiology. — 2006. — Т. 296, № SUPPL. 1. — P. 69–75.
6. Some epidemiological characteristics and neurological sequelae of the tick-borne encephalitis in Mongolia / A. Dolgorkhand [et al.] // Журнал инфекционной патологии, 2012. — Т. 19, N 3. — С. 77.
7. Tick-borne encephalitis virus in Mongolia [abstract] / M. Khasnatinov [et al.] // Int J Infect Dis — 2010. — 14S1:76.005
8. Атлас Забайкалья (Бурятская АССР и Читинская область). — М. — Иркутск, 1967. — 176 с. 1
9. Генотипирование штаммов боррелий, выделенных из клещей Монголии / М.А. Хаснатинов [и др.] // Эрдэм шинжилгээний бүтээл. — Улаанбаатар. — 2005. — № 13. — С. 210–225.
10. Горин О.З., Бялая И.В., Шихарбиев Б.В. Обнаружение территорий с очень высокой численностью клещей на Забайкальском участке строительства Байкало-Амурской магистрали // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. — 1977. — № 4. — С. 394–397.
11. Данчинова Г.А. Очаги клещевого энцефалита в Предбайкалье в условиях антропогенной трансформации ландшафтов : автореферат дис. ... канд. биол. наук. — М., 1988. — 24 с.

12. Данчинова Г.А., Хаснатинов М.А., Сунцова О.В. Переносчики и возбудители трансмиссивных клещевых инфекций на юге Восточной Сибири и Севере Монголии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. — 2004. — № 1, Т. 3. — С. 107–112.

13. Инфицированность боррелиями и обилие таежного клеща в Прибайкалье / Г.А. Данчинова [и др.] // Актуальные проблемы здоровья населения Сибири: гигиенические и эпидемиологические аспекты : материалы V межрегиональной научно-практической конф. с международным участием. — Омск, 2004. — Т. 2. — С. 142–149.

14. Мельникова О.В., Ботвинкин А.Д., Данчинова Г.А. Зараженность голодных и питавшихся таежных клещей вирусом клещевого энцефалита (по данным иммуноферментного анализа // Журнал инфекционной патологии, 1996. — Т. 3, № 1. — С. 14–18.

15. Многолетняя и сезонная динамика зараженности таежного клеща возбудителями клещевого боррелиоза в Прибайкалье / О.В. Сунцова [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 159–165.

16. Монгольская Народная Республика. Национальный атлас. — Улан-Батор — Москва, 1990 — 144 с.

17. Некоторые эколого-эпидемиологические особенности клещевого энцефалита в Республике Бурятия / Г.А. Данчинова [и др.] // Эпидемиологическая обстановка и стратегия борьбы с клещевым энцефалитом на современном этапе: материалы расширенного Пленума проблемной комиссии РАМН «Клещевой и другие вирусные энцефалиты», 9–10 декабря 2003 г. — М., 2003. — С. 23–24.

18. Первая изоляция и генотипирование *Borrelia burgdorferi sensu lato* из клещей в Республике Монголия / М.А. Хаснатинов [и др.] // Межрегиональная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова. Тез. докл. (7–10 октября 2003). — Томск, 2003. — С. 57–58.

19. Природные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории Северной и Центральной Монголии / Г.А. Данчинова [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — Иркутск, 2002. — № 4, Т. 2. — С. 52–54.

20. Результаты изучения природных очагов клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза на территории северной Монголии / О.З. Горин [и др.] // Халдварт овчний тулгамдсан асуудлууд. Эрдэм шинжилгээ — практикийн бага хурал. — Улан-Батор, 1999. — С. 14–15.

21. Ситуация по клещевым инфекциям в Монголии / Д. Цэрэнноров [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2007. — № 3. — Приложение. — С. 181–183.

22. Современная ситуация по клещевому энцефалиту в Монголии / Г.А. Данчинова [и др.] // Эпидемиологическая обстановка и стратегия борьбы с клещевым энцефалитом на современном этапе : материалы расширенного Пленума проблемной комиссии РАМН «Клещевой и другие вирусные энцефалиты», 9–10 декабря 2003 г. — М., 2003. — С. 36–37.

23. Сравнительное изучение изолятов *B. burgdorferi* s.l., полученных из клещей, собранных на территориях Томской области и Северной Монголии / О.В. Стронин [и др.] // Межрегиональная научная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР С.П. Карпова. Тез. докл. (7–10 октября 2003). — Томск, 2003. — С. 32.

24. Фауна и экология популяций иксодовых клещей — переносчиков клещевых инфекций в Монголии / Г.А. Данчинова [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2007. — № 3. — С. 90–93.

25. Характеристика риккетсий Прибайкалья и Монголии на основе фрагментов генома / М.А. Хаснатинов [и др.] // Национальные приоритеты России. Спец выпуск «Современные аспекты природной очаговости болезней», 2011. — № 2 (5). — С. 157–158.

Сведения об авторах

Данчинова Галина Анатольевна — д.б.н., руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971; e-mail: dan-chin@yandex.ru)

Хаснатинов Максим Анатольевич — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Арбатская Елена Валентиновна — научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Шобоева Римма Сократовна — начальник отдела Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия (670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 45)

Ханхареев Сергей Степанович — и.о. руководителя Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия, (670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 45)

Даваажав Абмэд — д.б.н., руководитель группы паразитологии Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

Жантсо Бата — д.б.н., заведующий отделом эпидемиологии Национального Центра по изучению инфекционных болезней, Улан-Батор, Монголия

Дамдиндорж Цэрэнноров — д.м.н., заместитель директора Национального Центра по изучению природно-очаговых инфекций, Улан-Батор, Монголия

Дашдаваа Отгонбаатар — д.м.н., Генеральный директор Национального Центра по изучению природно-очаговых инфекций, Улан-Батор, Монголия

Ю.П. Джигоев ¹, Г.В. Юринова ², Б.Г. Сухов ³, С.М. Попкова ¹, Т.В. Ганенко ³, Н.Н. Погодаева ³,
Д.К. Васильева ², Е.Б. Ракова ¹, Л.А. Сафронова ⁴, В.С. Подгорский ³, Б.А. Трофимов ³

ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ИХ НАНОБИОКОМПОЗИТЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ СИНБИОТИКИ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Иркутский государственный университет (Иркутск)

³ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)

⁴ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины (Киев)

Из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) выделены и охарактеризованы природные наноконкомпозиты гемицеллюлозы арабиногалактана и флавоноидов. Синтезированы и охарактеризованы также нитро- и сульфозиферы арабиногалактана и кальциевая соль сульфозиферов арабиногалактана. Тестовыми исследованиями со штаммом *Bifidobacterium bifidum* показано, что все полученные водорастворимые производные бета-гемицеллюлозы арабиногалактана являются перспективными комплексными пребиотиками (за исключением нитрозиферов арабиногалактана).

Ключевые слова: бета-полисахариды, арабиногалактан, пребиотики, пробиотики, нанобиоконкомпозиты, синбиотик

HEMITSELYULOZA AND THEIR NANOBIOCOMPOSITES – PERSPECTIVE NANOSTRUCTURED SINBIOTICS

Yu.P. Dzhigoev ¹, G.V. Yurina ², B.G. Sukhov ³, S.M. Popkova ¹, T.V. Ganenko ³,
N.N. Pogodaeva ³, D.K. Vasiljeva ², E.B. Rakova ¹, L.A. Safronova ⁴, V.S. Podgorskij ³,
B.A. Trofimov ³

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

³ Institute of Chemistry of A.E. Favorskii SB RAS, Irkutsk

⁴ Institute of Microbiology and Virology of D.K. Zabolotny of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

Natural nanocomposites hemicellulose arabinogalactan and flavonoids isolated (from Siberian larch) and characterized. Additionally nitro- and sulfo-esters of arabinogalactan and its calcium salt are synthesized and characterized. All of the derivatives of the beta-hemicellulose arabinogalactan are water-soluble and are promising prebiotics on the example test-strain *Bifidobacterium bifidum* (except for the nitrate esters of arabinogalactan).

Key words: beta-polysaccharides, arabinogalactan, prebiotics, nanobiocomposites, sinbiotic

Арабиногалактан является природным полисахаридом, выделяется промышленно из лиственницы сибирской (*Larix sibirica*) и является продуктом с высоким пребиотическим потенциалом (не разрушается в желудке человека и животных, однако, легко расщепляется ферментами пробиотических микроорганизмов и усваивается ими в кишечном тракте), являясь как субстратом, так и наноконтейнером для многих биологических объектов [5, 10, 13]. Установлено, что выделяемый из древесины лиственницы по щадящей технологии арабиногалактан-сырец представляет собой нативные нанобиоконъюгаты группы флавоноидов и арабиногалактана. Флавоноиды содержатся в количестве приблизительно 3 %, и в основном представлены дигидрокверцетином, а также аромандендрином и минорным в этой группе кверцетином [10]. Нанобиоконъюгаты флавоноидов и арабиногалактана наследуют наноморфологию самого арабиногалактана (сфероиды со средним гидродинамическим диаметром 200 нм), хорошо растворимы в воде (в отличие от практически нерастворимых в воде свободных чистых флавоноидов) и в самых разных средах (включая воду)

проявляют высокоэффективные антирадикальные свойства (установлено на липофильной ДФПГ [дифенилпикригидразидной], а также гидрофильной АБТС [азинобензотиазолинсульфокислотной] моделях) [10].

Этот полисахарид представляет интерес для создания на его основе комплексных синбиотиков, несущих в своем составе максимальное сбалансированное количество необходимых для пробиотических микроорганизмов макро- и микроэлементов, а также других необходимых органических веществ, как химически конъюгированных с макромолекулами арабиногалактана, так и находящихся в этих макромолекулах в виде супрамолекулярных нанобиоконкомпозитов [7–9, 14]. Благодаря своим универсальным свойствам он успешно применяется в пищевой, фармакологической, косметологической, сельскохозяйственной промышленности. Использование арабиногалактана в сочетании с бактериями рода *Bifidobacterium* является одним из наиболее успешных синбиотических продуктов, представленных сегодня на рынке. Синбиотический комплекс в составе арабиногалактана и бифидобактерий хорошо за-

рекомендовали себя как в качестве биологических активных добавок (БАД), так и функциональных продуктов корреляции и модуляции многих жизненно важных процессов в организме человека и животных [1–3, 7–10, 13].

Исходя из этого, **целью** данной работы было проведение лабораторно-экспериментальных исследований по изучению метаболических свойств видов бифидобактерий при совместном культивировании с наноструктурированными производными арабиногалактана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве пробиотического препарата в одном случае использовали сухой коммерческий антагонистически активный штамм бифидобактерий — *B. bifidum* № 1, при концентрации 5×10^8 КОЕ/мл (бифидумбактерин) (ЗАО «ПАРТНЕР» Москва) в сочетании с моногидратом лактозы — до средней массы 0,85 г. Другой пробиотик, бифидум (№ 791 БАГ) жидкой консистенции состоял из двух видов — *B. bifidum*, *B. longum* в сочетании с обезжиренным молоком, автолизатом дрожжей и гидролизатом молочного белка, содержащим не менее 1×10^{10} КОЕ/мл.

Полисахарид арабиногалактан использовали разной степени очистки (очищенный и неочищенный с примесями флавоноидов), в комплексе с элементами S (серы) и Ca (кальция), NO_2 (молекулярная масса 12 кДа.)

Среды для выращивания бифидобактерий готовили на основе тиогликолевой, в которой в результате автоклавирования при 2 атм. разрушали углеводы, таким образом получая голодную тиогликолевую среду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тестовыми исследованиями со штаммом *Bifidobacterium bifidum* показано, что эти нанобиокомпозиции флавоноидов и арабиногалактана, а также специально очищенный арабиногалактан (без флавоноидов) могут быть единственными источниками углерода для пробиотических микроорганизмов. При использовании совместно с альтернативным источником углерода, глюкозой, арабиногалактан и его нанобиокомпозиции с флавоноидами ингибируют микробную утилизацию глюкозы, однако не влияют на общие физиологические метаболические процессы микробов.

В различных этерифицирующих системах проведено нитрование и сульфирование арабиногалактана лиственницы сибирской с получением его соответствующих эфиров различной степени этерификации. Из кислых сульфатов арабиногалактана получена также их кальциевая соль. Тестовыми исследованиями со штаммом *Bifidobacterium bifidum* также показано, что сульфозефир арабиногалактана и их кальциевая соль являются эффективными пребиотиками. Напротив, водорастворимые нитрозефир (с умеренной степенью этерификации), несмотря на содержание в них азота, отрицательно влияют на рост и метаболизм

бифидобактерий. Особенности взаимодействия пробиотических микроорганизмов и новых производных арабиногалактана детализируются.

Таким образом, предварительные результаты проведенных исследований по совместному культивированию арабиногалактана с бифидобактериями позволяют предполагать реальную возможность применения нанобиокомпозитного комплекса (арабиногалактан и его биокомпозиции с пробиотическим микроорганизмом) в качестве синбиотического продукта. Значение результатов по исследуемой тематике позволит выйти на новый современный уровень, где происходит смена парадигм в медицине и фармакологии — акцент на персонифицированную медицину и замена многих лекарственных препаратов — антибиотиков на продукты функционального питания. Поэтому, создание новых синбиотиков на основе гемецеллюлозных соединений и их производных с элементами биогенных металлов в сочетании с пробиотическими компонентами с заложенными свойствами биологического и генетического модулирования процессов как межмикробного взаимодействия, так и процессов взаимоотношения между микро и макроорганизмом является новым этапом для разработок функциональных препаратов целевого и индивидуального действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке международного гранта РФФИ — Украина за 2012 г. (грант 12-03-90433-Укр_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Arunachalam K.D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology // *Nutrit. Res.* — 1999. — Vol. 19, N 10. — P. 1559–1597.
2. Binder H.J., Mehta P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon // *Gastroenterology.* — 1989. — Vol. 96. — P. 989–996.
3. Robinson R.R., Causey J., Slavin J.L. Nutritional benefits of larch arabinogalactan // *Advanced Dietary Fiber Technology* / Ed. McCleary B.V., Prosky L. — Blackwell Science Ltd.: Oxford, UK, 2001. — P. 443–451.
4. Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B — arabinogalactan conjugates / T. Ehrenfreund-Kleinman [et al.] // *Biomaterials.* — 2002. — Vol. 23, N 5. — P. 1327–1335.
5. Арабиногалактан — перспективная наноструктурированная трансмембранная матрица для иммобилизации лекарственных средств / Б.Г. Сухов [и др.] // *Химический журнал Казахстана.* — 2007. — Вып. 7. — С. 125.
6. Арабиногалактан лиственницы — перспективная полимерная матрица для биогенных металлов / С.А. Медведева [и др.] // *Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения.* — 2002. — № 7. — С. 45–50.
7. Беловеж М.Ф., Ермакова А.К., Чистякова Л.В. Влияние арабиногалактана, выделенного из древесины лиственницы сибирской, на хлебопекарные достоинства муки мягкой пшеницы и качество

хлеба // Химия Растительного сырья. — 2009. — № 1. — С. 161 — 166.

8. Бондаренко В.М. Молекулярно — генетические и молекулярно-биологические исследования представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* // Вестник РАМН. — 2006. — № 1. — С. 21 — 27.

9. Вахитов Т.Я., Петров Л.Н., Бондаренко В.М. Концепция пробиотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты // Журн. микробиол. — 2005. — № 5. — С. 108 — 114.

10. Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Арабиногалактан лиственницы — свойства и перспективы использования (обзор) // Химия растительного сырья. — 2003. — № 1. — С. 27 — 37.

11. Медведева С.А., Александрова Г.П., Грищенко Л.А. Арабиногалактан лиственницы, перспективная полимерная матрица лекарственных средств // II Всерос. конф. Химия и технология рас-

тительных веществ. Казань, 24 — 27 июня 2002 г. — Казань, 2002. — С. 101 — 102.

12. Полисахарид арабиногалактан как перспективная матрица для иммобилизации лекарственных средств / Б.Г. Сухов [и др.] // Химия и медицина: тез. докл. VI Всерос. научн. семинара. Уфа, 2007. — С. 95 — 96.

13. Селезнева Н.В., Сергеев А.С., Гребенщиков А.В. Синбиотики — как функциональный компонент питания человека // Современные наукоемкие технологии. — 2009. — № 4. — С. 67 — 68.

14. Средство, обладающее антимикробной активностью / Г.П. Александрова [и др.] // Патент РФ № 2278969. — 2006.

15. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г. Наноккомпозиты медицинского назначения на основе природных полимеров // В кн.: «Наука и нанотехнологии». Материалы научной сессии Президиума СО РАН. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2007. — С. 155.

Сведения об авторах

Джигоев Юрий Павлович — к.б.н., старший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Юринова Галина Валерьевна — к.б.н., доцент кафедры физико-химической биологии ФГБУ ВПО ИГУ

Сухов Борис Геннадьевич — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Попкова София Марковна — д.б.н., зав. лабораторией микрорэкологии Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Ганенко Татьяна Васильевна — кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (г. Иркутск, ул. Фаворского, 1)

Погодаева Наталья Николаевна — кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Васильева Дарья Константиновна — студентка биолого-почвенного факультета ФГБУ ВПО ИГУ

Ракова Елена Борисовна — к.б.н., научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Сафронова Лариса Анатольевна — к.б.н., старший научный сотрудник отдела инноваций и трансферных технологий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

Подгорский Валентин Степанович — академик НАН Украины, директор Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

Трофимов Борис Александрович — доктор химических наук, профессор, академик РАН, директор Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Ю.П. Джиоев¹, А.О. Ревизор², В.М. Яхненко³, И.В. Козлова^{1,2}, Е.К. Дорощенко¹, О.В. Лисак¹,
О.В. Сунцова¹, О.О. Черноиванова¹, А.И. Парамонов¹

ИЗОФЕРМЕНТНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE (ACARI: IXODIDAE) В РЕКРЕАЦИОННЫХ ЗОНАХ г. ИРКУТСКА

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

³ Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

На двух выборках клещей из рекреационных зон пригородных районов г. Иркутск показана аллозимная структура популяции клещей *Ixodes persulcatus* по 8 ферментным системам. Из 13 локусов, которые кодируют эти ферменты, 8 оказались полиморфными. На основе аллозимного анализа популяции клещей выявлена большая их внутривидовая гетерогенность и отсутствие различий между двумя популяциями из разных очагов. Подобная картина свидетельствует о возможно большой скорости миграции генов между популяциями и о их близком родстве.

Ключевые слова: рекреационная зона, клещи, ферментные системы, полиморфизм

IZOENZYME STRUCTURE OF POPULATIONS OF TICKS *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE (ACARI: IXODIDAE) IN RECREATION AREAS OF IRKUTSK CITY

Yu.P. Dzhioyev¹, A.O. Revizor², V.M. Yahnenko³, I.V. Kozlova^{1,2}, E.K. Doroshchenko¹,
O.V. Lisak¹, O.V. Suntsova¹, O.O. Chernovanova¹, A.I. Paramonov¹

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

³ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

Allozyme structure of the population of ticks *Ixodes persulcatus* in 8 enzyme systems is shown in two samples of ticks from the recreational areas in suburbs of Irkutsk. From the total of 13 loci, which encode these enzymes, eight were polymorphic. Based on allozyme analysis of populations of mites, it is found that most of them show intrapopulation heterogeneity and the lack of difference between the two populations from different foci. A similar pattern may indicate a large rate of migration of genes between populations and their close relatives.

Key words: recreation area, ticks, enzyme systems, polymorphism

Природная среда территории любого большого города и его рекреационных зон всегда являются объектом сильнейшего антропогенного пресса с неизбежным ее загрязнением. Любые сложные природные системы, в том числе и паразитарные, замыкающиеся на человека, не могут не реагировать на изменение среды, переходя на иной уровень функционирования. Не являются исключением природные очаги инфекций, передаваемых кровососущими клещами [1]. В пригородных районах г. Иркутска, в его рекреационных зонах существуют очаги смешанных клещевых инфекций, таких, как клещевой энцефалит, клещевые боррелиозы, риккетсиозы и эрлихиозы.

Степень специфичности отношений между кровососущими клещами и возбудителями болезней определяется рядом факторов, в том числе биохимическими особенностями клещей. Эта проблема приобретает особое значение при изучении взаимоотношений между членистоногими и возбудителями болезней [7, 8]. Действие патогенов на их хозяев-переносчиков — весьма важный компонент существования сложных паразитарных систем. Действие различных паразитов меняет исходные реакции беспозвоночного хозяина-переносчика на факторы внешней среды [7, 11]. Изучение генетического состава популяций клещей (по ферменту

малатдегидрогеназа) на протяжении их ареала выявило изменение соотношения гомозиготной и гетерозиготной их составляющей. Эти изменения оказалось возможным связать с разной встречаемостью морфологически измененных клещей и предположить наличие связи этого феномена с разной встречаемостью генетически различающихся доминирующих штаммов вируса клещевого энцефалита.

По результатам изоферментного анализа ADH, GPI, MDH установлено фенотипическое проявление генетической гетерогенности клещевой популяции, что проявляется в различии их локомоторной активности и устойчивости к высушиванию [9]. Однако никакой корреляции между физиологическим возрастом и генотипами клещей обнаружено не было. Были выявлены достоверные изменения частот генотипов α-GPDH в течение суток. Подобный факт имеет немаловажное значение, так как преимагинальные фазы клещей имеют возможность присасываться к прокормителям в разное время суток, а сами хозяева различаются по своей суточной активности. Как хорошо известно, хозяева клещей (в основном мелкие грызуны) являются основным резервуаром вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) [2–4]. Выявлена связь генотипов и интенсивности заражения боррелиями

[10], географическая изменчивость генотипов MDH и субтипов ВКЭ [5].

Не исключено, что изменение доминирования разных штаммов вируса (различающихся по тяжести вызываемых ими заболеваний) окажется связанным с антропогенным влиянием, меняющим физиологию переносчиков. Можно полагать, что изучение белкового состава клещей позволит ближе подойти к изучению проблемы взаимоотношений между переносчиками и возбудителями [9, 12].

В этой связи, мы полагаем, что ведущую роль приобретают исследования в области генотипирования клещей. Генотипирование таежных и лесных клещей по структуре ДНК находится на стадии накопления расшифрованных данных и не позволяет судить об основах разнообразия даже крупных популяционных блоков этих видов, в то время как изучение методом изоферментного анализа популяционной гетерогенности стало общепризнанным инструментом популяционной генетики и молекулярной биологии [5, 16, 20].

Целью данной работы являлась оценка изоферментного полиморфизма в популяциях клещей *I. persulcatus* из природных очагов пригородных рекреационных зон г. Иркутска

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Популяции клещей *I. persulcatus* были собраны в 2006 и 2008 годах в лесных массивах вдоль Байкальского и Голоустнинского трактов г. Иркутска. Всего исследовано 135 клещей, из них 127 собраны на Байкальском, 8 — на Голоустнинском трактах. Сбор производился на флаг в период со второй декады мая по первую декаду июня в первой половине дня. Для анализа были отобраны только взрослые особи как женского (88 клещей), так и мужского (47 клещей) пола. Клещи транспортировались до лаборатории в увлажненной марле, затем были заморожены в пластиковых пробирках в морозильной камере при температуре -18°C .

Все особи были гомогенизированы в чашках Петри в 0,05 М Трис-НСl буфере (pH 7,2) с добавлением 1 % Тритон X100, 40 % сахарозы и -меркаптоэтанола [21], центрифугировали 30 мин при 10000 об/мин для удаления нерастворимого материала. Электрофоретический анализ полученных супернатантов проведен в вертикальных блоках полиакриламидного геля по стандартным методам [14, 21]. Для разделения белков использовали две электродные буферные системы: трис-глициновую (А) и трис-ЭДТА-боратную (Б). Исследовано 8 ферментных систем (табл. 1). Для обозначения локусов использованы рекомендации Шаке и др. [23].

Выбор модели наследования для изолюкусной пары MDH-1,2, проведен с использованием метода максимального правдоподобия [24]. Анализ аллозимной изменчивости, тест на гомогенность аллельных частот между выборками осуществлялись с помощью программы BIOSYS-2 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было исследовано 8 ферментных систем, кодируемых 13 локусами, из которых 8 были полиморфными (табл. 1). Фенотипическое проявление исследованных локусов соответствует ранее описанному для близкородственных видов гомологичным локусам с соответствующим генетическим контролем [5, 6, 10, 18, 20]. Локусы СК, LDH, EST-1, СА-2, СА-3 были мономорфными (табл. 1). Характер распределения фенотипов по изолюкусам MDH-1,2 позволил принять модель двух полиморфных локусов с равными частотами соответствующих аллелей. Распределение фенотипов по всем изолюкусам во всех исследованных выборках соответствовали соотношению Харди-Вайнберга. Выявлены высокий уровень изменчивости по всем полиморфным локусам, средняя гетерозиготность и уровень полиморфизма (табл. 1).

Анализ частот аллелей по локусу СА-1* с помощью теста на гомогенность не выявил достоверных различий между выборками Байкальского и Голоустнинского трактов. При совместных разгонках локусы фермента карбоангидразы у самок не обнаружены. По аллозимной изменчивости не выявлены наличия фиксированных альтернативных аллелей у исследованных клещей. Исследованные выборки были равновесны по всем локусам. Данные аллозимного анализа показали высокую гетерогенность выборок клещей, отобранных в одном месте, и отсутствие различий между выборками из разных географических точек.

Впервые к проблеме генетического полиморфизма клещевой популяции на примере *Ixodes ricinus* (L.) обратился J.A. Nealy [17, 18]. На основании анализа полиморфного локуса α -GPDH автор делает вывод о высокой гетерогенности изученных выборок клещей. Заключение о гетерогенности популяций *I. ricinus* по локусу MDH было сделано Р.М. Jensen [21]. Использование этого фермента в качестве маркера генетической гетерогенности известно у млекопитающих и у насекомых [13]. А.В. Семенов и др. [10] впервые по ферменту MDH проанализировали гетерогенность аллопатрической популяции клещей *Ixodes persulcatus* Schulze из окрестностей С-Петербурга. Было выявлено 3 различных локуса, различающихся по частоте встречаемости генотипов. Анализ 9 популяций *Amblyomma americanum* (L.) (семейство Ixodidae) юго-востока США по 14 ферментам показал отсутствие географической структурированности вида, что говорит о его генетической гомогенности. Отмечен низкий уровень гетерозиготности популяций этого вида (Hilburn [19]).

Поскольку в настоящей работе межпопуляционные сравнения проводились только по одному локусу, на небольшом количестве особей, то вывод об отсутствии обмена генами, и, следовательно, различий между изученными выборками — предварительный. Кроме того, для адекватной оценки белкового полиморфизма, уровня гетерогенности, генетической изменчивости выборок клещей не-

Таблица

Распределение фенотипов, частоты аллелей, проверка на гомогенность, средняя гетерозиготность в выборках *Ixodes persulcatus* Schulze

Выборка	Фенотип					n	Частоты аллелей		χ^2_1
АН									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♂	9	10	0	19		0, 77	0, 23	3, 04	
DP									
	100/100	100/80	80/80			q100	q80		
БТ, 47 км, 2006. ♀	7	3	0	10		0, 85	0,15	0, 27	
CA-1									
	100/100	100/105	105/105			q100	q105		
БТ, 47 км, 2006. ♂	10	10	0	20		0, 75	0, 25	2, 22	
ГТ, 33 км, 2008. ♂ $\chi^2_2 = 1, 344$	6	2	0	8		0, 88	0, 12	0, 22	
MDH-1, 2									
	100 ⁴	100 ³ /80	100 ² /80 ²	100/80 ³	80 ⁴		q100	q80	
БТ, 47 км, 2006. ♀	1	1	1	1	0	4	0, 63	0, 37	3, 98
SOD-1									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	12	18	0	30		0, 7	0, 3	5, 50	
SOD-2									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	13	17	0	30		0, 76	0, 24	6, 21*	
EST-1									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	7	7	0	14		0, 75	0, 25	1, 55	
F = 0, 6150 Hср. = 0, 2366									

Примечание: χ^2_1 – тест соответствия фактического и теоретически ожидаемого распределения генотипов по закону Харди-Вайнберга. χ^2_2 – тест на гомогенность. БТ – Байкальский тракт, ГТ – Голоустинский тракт. F – уровень полиморфных локусов. Hср. – средняя гетерозиготность. * – $p < 0,05$ – достоверность различий.

обходимо расширение анализируемого набора белков с привлечением большого числа неферментных локусов.

Исследования по изучению гетерогенности аллозимной структуры клещей из рекреационных зон г. Иркутска продолжают. Более достоверная картина паразитарной инфраструктуры в очагах интенсивного антропогенного воздействия возможна при наличии информации о взаимоотношениях компонентов экосистемы природных очагов инфекции при больших выборках из разных очагов и подборе аллозимных систем диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Семенов А.В. Смешанные инфекции в клещах-переносчиках рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae) правило, а не исключение // Клещевые и паразитарные болезни: матер. круглого стола в рамках Всеросс. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии». 17–18 октября 2001 г., Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2001. – С. 9–16.

2. Алексеев А.Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между иксодовыми клещами, совместно питающимися на животном с подпороговым уровнем вирусемии // Мед. паразитол. – 1990. – № 2. – С. 48–50.

3. Алексеев А. Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между питающимися клещами при отсутствии вирусемии у позвоночного хозяина (дистантная передача) // Мед. паразитол. – 1991. – № 2. – С. 50–54.

4. Алексеев А.Н. Экспериментальные доказательства обмена вирусом клещевого энцефалита через слюну иксодид (транспитальный путь передачи). // IV Всес. совещ. по пробл. теоретич. и приклад. акарол.: тез. докл. – Ашхабад, 1990. – С. 8–9.

5. Гетерогенность популяций клещей иксодид – основа разнообразия генотипов вируса клещевого энцефалита Сибири и Дальнего Востока / А.Н. Алексеев [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 3. – С. 69–73.

6. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин [и др.]. – М.: Наука, 1977.

7. Частота аномалий экзоскелета у самок таежного клеща в популяциях из пригородов Иркутска и Братска / А.Я. Никитин [и др.] // Известия ИГУ. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 95—98.
8. Подборнов В.М. Возбудители болезней человека, животных и клещи. — М.: Наука, 2004.
9. Подборнов В.М., Смирнова И.П., Гришин В.П. Биохимическая характеристика организмов клещей семейств Argasidae и Ixodidae // Мед. паразитол. — 2007. — № 1. — С. 38—40.
10. А.В. Семенов Выявление генотипической неоднородности популяции *Ixodes persulcatus Schulze* (Acari: Ixodidae) Северо-запада России и особенности распределения клещевых патогенов возбудителей болезни Лайма и эрлихиозов в различных генотипах // Мед. паразит. — 2001. — № 3. — С. 11—15.
11. Alekseev A.N., Dubinina H.V. Abiotic parameters and diel and seasonal activity of *Borrelia*-infected and uninfected *Ixodes persulcatus* (Acarina, Ixodidae) // J. Med. Entomol. — 2000. — Vol. 37, N 1. — P. 9—15.
12. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Chirov P.A. Tick morphology, tick microbiocenosis, and the ability to accumulate tick-borne pathogenesis as a result of anthropogenic pressure? // Inter. Jour. Med. Microbiol. — 2006. — Vol. 296. — S1. — P. 169—171.
13. Genetic variation in natural population of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms / F.I. Ayala [et al.] // Genetics. — 1974. — Vol. 77. — P. 343—384.
14. Black W.C. BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics // Dept. Microbiol. Colorado State Univ. Fort Collins Colorado, 1997.
15. Davis B.J. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to the human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.
16. Harris H. The principles of human biochemical genetics // 2nd Ed. North Holland. — 1975. — P. 402.
17. Healy J.A. Analysis of α -glycerophosphate dehydrogenase variability in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) // Genetic. — 1979. — Vol. 1. — P. 19—30.
18. Healy J.A. E., Cross T. F., Healy A. The α -GPDH polymorphism in the tick *Ixodes ricinus*: similar diurnal trends in genotypic composition in Irish and Swedish population samples // Experiment. and Appl. Acarology. — 2004. — Vol. 32. — P. 111—118.
19. Hilburn L.R., Sattler P.W. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) // Heredity. — 1986. — Vol. 56. — P. 67—74.
20. Hopkinson D.A. Recent work on isoenzymes in man // Ann. Rev. Genet. — 1971. — Vol. 5. — P. 5—16.
21. Jensen P.M., Kaufmann U., Smirnova L. Diurnal activity of *Ixodes ricinus* in Denmark: Aspects of physiological age and genotypic variation // Heredity. — 1999. — Vol. 130. — P. 325—330.
22. Peacock A.C., Bunting S.L., Queen K.G. Serum protein electrophoresis in acrylamide gel: patterns from normal human subjects // Science. — 1965. — Vol. 147. — P. 1451—1452.
23. Gene nomenclature for protein coding loci in fish / J.B. Shaklee [et al.] // Trans. Amer. Fish. Soc. — 1990. — Vol. 119. — P. 2—15.
24. Waples R.S. Estimation of Allele Frequencies at Isoloci // Genetics. — 1988. — Vol. 118. — P. 371—384.

Сведения об авторах

Джигоев Юрий Павлович — к.б.н., старший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; e-mail: alanir07@mail.ru)

Ревизор Александр Олегович — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИГМУ (г. Иркутск, ул. Красного восстания, 1)

Яхненко Вера Михайловна — к.б.н., научный сотрудник, Лимнологический институт СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3., Лимнологический институт СО РАН)

Козлова Ирина Валерьевна — д.м.н., зав. лаборатории молекулярной эпидемиологии и генодиагностики Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Дорощенко Елена Константиновна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Лисак Оксана Васильевна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Сунцова Ольга Владимировна — к.б.н., научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Черноиванова Ольга Олеговна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Парамонов Алексей Игоревич — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; e-mail: Paramonov_a.i@mail.ru)

В.В. Долгих, Л.В. Рычкова, В.М. Поляков, О.В. Бугун, А.Н. Родионова, А.В. Давыдов

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОДАРЕННЫХ ШКОЛЬНИКОВ

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Обследовано 112 подростков в возрасте 14–17 лет. Данная когорта детей была разделена на 3 группы: одаренные реализовавшиеся, одаренные не реализовавшиеся и средние интеллектуалы. Особенности течения перинатального периода влияют на формирование психосоматических расстройств у одаренных школьников. Такие перинатальные факторы, как возраст матерей на момент беременности до 30 лет, особенности течения беременности и развитие ребенка до 1 года выявлены у школьников с психосоматическими расстройствами.

Ключевые слова: одаренность, психосоматические расстройства, школьники, перинатальные факторы

SOME ASPECTS OF THE HEALTH STATUS OF GIFTED SCHOOL CHILDREN

V.V. Dolgikh, L.V. Rychkova, V.M. Polyakov, O.V. Bugun, A.N. Rodionova, A.V. Davidov

Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

We surveyed 112 adolescents aged 14–17 years. This cohort of children was divided into 3 groups: gifted realized, unrealized and secondary gifted intellectuals. The perinatal course peculiarities influence to development of psychosomatic disorders in gifted students. Perinatal factors such as age of mothers less 30 years, eventfulness of pregnancy and deviations in child development up to 1 year were found in the students with psychosomatic disorders.

Key words: giftedness, psychosomatic disorder, school, perinatal factors

ВВЕДЕНИЕ

Проблема одаренности в настоящее время приобрела статус государственной важной в большинстве стран, что привело к формированию социального запроса на ее исследование [2].

В настоящее время трудов о психологических и педагогических аспектах формирования и развития одаренности, как за рубежом, так и у отечественных авторов достаточно, но работ по анализу одаренности с медицинской точки зрения практически нет. Доказано, что особенности течения ante-, intra- и постнатальных периодов оказывают важнейшее влияние на дальнейшее развитие ребенка, как в соматическом, так и психологическом плане [1, 3, 4]. Поэтому целью нашего исследования стал анализ особенностей течения этих периодов, которые влияют на формирование психосоматических расстройств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было обследовано 112 подростков в возрасте от 14 до 17 лет, обучающихся в лицеях г. Иркутска, с помощью многоэтапного психологического обследования данная когорта детей была разделена на 3 группы: 1-я — одаренные реализовавшиеся 32 школьника (дети, которые смогли раскрыть и реализовать свой потенциал и имеют реальные достижения), 2-я группа — одаренные не реализовавшиеся 40 школьников (дети, которые не смогли по какой-либо причине реализовать свой потенциал) и 3-я группа 40 школьников — средние интеллектуалы (группа контроля).

Для анализа течения перинатальных факторов обследования лицестов нами были использованы такие методы исследования, как клинико-анамnestические, клинико-генеалогические, анкетирование.

Достоверность полученных результатов обеспечивалась математическими методами статистической обработки с применением сравнительного анализа по t-критерию Стьюдента и программой Statistica 6.0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам комплексного обследования и тестирования обследуемых подростков, в первую группу вошли: 19 девушек (59,4 %) и 13 юношей (40,6 %), во второй группе — 25 (62,5 %) девушек и 15 (37,5 %) юношей и в контрольной группе — 21 (52,5 %) и 19 (47,5 %) девушек и юношей соответственно. Исходя из этого видно, что среди обследуемых детей больший удельный вес занимают девушки.

Анализ антенатального периода. В большинстве случаев, в группе обследуемых детей, средний возраст матери на момент беременности составил $25,6 \pm 2,02$ лет. В группах № 1 и 2 в 78,1 % случаев (25 жен.) и 76,9 % (30 жен.) соответственно, беременность приходилась на возраст до 30 лет, в контрольной же группе этот показатель гораздо ниже (табл. 1).

Таблица 1
Возрастная структура матерей обследуемых детей на момент беременности

Наименование группы	До 30 лет		Старше 30 лет	
	%	абс.	%	абс.
Одаренные реализовавшиеся	78,1	25	21,9	7
Одаренные не реализовавшиеся	76,9	30	23,1	9
Контроль	52,5	21	47,5	19

Нами выявлено, что в 10,7 % случаев на организм беременных женщин было оказано воздей-

ствие профессиональных вредностей, таких, как рентген, ультразвук, компьютерное излучение и работа в биохимической лаборатории, с явным преобладанием в группе «одаренных». Кроме того, у матерей на момент беременности были выявлены хронические заболевания, с явным преобладанием в группе в группе одаренных реализованных (табл. 2).

Из рисунка 1 видно, что особенности течения настоящей беременности разнообразны. При сравнении трех групп видно, что более высокий процент течения беременности без особенностей диагностирован в контрольной группе, также чаще регистрировались случаи токсикоза первой и второй половин беременности. Наибольшее количество сочетаний патологических состояний, таких, как токсикоз и угроза прерывания беременности на протяжении всей беременности и артериальные дистонии выявлены в группе № 2 (одаренные не реализовавшиеся дети). В группе одаренных реализовавшихся подростков эти показатели в 1,5 – 2 раза ниже.

Анализируя интранатальный период, выявлено, что у матерей обследуемых детей из трех групп, в большинстве случаев роды наступили в срок 39 – 40 недель. Наибольшее количество случаев преждевременных родов отмечается в группе № 2 в 9,4 % случаев.

В группе одаренных реализовавшихся детей в 79 % случаев роды были самостоятельными, тогда

как оперативное родоразрешение преобладает в группе одаренных не реализовавшихся детей (21,0 %). В группе среднеинтеллектуалов роды протекали с сочетанием нескольких видов акушерских манипуляций, таких, как выдавливание, наложение щипцов, и со стимуляцией родовой деятельности в 15,0 % случаев.

Такие показатели, как внутриутробная гипоксия плода, в 9,4 % случаев встречается в группе одаренных реализовавшихся детей, тогда как рождение в асфиксии (7,5 % случаев), гипотрофия плода (2,5 %), родовая травма (5,0 %) и сочетание нескольких перечисленных патологических состояний (5,0 %) преобладают в группе среднеинтеллектуалов.

Анализ постнатального периода. Выявлено, 86 (76,8 %) случаев нормального течения периода новорожденности, однако в 4 раза данный показатель преобладает среди «одаренных» в сравнении с группой контроля.

При сравнении трех групп выявлено, что средняя масса тела ребенка при рождении в первой группе составила $3375,3 \pm 468,3$ г, в группе № 2 – $3278 \pm 451,7$ г и в группе среднеинтеллектуалов – $3320,0 \pm 571,5$ г, а средняя длина тела в этих группах составила $51,0 \pm 2,9$ см.

Особенностями развития обследуемых детей в возрасте до одного года является перенесенная перинатальная энцефалопатия, которая в 3,6 % случаев встречается у одаренных детей, независимо

Таблица 2
Частота встречаемости хронических заболеваний матерей обследуемых детей на момент беременности

	Группа № 1 (одаренные реализованные), %	Группа № 2 (одаренные не реализованные), %	Группа № 3 (контроль), %
Отсутствие хронических заболеваний	$59,40 \pm 4,64$	$79,70 \pm 3,80$	$72,50 \pm 4,21$
Хронический пиелонефрит	$6,30 \pm 2,30$	$5,10 \pm 2,08$	$7,50 \pm 2,49$
Хроническая ЛОР патология	$9,40 \pm 2,76$	$7,70 \pm 2,52$	$7,50 \pm 2,49$
Хронический гастрит	–	$2,50 \pm 1,48$	$2,50 \pm 1,48$
Другое	$12,50 \pm 3,12^*$	$2,50 \pm 1,48^*$	–
Сочетание хронической патологии	$12,50 \pm 3,12^*$	$2,50 \pm 1,48^*$	$10,00 \pm 2,83$

Примечание: * – статистически значимые различия при сравнении одаренных детей и группы контроля, при $p < 0,05$.

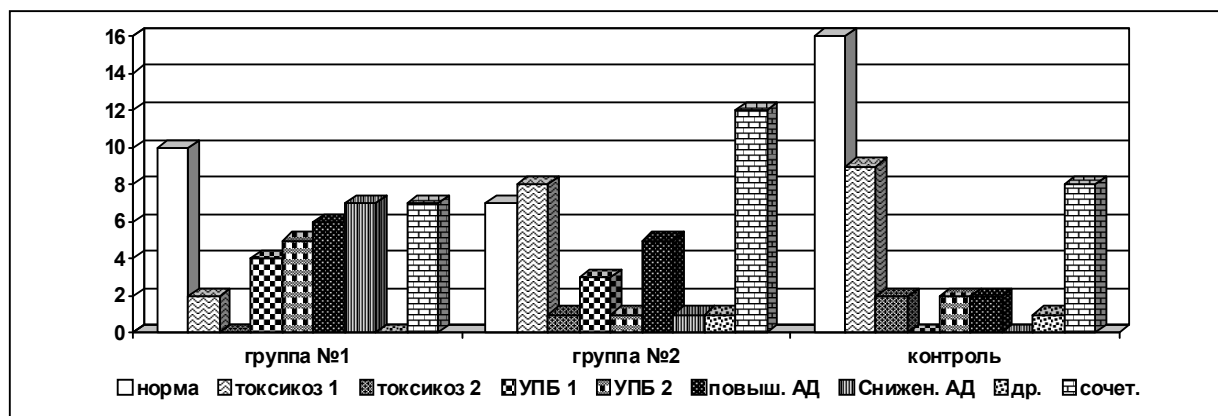


Рис. 1. Частота нормальной и осложненной беременности среди матерей обследуемых детей.

от реализации их интеллектуального потенциала, в большинстве случаев дети с таким диагнозом наблюдались у невролога и получали лечение. Отмечалась плохая прибавка в весе также в 3,6 % случаев от всех обследованных нами детей, в группах № 2 и 3, выявлено опережение в росте у детей из группы № 1.

ВЫВОДЫ

На основании проведенного исследования мы пришли к выводу, что на формирование психосоматических расстройств у интеллектуально одаренных подростков влияют особенности перинатальных факторов, таких как: возраст матери до 30 лет, неблагоприятное течение беременности (угроза прерывания беременности, токсикозы, наличие хронической патологии у матерей) и особенности развития до 1 года (перинатальная энцефалопатия, плохая прибавка в весе и опережение в росте).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.А., Сухарева Л.М. ??? // Вопросы современной педиатрии. — 2006. — Т. 5, № 5. — Прил. I: Школа и здоровье. — С. 14–20.
2. Реализация одаренности: медицинские аспекты исследования / В.В. Долгих [и др.] // Материалы шестой международной конференции, 12–13 сентября 2009. — Иркутск, 2009. — С. 307.
3. Состояние здоровья интеллектуально одаренных детей / В.В. Долгих [и др.] // Сб. материалов XIV конгресса педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии», 15–18 февраля 2010. — М., 2010. — С. 576.
4. Состояния здоровья и психофизиологические особенности учащихся новых видов учебных заведений / А.Г. Муталов [и др.] // Вопросы современной педиатрии. — 2007. — Т. 6, № 6. — С. 122–126.

Сведения об авторах

Долгих Владимир Валентинович – д.м.н., профессор, зам. директора ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН по науке (664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс 20-76-36; e-mail: zam_gunc@mail.ru)

Рычкова Любовь Владимировна – д.м.н., зав. лабораторией педиатрии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс 20-76-36)

Поляков Владимир Матвеевич – к.п.н., зав. кабинетом мед. психологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс 20-76-36)

Бугун Ольга Витальевна – д.м.н., зам. главного врача по организационно-методической работе ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс 20-76-36)

Родионова Александра Николаевна – аспирант ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664003, Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел./факс 20-76-36)

Давыдов Анатолий Владимирович – врач-педиатр высшей категории, президент Ассоциации врачей Шелеховского района

**И.М. Жулидов, М.В. Антонычева, О.А. Лобовикова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров,
И.В. Шулгина, Л.В. Зайцева, Н.П. Миронова, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева,
В.И. Павлова, В.С. Бронникова, О.А. Волох, Н.Г. Авдеева, Г.В. Базлов, А.В. Комиссаров**

НОВАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА ФИБРИНА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Представлены данные по исследованию биологических показателей экспериментальных плотных и жидких питательных сред на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина из отхода производства антирабического иммуноглобулина. Сконструированные питательные среды соответствуют требованиям нормативной документации и не уступают по качественным характеристикам контрольным. Предлагаемые среды могут быть использованы для культивирования холерных вибрионов, в том числе глубинного, при производстве холерных профилактических и диагностических препаратов.

Ключевые слова: фибрин, питательная среда, холерный вибрион

NEW NUTRIENT MEDIUM ON THE BASIS OF DRY FIBRIN HYDROLYSATE FOR V. CHOLERAE CULTIVATION

**I.M. Zhulidov, M.V. Antonycheva, O.A. Lobovikova, E.G. Abramova, A.K. Nikiforov,
I.V. Shulgina, L.V. Zaitseva, N.P. Mironova, N.I. Vakhrushina, S.V. Astafieva, V.I. Pavlova,
V.S. Bronnikova, O.A. Volokh, N.G. Avdeyeva, G.V. Bazlov, A.V. Komissarov**

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The data on exploration of biological properties of experimental solid and liquid media on the basis of dry enzymatic hydrolysate of fibrin obtained from production waste of anti-rabies immunoglobulin is presented here. The culture media engineered meets the requirements of normative documents and is highly competitive with the test medium in their qualitative characteristics. Suggested media can be used for V. cholerae cultivation, including submerged cultivation, in production of cholera preventive and diagnostic preparations.

Key words: fibrin, nutrient medium, V. cholerae

ВВЕДЕНИЕ

Создание эффективных противохолерных вакцин продолжает оставаться актуальной научной проблемой, в связи с этим выбор питательной среды (ПС) для глубинного культивирования холерных вибрионов является одним из важных факторов для решения данной биотехнологической задачи [4, 8].

Для глубинного культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* применяют ПС из дорогостоящего сырья на основе мяса крупного рогатого скота (КРС) и казеина. Однако практика показывает, что при использовании традиционных сред все чаще возникают серьезные затруднения, связанные с получением бактериальной массы, необходимой для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Не исключено, что проблемы, связанные с качеством ПС, обусловлены снижением качества сырья природного происхождения, в том числе в связи со сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду. В частности, в мясных и молочных продуктах могут содержаться антибиотики, химикаты, нитраты, токсические продукты, что отрицательно отражается на производственном процессе культивирования штаммов [1]. Вышеизложенное диктует необходимость конструирования ПС на основе непищевого, экономичного вида сырья [3, 5, 6].

В производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) при получении сыворотки из иммунной плазмы крови лошадей побочным продуктом является ценный белок — фибрин, который вполне может быть применен для изготовления питательных основ сред для культивирования микроорганизмов [2, 7].

Целью настоящей работы явилась оценка качества разработанной для культивирования холерного вибриона питательной среды на основе сухого гидролизата фибрина, полученного из отхода производства АИГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибрин отделяли на этапе дефибринации иммунной антирабической плазмы крови лошадей. Для получения ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ) использовали панкреатическую железу КРС (ГОСТ 112-85-93). Концентрирование жидкого гидролизата фибрина проводили на аппарате УВВ-50 с последующей сушкой на установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002.

Для приготовления экспериментальных ПС для культивирования холерных вибрионов использовали сухой ФГФ.

Для исследования биологических показателей экспериментальных ПС использовали полученные из Государственной коллекции патогенных бакте-

рий РосНИПЧИ «Микроб» тест-штамм *V. cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара серовара Огава и применяемые в производстве холерной вакцины штаммы: *V. cholerae* М-41 классического биовара серовара Огава, *V. cholerae* 569 В классического биовара серовара Инаба.

В качестве контрольных ПС использовали традиционно применяемые плотную среду по Хоттингеру и 1% пептонную воду, имеющие соответственную для культивирования холерного вибриона реакцию ($7,7 \pm 0,1$).

Определение физических свойств, химического состава и биологических показателей экспериментальной питательной основы и сконструированных сред проводили в соответствии с методиками, изложенными в МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Определяли цветность, прозрачность среды и биологические показатели качества ПС — чувствительность, скорость роста, показатель прорастания, стабильность морфологических, биохимических, фаголизабельных и серологических свойств штаммов холерного вибриона.

Для исследования биологических показателей плотных экспериментальных ПС готовили взвесь 3–5-часовой культуры тест-штамм *V. cholerae* O1 P-1 (145) по стандартному образцу мутности ОСО 42-08-86П ФГБУ «НЦ ЭСМП», эквивалентного $1,1 \times 10^9$ м.к./мл, и разводили до 10^{-6} (10^3 м.к./мл) и 10^{-7} (10^2 м.к./мл), высевая в объеме 0,1 мл на 3 свежеприготовленные агаровые пластинки в чашки Петри с испытуемыми и контрольной средами. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 12 ч. Плотные ПС считали пригодными, если на них вырастали типичные по морфологии колонии диаметром не менее 1 мм, в количестве не менее 30 % от расчетной посевной дозы 100 м.к., при наличии единичных колоний на 3 чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. Экспериментальные жидкие накопительные ПС считали пригодными, если после 6 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в контролируемой жидкой среде при пересеве на агаровые пластинки петлей № 5, число колоний культуры тест-штамма, выросших после накопления при посевном числе 100 м.к., составило не менее 10; при посевном числе 10 м.к. — не менее 1.

Расчет вели по среднему числу колоний на 3 чашках с одной посевной дозой.

Для контроля стабильности морфологических, биохимических, фаголизабельных свойств тест-штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145), после выращивания культуры на исследуемых плотных средах просматривали колонии на атипичность роста и отбирали по 3 колонии для посева на среды с углеводами (манноза, сахароза, арабиноза), ставили пробу с холерными бактериофагами классическим и эльтор методом стерильного пятна.

Для определения показателя эффективности плотных и жидких питательных сред на основе ФГФ использовали штаммы *V. cholerae* М-41 и *V. cholerae* 569 В. При контроле плотных ПС, разлитых в пробирки по 5 мл, посевная доза культуры тест-штамма составляла $5,5 \times 10^7$ м.к. Через 18 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С культуру смывали с поверхности агара 2,5 мл 0,9% раствором натрия хлорида. К 0,5 мл полученной взвеси мерно добавляли 0,9% раствор натрия хлорида до концентрации $1,1 \times 10^9$ м.к./мл, эквивалентной 5 единицам ОСО 42-28-86П, и рассчитывали выход биомассы с 1 мл среды.

При контроле эффективности жидких питательных сред посевная доза культуры тест-штамма составляла 10^5 м.к. и 10^6 м.к. После инкубации при температуре (37 ± 1) °С в течение 6 ч проводили инактивацию бульонной культуры при 56 °С в течение 30 мин и определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-56 против образца соответствующей среды при длине волны 590 нм в кювете 5 мм. Все замеры проводили в трехкратном повторе для каждой серии ПС.

Для малообъемного глубинного культивирования использовали колбу Эрленмейера и термостатируемый шейкер-инкубатор RC-ТК (США).

Продукцию антигенов холерных вибрионов выявляли в РДП. Для штамма *V. cholerae* 569 В продукцию холерного токсина (ХТ) кроме РДП оценивали в ИФА с GM1-ганглиозидами и анти-токсической холерной сывороткой.

Статистическую обработку результатов исследования физико-химического состава основ проводили с использованием программы «Statistica».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Фибрин является побочным продуктом переработки плазмы лошадей при производстве АИГ. По своей биологической структуре — полноценный и сбалансированный по аминокислотному составу глобулярный белок, аминокислотный состав которого близок к таковому миозина, что дает основание для использования данного отхода производства иммуноглобулина при изготовлении белкового гидролизата — основы для ПС [2, 7].

Методом ферментативного гидролиза, используя фарш поджелудочной железы КРС, был приготовлен гидролизат фибрина. По истечении времени созревания питательной основы (5–6 мес.) проводили ее концентрирование и высушивание. Подобранны экспериментальным путем условия концентрирования и высушивания гидролизата. Концентрирование в 4–5 раз, температура греющего пара (79 ± 1) °С, температура вторичного пара (59 ± 1) °С, вакуум ($0,75 \pm 0,1$) кгс/см². Конвекционное высушивание вели в псевдокипящем слое на установке КЯУЛ 101325.002 при следующих оптимальных значениях: размер фторопластовых частиц сушильной камеры ($0,4 \pm 0,1$) см³, температура на входе в камеру (123 ± 2) °С, температура на выходе из камеры (98 ± 2) °С, скорость расхода сырья по ротаметру (6 ± 1) л/ч, давление ($0,3 \pm 0,05$) кгс/см².

Были получены 3 экспериментальные серии сухого ФГФ, по агрегатному состоянию представляющего собой мелкодисперсный порошок с нежно-желтым оттенком и белковым запахом. Физико-химические характеристики сухого ФГФ: содержание общего азота — $(0,756 \pm 0,031) \%$; аминного азота — $(0,391 \pm 0,031) \%$; процент расщепления белка — $(50,7 \pm 1,68) \%$; содержание пептона (по шкале Дифко) — $(53,67 \pm 1,53) \%$; следы белка отсутствовали; сухой остаток — $(4,78 \pm 0,201) \%$; хлориды — $(0,22 \pm 0,012) \%$; влажность — $(2,4 \pm 0,204) \%$; рН — $(6,73 \pm 0,22)$.

На основе сухого ФГФ были сконструированы жидкие и плотные ПС для культивирования холерных вибрионов с рН $(7,7 \pm 0,1)$. Кроме этого, из ФГФ были изготовлены ПС с добавкой до 1% автолизата пекарских дрожжей (АПД).

Все среды были прозрачными. Жидкие среды имели нежный соломенно-желтый цвет.

На испытуемых и контрольной средах отмечали рост холерного вибриона из разведения 10^{-7} , обеспечивающего посевную дозу 10 м.к., что свидетельствует о высокой чувствительности плотных и жидких экспериментальных сред на основе сухого ФГФ.

Показатель прорастания для плотных сред на основе ФГФ составил 97 %; для сред на основе ФГФ с добавкой АПД — 89 %; для контрольной среды — 91 %.

При культивировании на плотных испытуемых средах тест-штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145), через 24 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ колонии были: гладкими, округлыми, прозрачными, голубоватыми в проходящем свете, диаметром 1,5 мм. Атипичные колонии на всех средах отсутствовали. На жидких средах через 18–24 ч роста при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ регистрировали равномерное помутнение среды и нежную пленку на поверхности. Во всех мазках при окраске по Граму — граммотрицательные изогнутые палочки.

При исследовании биохимических свойств холерного вибриона после культивирования на экспериментальных плотных и жидких ПС зарегистрированы типичные результаты, штамм ферментировал маннозу, сахарозу и не утилизировал арабинозу.

Изучение фаголизательности штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара,

инкубированного на экспериментальных средах на основе ФГФ, выявило лизис только гомологичным (классическим) фагом.

Полученные данные свидетельствуют о стабильности свойств холерного вибриона при выращивании на контролируемых плотных и жидких средах. Полученные результаты позволяют считать плотные и жидкие экспериментальные среды на основе сухого ФГФ удовлетворяющими требованиям НД.

Эффективность экспериментальных ПС была определена как по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды, так и по способности штамма холерных вибрионов продуцировать в процессе культивирования антигены (О-АГ и холерный токсин).

При определении показателя эффективности экспериментальных плотных ПС выход биомассы *V. cholerae* 569 В составил с ПС на основе ФГФ и с ПС на основе ФГФ с добавкой АПД по $9,24 \times 10^9$ м.к./мл; с контрольной среды — $11,44 \times 10^9$ м.к./мл. Выход биомассы *V. cholerae* М-41 составил: $10,1 \times 10^9$ м.к./мл с ПС на основе ФГФ; $11,66 \times 10^9$ м.к./мл с ПС на основе ФГФ с добавкой АПД; $13,36 \times 10^9$ м.к./мл — с контрольной среды.

Для экспериментальных жидких ПС на основе ФГФ зарегистрированы следующие показатели эффективности. При высеве культуры в количестве 10^5 м.к. и 10^6 м.к. на испытуемых средах на основе ФГФ и ФГФ с добавкой АПД выход биомассы для *V. cholerae* 569 В был одинаковым — $1,4 \times 10^9$ и $1,7 \times 10^9$ м.к./мл, соответственно; на контрольной среде соответственно — $1,3 \times 10^9$ и $2,0 \times 10^9$ м.к./мл. Для *V. cholerae* М-41 на среде из ФГФ и ФГФ с добавлением АПД соответственно — $1,5 \times 10^9$ и $1,7 \times 10^9$ м.к./мл и на контрольной среде этим показателям культуры штамма соответствовали значения накопленной биомассы — $2,2 \times 10^9$ и $2,5 \times 10^9$ м.к./мл. Добавление в рецептуру среды АПД до 1 % не оказало стимулирующего эффекта и показатели эффективности в этом случае соответствовали результатам, полученным со среды на монооснове ФГФ.

Для моделирования условий глубинного культивирования производственных штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41 при производстве холерной вакцины были проведены эксперименты по малообъемному глубинному выращиванию холерных вибрионов на экспериментальных и контрольной ПС. Результаты экспериментов представлены в

Таблица 1
Результаты малообъемного глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41

Жидкие среды	<i>V. cholerae</i> 569 В				<i>V. cholerae</i> М-41		
	Эффективность, м.к./мл	О-АГ (титр РДП)	ХТ		Эффективность, м.к./мл	О-АГ (титр РДП)	О-АГ* (титр РДП)
			титр РДП	ИФА, мкг/мл			
ФГФ	15×10^9	1/2	1/2	5,13	20×10^9	1/2	1/32
ФГФ с добавлением 1% АПД	20×10^9	1/2	1/2	5,28	16×10^9	1/2	1/16
Контроль, среда по Хоттингеру рН $(7,7 \pm 0,1)$	17×10^9	1/2	1/2	6,13	20×10^9	1/2	1/32

Примечание: * — концентрация О-АГ (титр РДП) в формализованном безмикробном цунтрифугате.

таблице 1 «Результаты малообъемного глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41 на экспериментальных средах на основе ФГФ».

При глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41 на экспериментальных и контрольной среде получены сопоставимые результаты как по способности накапливать биомассу, так и продуцировать АГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные образцы экспериментальных плотных и жидких питательных сред, приготовленных с использованием питательной основы «Ферментативный гидролизат фибрина, сухая форма» соответствуют требованиям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и вполне могут быть использованы для культивирования холерных вибрионов, в том числе глубинного.

Подтверждены данные об индивидуальной чувствительности штаммов к составу ПС и необходимости дифференциального выбора питательной среды в зависимости от поставленной перед микробиологом задачи по получению целевого продукта.

Применение гидролизата фибрина, полученного из отхода производства АИГ, в качестве основы ПС расширяет ассортиментный ряд ПС, экономически целесообразно и является примером снижения экологической нагрузки на окружающую среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2006. — 173 с.
2. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / М.В. Антонычева [и др.] // Патент № 2425866 РФ, МПК С12N1/20, С12R1/63; 10.08.2011, Бюл. № 22.
3. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций / А.А. Курилова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2009. — Вып. 3 (101). — С. 66–68.
4. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций / В.В. Кутырев [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2006. — Вып. 2 (92). — С. 18–24.
5. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств / С.Ю. Калягина // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 91–94.
6. Султанов З.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред : автореф. дисс. ... докт. биол. наук. — Махачкала, 2008. — 45 с.
7. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. — М.: Аграрная наука, 2000. — 296 с.
8. Kabir S. Cholera vaccines: the current status and problems // Rev. Med. Microbiol. — 2005. — Vol. 16. — P. 101–116.

Сведения об авторах

Жулидов Иван Михайлович — биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (e-mail: zhulidovim@yandex.ru)

Антонычева Марина Владимировна — к.м.н., зав. отделом питательных сред, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Лобовикова Оксана Владимировна — к.б.н., зав. ОБТК, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Абрамова Елена Геннадьевна — к.б.н., зав. лаб. профилактических иммуноглобулинов, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Никифоров Алексей Константинович — к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Шульгина Ирина Витальевна — к.м.н., зав. отделом стандартизации, качества и метрологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Зайцева Людмила Владимировна — врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Миронова Наталья Петровна — врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Вахрушина Наталья Ивановна — врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Астафьева Светлана Васильевна — биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Павлова Варвара Игоревна — н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Бронникова Валерия Сергеевна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Волох Оксана Александровна — к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной биотехнологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Авдеева Наталья Григорьевна — врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Базлов Григорий Васильевич — ведущий инженер, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Комиссаров Александр Владимирович — к.т.н., с.н.с., доцент, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

А.В. Зайковская, С.А. Леонов ¹, Ю.Г. Юшков ¹, **Ю.Н. Рассадкин**, А.М. Шестопапов

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТАЛЬНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И ЕСТЕСТВЕННОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВЫСОКОПАТОГЕННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА H5N1

Научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)

¹ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Краснообск, Новосибирская область)

В работе представлены описательные данные показателей летальности при экспериментальной и естественной инфекции разных видов домашней птицы. Показатели летальности при естественном инфицировании были определены в период эпизоотии гриппа в Новосибирской области в июле 2005 года на частных подворьях. Для экспериментального инфицирования домашних видов птиц (гусей, уток и кур 2 кроссов) был использован штамм вируса гриппа A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1).

Ключевые слова: вирус гриппа, экспериментальная инфекция, естественная инфекция, летальность

MORTALITY IN EXPERIMENTAL AND NATURAL INFECTION CAUSED BY HIGHLY PATHOGENIC INFLUENZA VIRUS H5N1

A.V. Zaykovskaya, S.A. Leonov ¹, Yu.G. Yushkov ¹, **Yu.N. Rassadkin**, A.M. Shestopalov

Scientific Centre of Virology and Biotechnology, Koltsovo

¹ Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East SB RAAS, Krasnoobsk

In this paper the data for mortality from experimental infections and natural contamination in different species of poultry is presented. Mortality of natural contamination was identified during the epizootic of influenza in the Novosibirsk area in July 2005. We infected domestic geese, ducks and two breeds of chickens with highly pathogenic influenza virus A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1) for the experiments constructed.

Key words: influenza A virus, experimental infection, natural contamination, mortality

В 2005 году в Новосибирской области, был зафиксирован падеж домашней птицы, который был вызван вирусом H5N1-субтипа. В кратчайшее время вирусы распространились по территории Западной Сибири, а в последствие — Центральных регионов и Юго-запада России. В результате эпизоотии гриппа погибло и было уничтожено более 1 млн. голов домашней птицы [3].

К вирусу птичьего гриппа чувствительны все виды птиц, млекопитающие, в том числе и люди. Из домашней птицы к вирусу птичьего гриппа наиболее восприимчивы куры и индейки, в меньшей степени, фазаны, перепелки, утки, гуси, цесарки, павлины и страусы. Больные птицы выделяют вирус с пометом, при поражении органов дыхания — со слизистыми выделениями из дыхательных путей. Инфицирование птиц происходит при непосредственном контакте с источником инфекции, а также через контаминированные слюной, назальным секретом и фекалиями последнего объекты внешней среды (чаще всего корм и воду) [2, 7].

В период первой эпизоотии гриппа в 2005 году в Новосибирской области было выделено более 10 штаммов высокопатогенного вируса птичьего гриппа. В результате вирусологических исследований было установлено, что все эти штаммы являются высокопатогенными для домашних птиц и мышей, вызывают тяжелую болезнь у хорей [5]. При этом существенных различий биологических свойств всех этих штаммов вирусов не выявлено. Таким образом, для воспроизведения экспериментальной инфекции у разных видов домашней птицы нами

был выбран один из типичных представителей вирусов высокопатогенного птичьего гриппа 2005 года штамм A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 (H5N1).

Целью исследований явилось описание показателей летальности при экспериментальной и естественной инфекции разных видов домашней птицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период проявления первых вспышек эпизоотии гриппа в Новосибирской области в июле 2005 года на частных подворьях в Доволенском районе при подворных обходах было проведено эпизоотологическое обследование, в ходе которого на частных подворьях регистрировали количество павших, больных и здоровых птиц по видам. В анализ были включены данные по заболеваемости птиц старше 18 — 20-месячного возраста, заболеваемость молодняка текущего года не учитывалась. Вся птица в частных подворьях населенных пунктов Новосибирской области в изучаемый период от гриппа птиц не была вакцинирована.

Птицы на обследованных подворьях содержались в общих помещениях и дворах, получали воду и корм из общих поилок и кормушек. Все птицы на подворьях пользовались свободным выгулом, водоплавающие в течение дня находились на прилегающем к населенному пункту озере.

Было проведено экспериментальное инфицирование птиц 6-ти недельного возраста: цыплят кроссов Леггорн белый, Род-Айленд

Иза коричневый (ГППЗ Новосибирский), гусей краснозерской породы и уток пекинской породы (ЗАО Краснозерское) штаммом вируса гриппа A/goose/Krasnozerskoye/627/05 (H5N1) в виде аллантоисной жидкости (5-й пассаж на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ)) с титром вируса $9,2 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, с концентрацией 10^9 вирусных частиц/мл. Физический титр определялся методом негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой.

Инфицирование птиц проводили десятикратными разведениями вируса на фосфатно-солевом буфере (Рн 7,2) путем равномерного нанесения инфицирующей жидкости на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости в объеме 1 см^3 . Уток инфицировали с 3-го по 7-е, гусей — со 2-го по 6-е, кур с 3-го по 9-е разведениями вируса. Каждая из экспериментальных групп была сформирована из 5 особей. В течение 2 недель после инфицирования у каждой птицы ежедневно брали мазки из клоаки и глотки, учитывали количество погибших птиц. Специфичность гибели птиц устанавливали на основании подтверждения наличия вируса гриппа в тканях внутренних органов (головного мозга, легких, печени, селезенки, почках).

Определение наличия вируса в мазках из клоаки и глотки, а также в ткани органов проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени и путем инфицирования РКЭ. Для выделения РНК использовали набор для выделения РНК «SV Total RNA Isolation system» (Promega, США), для ПЦР в реальном времени — набор «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» согласно инструкции производителей. Для инфицирования использовали РКЭ 9-тидневного возраста с последующим подтверждением наличия вируса в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1 % суспензии эритроцитов петуха [8].

Значения 50% инфекционной дозы (ИД_{50}) и 50% летальной дозы (ЛД_{50}) вычисляли по методу Рид-Менча. При этом птицу считали инфицированной хотя бы при однократном обнаружении вируса в течение срока наблюдения в мазках из глотки или клоаки [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При эпизоотологическом обследовании было выявлено, что первыми на обследованных подворьях заболели и погибали гуси. Первые очаги гриппа птиц были зарегистрированы в населен-

ных пунктах, расположенных вблизи водоема с большой плотностью населения как дикой, так и домашней птицей. Домашние гуси и утки после контакта с инфицированными дикими птицами, занесли вирус в подворья, где послужили источником инфекции для других видов домашней птицы (кур и индеек).

Учитывая преимущественно фекально-оральный механизм заражения птиц и их скученное, совместное содержание, можно предположить почти одновременное их естественное инфицирование. Большинство случаев падежа домашних птиц в очаге отмечено в течение 10 дней после регистрации первых случаев гибели птиц. К моменту эпизоотологического обследования массовая гибель птиц почти прекратилась, среди выживших птиц клинические признаки отмечены у единичных особей.

Наиболее чувствительными к вирусу гриппа птиц являются домашние птицы, относящиеся к отряду куриных. Самые высокие показатели процента летальности при естественном инфицировании были определены для кур, для индеек — на 25,6 % ниже, чем для кур. Смертность для разных видов водоплавающей птицы (гусей и уток) находится практически на одинаковом уровне и составляет около 30 % (табл. 1).

При экспериментальном инфицировании были определены ЛД_{50} для гусей, уток и двух пород кур (табл. 2). Было показано, что при инфицировании путем равномерного нанесения на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости вирус является наиболее патогенным для кур породы леггорн. Птица кроссов Род-Айленд Иза коричневый является более устойчивой к вирусу гриппа птиц, ЛД_{50} для нее на 12,2 % меньше, чем для леггорнов. Летальная доза для гусей была значительно ниже, чем для уток.

Данные выражены в ИД_{50} , ЛД_{50} .

Специфическая гибель кур наблюдалась с 3 по 7, уток — с 5 по 14, гусей — с 6 по 12 сутки. При этом большинство случаев гибели гусей и уток было отмечено с 5 по 10 сутки. Следует отметить, что при использованном методе инфицирования значения ИД_{50} значительно превышают значения ЛД_{50} для всех видов птиц.

В таблице 3 представлены данные, которые демонстрируют зависимость процента летальности от инфицирующей дозы вируса при использованном методе инфицирования. 100 % летальность для кур получена при инфицировании их дозой 10^5 вирусных частиц, для уток и гусей эта доза не определена.

Таблица 1

Летальность разных видов домашних птиц при естественном заражении вирусом гриппа

Вид птицы	Количество уценных птиц (голов)	Из них пало за 10 дней от начала эпизоотии (голов)	Падёж (%)
Куры	168	125	74,4
Гуси	92	28	30,4
Утки	106	34	31,1
Индейки	43	21	48,8

Таблица 2.

Средние эффективные дозы при экспериментальной инфекции штаммом вируса гриппа
A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 домашних птиц разных видов

№ п/п	Вид птицы	ИД ₅₀ /мл	ЛД ₅₀ /мл
1.	Гуси краснозерской породы	> 6,5	3,1
2.	Утки пекинской породы	> 7,5	> 5,4
3.	Куры кросса Род-Айленд Иза коричневый	7,6	6,5
4.	Куры кросса Леггорн белый	не определено	7,4

Таблица 3

Показатели летальности у разных видов домашних птиц в зависимости от инфицирующей дозы вируса гриппа
A/goose/Krasnoozerskoye/627/05

Разведение вируса (номер разведения)	Расчетная доза вируса (вирусных частиц/мл)	Вид птицы		
		гуси краснозерской породы (%)	утки пекинской породы (%)	куры кросса Род-Айленд Иза коричневый (%)
2	10 ⁸	90	–	–
3	10 ⁷	80	80	100
4	10 ⁶	40	75	100
5	10 ⁵	0	80	100
6	10 ⁴	0	60	80
7	10 ³	–	40	20
8	10 ²	–	–	0
9	10 ¹	–	–	0

Примечания: «–» – нет данных.

Минимальная инфицирующая доза для кур и уток составила 10³, для гусей – 10⁶ вирусных частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в изучении патогенеза гриппозной инфекции большое внимание уделяется моделированию путей инфицирования вирусом гриппа восприимчивых животных. Одним из основных параметров оценки патогенного влияния вируса на живой организм служит показатель летальности. В представленной работе приведены описательные данные летальности в популяции домашних видов птиц в период проявления первых вспышек эпизоотии гриппа в Новосибирской области. Следует отметить, что эпизоотия гриппа птиц в 2005 году была первой после длительного благополучия, в населенных пунктах вакцинации против гриппа не проводили, что полностью исключает возможность наличия у птиц иммунитета. Популяции птиц в населенных пунктах гетерогенные, то, что при анализе были учтены только данные по летальности птиц старше 18 – 20 месячного возраста, позволило сделать выборку более однородной.

Для воспроизведения естественной инфекции в лабораторных условиях было проведено экспериментальное инфицирование путем нанесения инфицирующей жидкости на слизистые носовых ходов, конъюнктивы глаз и ротовой полости. Такой путь инфицирования является наиболее приближенным к естественному, особенно для водоплава-

ющих видов птиц. Результаты эксперимента указывают на то, что инфицирование не водоплавающих видов птиц в естественных условиях значительно отличается от такового для водоплавающих видов. Ранее в эксперименте было показано, что наименьшее значение показателя ЛД₅₀ для птиц наблюдается при внутривенном способе инфицирования, наиболее близкое к этому значение было получено при аэрозольном пути инфицирования [4, 6]. При моделировании естественных путей инфицирования гриппозной инфекции необходимо учитывать поведенческие особенности модельного вида.

При сравнительной оценке результатов процента летальности при экспериментальной и естественной инфекции следует учитывать то, что при естественном пути инфицирования создать выборку, полностью однородную по породным и половозрастным качествам, невозможно, а также сложно оценить инфицирующую дозу, разнообразие путей и кратность проникновения вируса в организм восприимчивой птицы. Однако полученные данные указывают на то, что не водоплавающие виды птиц в естественных условиях инфицируются меньшими дозами вируса, чем водоплавающие.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л., 1962. — С. 85—92.
2. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин [и др.] // М.:ВНИТИБП, 1998. — 928 с.
3. Грипп птиц в Сибири. — Новосибирск: ЦЭРИС. — 2006. — 192 с.
4. Изучение инфекционного потенциала вируса гриппа птиц (субтипа H5N1) при респираторном инфицировании кур / А.Н. Сергеев [и др.] // Сборник статей. — Новосибирск, 2007. — С. 464—468.
5. Молекулярно-биологические и антигенные особенности штаммов высокопатогенного вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенных на юге Сибири в 2005—2009 гг. / К.А. Шаршов [и др.] // Журн. микробиол. — 2011. — № 5. — С. 40—43.
6. Сравнение инфекционности аэрозоля различных штаммов вируса гриппа птиц А (H5N1) для мышей и цыплят / О.В. Пьянков [и др.] // Тез. докл. 5-й междунар. конф. — Пущино, 2008. — С. 98—102.
7. Influenza. In: Diseases of poultry / B.C. Easterday [et al.] // Iowa State University Press, Ames. — 1997. — P. 583—605.
8. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance // WHO. — 2002. — 105 p.

Сведения об авторах

Зайковская Анна Владимировна — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: zaykovskaya_av@vector.nsc.ru)
Леонов Сергей Владимирович — научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630501, Новосибирская область, п. Краснообск, а/я 8 ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии; тел./факс: (383)348-39-31; e-mail: 348-39-31@mail.ru)
Юшков Юрий Георгиевич — заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630501, Новосибирская область, п. Краснообск, а/я 8 ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии; тел./факс: (383)348-39-31; e-mail: 348-39-31@mail.ru)
Шестопалов Александр Михайлович — к.б.н., заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (630559, Новосибирская область, п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: shestopalov2@ngs.ru)

М.Н. Киреев, Н.П. Гусева, Т.А. Полунина, А.Л. Кравцов, С.А. Бугоркова, Н.А. Шарапова,
Т.М. Тараненко

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА НА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Показано, что капсульный антиген F1 чумного микроба, конъюгированный с наночастицами коллоидного серебра (КС), обладает выраженным иммуногенным действием. При введении лабораторным животным он способен стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке, вызывать активацию генетического аппарата клеток иммунной системы, стимулировать гиперпластические процессы в лимфоидных органах. Растворы КС с антигенами стабильны, не вызывают общих и местных реакций, удобны в применении, что дает возможность их использования в иммунологической практике в качестве адъювантов.

Ключевые слова: капсульный антиген F1 *Yersinia pestis*, иммунобиологические свойства, адъювант

THE INFLUENCE OF COLLOID SILVER NANO-PARTICLES UPON IMMUNOBIOLOGIC PROPERTIES OF PLAGUE MICROBE CAPSULAR ANTIGEN

M.N. Kireyev, N.P. Gooseva, T.A. Polunina, A.L. Kravtsov, S.A. Bugorkova, N.A. Sharapova,
T.M. Taranenko

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

This study shows that *Yersinia pestis* capsular antigen F1 conjugated to the CS nano-particles demonstrates apparent immunogenic effects. When injected to the test animals it was able to stimulate the production of specific antibodies under smaller antigenic load, it caused activation of the genetic apparatus in the immune system cells, and it stimulated hyperplastic processes in the lymphoid organs. Solutions of CS plus antigens appeared to be stable and caused neither general nor local responses in the test animals; they were easy to make use of, thus demonstrating their potentialities to be exploited as adjuvants in immunologic practices.

Key words: *Yersinia pestis* capsular antigen F1, immunobiological properties, adjuvant

Введение

Сегодня наноматериалы привлекают внимание ученых не только наноразмерами, но и уникальными свойствами. Наночастицы золы золота и серебра используются в биологии и медицине как цитохимические маркеры в электронной микроскопии и иммуноанализе [3, 4, 6, 8, 10]. Имеются данные о применении коллоидного золота в качестве носителя низкомолекулярных веществ для получения антител [EP 0232717, МПК G 01 N 33/531]. Дыкман Л.А. с соавт. [5] успешно использовали конъюгат коллоидного золота как адъювант и растворитель одновременно для биологически активных веществ, таких, как бычий сывороточный альбумин и антиген клеточной стенки бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*.

В идеале адъюванты — это стимулирующие иммуногенез вещества, не обладающие собственным фармакологическим или иным действием на организм. Кроме того, чем меньше доза вводимого антигенного материала, при адекватном иммунном ответе, тем меньше наблюдается побочных эффектов и осложнений [11].

В настоящее время наиболее распространенными адъювантами для вакцин являются препараты на основе масляных эмульсий и суспензий неорганических веществ (адъювант Фрейнда, Al_2O_3), однако они склонны к расслоению фаз, могут вызывать локальные и общие токсические процессы, а также обладают повышенной вязкостью, что затрудняет их введение [1, 11]. Наилучшие результаты в иммунологической практике получены

при использовании липосомальных адъювантов, но они более сложны в изготовлении и требуют значительных материальных затрат. В связи с этим поиск новых адъювантов, позволяющих создавать высокоактивные, нетоксичные и стабильные вакцинные препараты, является весьма актуальным.

Сведений об адъювантных свойствах золы серебра в доступной литературе нами не обнаружено.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния наночастиц коллоидного серебра (КС) на иммунобиологические свойства капсульного антигена чумного микроба и возможности использования его в качестве адъюванта для стимуляции антителообразования.

МЕТОДИКА

В качестве антигена использовали капсульный антиген F1 *Yersinia pestis* вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), выделенного из центрифугата бульонной культуры методом одноэтапной гель-хроматографии на АсА-22 в соответствии с «Инструкцией по изготовлению и контролю капсульного антигена Ф1 чумного очищенного, сухого» [4]. Препарат F1 представлял собой чистый белок, гомогенный по данным ВЭЖХ, электрофореза и иммунодиффузии [13].

Золь серебра получали путем восстановления из 0,025 % раствора азотнокислого серебра в деионизованной воде при добавлении равного объема 0,05 % раствора боргидрида натрия («Sigma», США)

в деионизированной воде [10]. Золь серебра с размерами частиц в пределах 5 – 12 нм формировался при активном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 минут. «Серебряное число» (минимальное количество белка, защищающее золь против солевой агрегации) оказалось равным 100 мкг на 1 мл золя. В готовый золь (10 мл) добавляли водный раствор антигена FI (1 мл) с концентрацией 1 мг/мл. Образование серебряного конъюгата FI проводили при непрерывном перемешивании и комнатной температуре в течение 15 – 20 мин. В готовом растворе концентрация FI составляла 18 мкг / 0,2 мл (иммунизирующая доза на одну мышь).

В опыте использовали беспородных белых мышей, массой 18 – 20 г. Исследования выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом Министерства Здравоохранения СССР от 12.08.1977 г.

Для изучения воздействия КС как адъюванта использовали четыре группы беспородных белых мышей, по 24 особи в группе (контрольные: интактные и инъектированные стерильным физиологическим 0,14 М раствором NaCl (ФР); иммунизированные: антигеном FI, золем КС, конъюгатом FI + КС). Мышей иммунизировали однократно, вводя подкожно по 0,2 мл каждого препарата, забор крови декапитацией проводили на 1, 3, 7, 14, 21, 31 и 45 сутки. Кровь собирали в стерильные пробирки для получения сыворотки и в пробирки, обработанные гепарином, для проведения цитофлуориметрических исследований.

В те же сроки для гистологического исследования забирали материал из паховых и забрюшинных лимфоузлов, селезенки, печени, почек, кишечника, легких и сердца. Образцы помещали в 10%-й водный нейтральный раствор формалина, дальнейшую их обработку проводили по общепринятой схеме [12]. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали растворами гематоксилина и эозина.

Динамику образования специфических антител в мышинных сыворотках определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ТИФА) с использованием антивидового пероксидазного конъюгата.

О функциональном состоянии клеток иммунной системы в цельной крови судили с помощью импульсной цитометрии в потоке на проточном цитофлуориметре типа ICP 22 ФИВЕ (ФРГ), измеряя интенсивность флуоресценции каждой из

находящихся в суспензии клеток, окрашенных акридиновым оранжевым [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как известно, капсульный антиген FI является основным иммуногеном возбудителя чумы и компонентом химической чумной вакцины [2], поэтому изучение различных способов повышения его иммуногенности актуально и перспективно. Мы использовали наночастицы КС в свободной и конъюгированной с капсульным антигеном форме для изучения стимуляции антителообразования и оценке изменений функционального состояния клеток иммунной системы патогистологическим и цитофлуориметрическим методами.

Результаты этих исследований показали, что FI *per se*, и конъюгированная с золем серебра, для белых мышей обладает высокой иммуногенной активностью (табл. 1). Специфические АТ в сыворотках начали определяться уже на 7-е сутки, причем при иммунизации одной FI титр АТ нарастал постепенно, достигая максимума на 14-е сутки, с дальнейшим выходом на более низкий стационарный уровень. Введение мышам конъюгата FI + КС вызвало резкий подъем образования АТ на 7-е сутки, который оставался на одном уровне до конца наблюдения. В группе контрольных животных и при иммунизации мышей свободным золем серебра иммунологической перестройки не обнаружено.

При патогистологическом исследовании материала от лабораторных животных грубых изменений во внутренних органах и в месте введения препарата, свидетельствующих о резком токсическом действии не обнаружено. В печени и почках регистрировали незначительное полнокровие сосудов и умеренное функциональное напряжение паренхиматозных элементов.

На третьи сутки отмечали умеренное полнокровие сосудов мозгового вещества в регионарных лимфатических узлах. К седьмым суткам в лимфоидных органах регистрировали развитие различной степени выраженности гиперпластических процессов, особенно у животных, иммунизированных препаратами FI + КС. Так в лимфатических узлах на фоне антигенной стимуляции наблюдали гиперплазию лимфатических фолликулов (В-зоны) и активацию паракортикальных зон (Т-зоны), а в селезенке имела место гиперплазия светлых центров и периартериальных муфт лимфатических фолликулов.

Таблица 1
Изучение адъювантной активности золей серебра при иммунизации белых мышей FI чумного микроба

№	Группы животных	Доза и способ введения	Титр специфических АТ в ТИФА						
			1-е сут.	3-е сут.	7-е сут.	14-е сут.	21-е сут.	31-е сут.	45-е сут.
1.	Контрольная	ФР 0,2 мл, п/к	–	–	–	–	–	–	–
2.	FI + ФР	18 мкг FI в 0,2 мл, п/к	–	–	1:16	1:256	1:128	1:128	1:128
3.	КС	0,2 мл, п/к	–	–	–	–	–	–	–
4.	FI + КС	18 мкг FI в 0,2 мл, п/к	–	–	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256

Примечание: в таблице приведены средние титры АТ по каждой группе животных. (–) – специфические АТ не обнаружались.

Способность изучаемых препаратов индуцировать изменения функционального состояния клеток иммунной системы лабораторных животных оценивали методом проточной цитофлуориметрии, измеряя интенсивность зеленой флуоресценции ядерного хроматина лейкоцитов, суправитально окрашенных красителем акридиновым оранжевым. Лейкоциты с активированным генетическим аппаратом, а также пролиферирующие лейкоциты, несущие повышенное содержание ДНК на клетку, идентифицировали на ДНК гистограммах и подсчитывали в процентах как клетки с повышенной интенсивностью ДНК флуоресценции в зеленой области спектра — более 100 условных единиц флуоресценции (каналов). Эти данные, согласно ранее проведенным исследованиям, отражают интенсивность иммунологической перестройки в организме лабораторных животных, иммунизированных препаратами капсульного антигена или капсульными штаммами возбудителя чумы [7].

Установлено, что у контрольных животных, которым вводили стерильный ФР, ядерный хроматин лейкоцитов крови остается в состоянии «покоя». В периферической крови в течение всего периода наблюдения активации генетического аппарата клеток иммунной системы, сопутствующей синтезу в организме специфических антител и других важных для иммуногенеза белковых продуктов метаболизма, не наблюдали также и при введении мышам препарата золя КС, не связанного с F1. Капсульный антиген вызывал достоверные изменения в состоянии ядерного хроматина лейкоцитов крови иммунизированных животных уже через сутки с максимумом клеточного ответа на 3-е сутки иммуногенеза. Интенсивная реакция клеток иммунной системы на препарат F1 + КС развивалась у всех животных с задержкой по времени (на 7-е сутки), что, возможно, отражало адьювантные свойства наночастиц КС и влияло по данным иммуноферментного анализа на динамику образования специфических антител у лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований иммунологической перестройки в организме лабораторных животных под воздействием различных препаратов КС установлено, что конъюгированные с капсульным антигеном чумного микроба наночастицы КС обладают выраженным иммуногенным действием. Они способны вызывать активацию генетического аппарата клеток иммунной системы, сопутствующую выработке специфических антител, стимулировать

гиперплазию лимфатических фолликулов (В-зоны) и активность паракортикальных зон (Т-зоны). Растворы конъюгатов КС с антигенами стабильны, не вызывают общих и местных реакций, экономичны, удобны в применении, что дает возможность их эффективного использования в иммунологической практике в качестве адьювантов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А., Васильев Н.Н. Адьюванты. — М.: Медицина, 1969. — 205 с.
2. Дальвадянец С.Н., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А. Исследование по иммунизации против чумы // Пробл. особо опасных инф. — 2005. — С. 62—67.
3. Дот-иммуноанализ с частицами коллоидного серебра в качестве маркера специфического антигена для исследования сывороток крови людей на бруцеллез / Т.Ю. Загоскина [и др.] // Мед. паразитологии и паразитарные болезни. — 2002. — № 2. — С. 15—17.
4. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Применение дот-анализа и иммунозольных маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций // Журн. микробиол. — 1999. — № 4. — С. 93—94.
5. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Староворов С.А., Семенов С.В. Адьювант. Патент RU N 2001133996/13. — 2003.
6. Инструкция по изготовлению и контролю капсульного антигена чумного микроба очищенного сухого. — Саратов. — 1990. — 65 с.
7. Кравцов А.Л. Микрофлуориметрическое исследование в потоке гетерогенных популяций бактерий *Y. pestis* и клеток иммунной системы инфицированных чумой лабораторных животных: автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. — Саратов, 1997. — 58 с.
8. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркера специфических антител / Т.Ю. Загоскина [и др.] // Журн. микробиол. — 2001. — № 3. — С. 65—69.
9. Петров Р.В. Иммунология. — М.: Медицина, 1983. — 368 с.
10. Полтавченко А.Г., Караваева В.С., Тузилов В.Ф. Использование золей серебра как маркеров иммуноанализа на микротитровальных платах // Журн. микробиол. — 1998. — № 2. — С. 108—111.
11. Ройт А. Основы иммунологии. — М.: Мир, 1991. — 327 с.
12. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: рук-во. — М.: Медицина, 1996. — 543 с.
13. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения / М.Н. Киреев [и др.] // Биотехнология. — 2005. — № 5. — С. 41—43.

Сведения об авторах

Киреев Михаил Николаевич — к.м.н., зав. лабораторией биохимии и протеомики РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»; E-mail: rusrap@microbe.ru)
Гусева Наталья Петровна — к.б.н.; с.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Полунина Татьяна Алексеевна — к.м.н., н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Кравцов Александр Леонидович — д.б.н., в.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Бугоркова Светлана Александровна — д.м.н., зав. лаб. патоморфологии РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Шарапова Наталия Анатольевна — м.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)
Тараненко Татьяна Михайловна — д.б.н., в.н.с. РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, ул. Университетская, 46, РосНИПЧИ «Микроб»)

И.В. Козлова ^{1, 2}, М.М. Верхозина ¹, Е.К. Дорощенко ¹, О.В. Лисак ¹, В.А. Борисов ¹,
М.К. Туваков ², Л.С. Карань ³, С.Е. Ткачев ⁴, Ю.П. Джигоев ¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ И ИЗОЛЯТОВ РНК ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ И РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

³ Центральный НИИ эпидемиологии (Москва)

⁴ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)

Проведено генотипирование 9 штаммов и 9 изолятов РНК вируса клещевого энцефалита (КЭ), выделенных от больных людей в Иркутской области и в Республике Бурятия в 1963–2009 гг. Выполненные исследования позволили установить, что в этиологии КЭ участвует вирус трех генотипов: урало-сибирского (генотип 3), дальневосточного (генотип 1) и европейского (генотип 2). Установлено, что вирус КЭ дальневосточного и урало-сибирского генотипов способен вызывать заболевания, имеющие широкий спектр клинических проявлений: острый КЭ (очаговые и не очаговые формы), хронический КЭ (энцефалитическая форма, прогрессирующее течение). Показана перспективность применения молекулярно-генетических методов для быстрой индикации и идентификации вируса КЭ в крови больных людей.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, генотип вируса клещевого энцефалита

RESULTS OF GENOTYPING OF STRAINS AND RNA ISOLATES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM SICK PEOPLE IN IRKUTSK REGION AND BURYAT REPUBLIC

I.V. Kozlova ^{1, 2}, M.M. Verkhovina ¹, E.K. Doroshchenko ¹, O.V. Lysak ¹, V.A. Borisov ¹,
M.K. Tuvakov ², L.S. Karan ³, S.E. Tkachev ⁴, Yu.P. Dzhiyev ¹

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

³ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

⁴ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

Genotyping of nine strains and nine isolates of tick-borne encephalitis virus RNA (TBE) isolated from patients in the Irkutsk Region and the Buryat Republic in 1963–2009 years conducted. The investigations revealed that three TBE virus genotypes are involved in the etiology of the TBE: Ural-Siberian (genotype 3), Far Eastern (genotype 1) and European (genotype 2). It is found that the TBE virus of Far East and Ural-Siberian genotypes can cause disease with a wide spectrum of clinical manifestations: acute TBE (focal and nonfocal forms), chronic TBE (encephalitic form, progressive course.) Prospects of application of molecular genetic techniques for the rapid indication and identification of the TBE virus in the blood of sick people are shown.

Key words: tick-borne encephalitis, tick-borne encephalitis virus genotype

ВВЕДЕНИЕ

В начале XXI века клещевой энцефалит (КЭ) остается наиболее распространенной тяжелой природно-очаговой инфекцией, передающейся через укус иксодовых клещей. Несмотря на интенсивное изучение КЭ, многочисленные исследования, посвященные этиологии, эпидемиологии, клинике, лечению и методам профилактики этого заболевания, интерес специалистов к разным аспектам данной проблемы продолжает оставаться очень высоким.

Одним из наиболее дискуссионных вопросов, обсуждаемых в научной литературе, является вопрос об этиологической связи различных подтипов вируса КЭ с определенными клиническими формами заболевания и тяжестью течения [3, 4, 8, 9, 12].

Для ответа на него необходимо генотипирование репрезентативной выборки штаммов, выделенных от больных КЭ людей. Однако изоляция и последующее типирование штаммов вируса КЭ

— достаточно трудоемкий и длительный процесс, который не позволяет оперативно получать необходимую информацию. В связи с этим, все чаще для экспресс-индикации и идентификации вируса КЭ используют не штаммы вируса КЭ, а изоляты РНК [4, 5, 10].

Цель работы — генотипирование штаммов и изолятов РНК вируса КЭ, выделенных от больных с различными формами болезни, для поиска возможной связи между клинической картиной заболевания, тяжестью течения и генотипом вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено генотипирование девяти штаммов вируса КЭ, изолированных от больных людей на территории Иркутской области и Республики Бурятия в период с 1963 по 2005 гг. Исследовано 40 проб крови от 26 больных, находившихся в 2009 г. на лечении в инфекционных стационарах г. Иркутска

и п. Усть-Орды. Проведен анализ историй болезни данных больных.

Выделение РНК осуществляли с помощью набора реагентов «РИБО-преп». Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора РФ (г. Москва). Генетическое типирование штаммов и изолятов РНК вируса КЭ проводили: 1) в реакции молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) с применением генотипспецифических зондов, описание которых приводится в работе Т.В. Деминой и соавт. [4]; 2) путем секвенирования гена белка Е или его фрагментов, а также участка гена белка С длиной 70 п.н., выполненного на базе ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва) и в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск); 3) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флюоресцентной детекцией с генотипспецифическими зондами [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования показали, что штаммы вируса КЭ урало-сибирского генотипа (генотип 3) способны участвовать в развитии как острого (менингеальная, менингоэнцефалитическая формы заболевания), так и хронического КЭ (энцефалитическая, прогрессивная формы) (табл. 1).

Штамм 1Г-98, выделенный из сгустка крови больного лихорадочной формой КЭ, был отнесен к европейскому генотипу (генотип 2). Штамм 2517-05, изолированный из сгустка крови больной хронической прогрессивной формой КЭ, принадлежал к дальневосточному генотипу (генотип 1). О возможности участия вируса КЭ дальневосточного генотипа в развитии хронических форм КЭ свидетельствуют и результаты, полученные Е.Г. Гамовой и соавт. [3, 4]. На протяжении длительного времени считалось, что развитие хронических прогрессивных форм КЭ ассоциируется преимущественно с «Айна»-подобными штаммами, вошедшими в настоящее время в состав урало-сибирского генотипа [9].

С помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени в штамме 3869-03, выделенном из сыворотки крови человека с инаппарантной формой заболевания, выявлено присутствие геномов вируса КЭ двух генотипов — европейского и урало-сибирского. В штамме 1392-04, изолированном из сыворотки крови больного из Республики Бурятия также обнаружены геномы вируса КЭ двух генотипов — дальневосточного и урало-сибирского.

Молекулярные методы выявления возбудителей инфекций в клещах применяются давно и хорошо себя зарекомендовали как методы, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью, а также относительно небольшим временем получения результатов [11]. Однако для целей экспресс-индикации и генотипирования вируса КЭ в крови больных они до сих пор используются крайне редко [5, 10].

С помощью ОТ-ПЦР нами проведено исследование проб крови 26 больных, находящихся на лечении в стационаре по поводу инфекционного заболевания, возникшего после укуса клеща. РНК вируса КЭ была обнаружена у десяти из них. Удалось провести генотипирование девяти изолятов РНК, в семи случаях этиологическим агентом заболевания послужил вирус КЭ дальневосточного генотипа, в двух других — урало-сибирского (табл. 2).

Заболевания, вызванные вирусом КЭ дальневосточного генотипа, имели широкий спектр клинических проявлений от лихорадочной формы до хронической прогрессивной.

Так, **изолят РНК Ku-09** вируса КЭ дальневосточного генотипа был получен от *больного К.*, 51 г., пострадавшего от укуса клещей на территории Жигаловского района Иркутской области. В анамнезе больного есть указание на присасывание двух клещей (13 и 24 июля и 2009 г.) в живот и правое предплечье. Клещей пациент удалил самостоятельно, их не обследовал, иммуноглобулин не вводил, против КЭ не вакцинирован. Поступил в инфекционный стационар 26 июля с жалобами на высокую температуру (до 39,5 °С), слабость, умеренную головную боль. При объективном осмотре очаговой менингеальной симптоматики не выяв-

Таблица 1
Результаты генотипирования штаммов вируса КЭ, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия

№ штамма	Источник изоляции	Место выделения	Год	Форма заболевания	Генотип
Айна/1448	Ликвор	Иркутская область	1963	Хронический КЭ, прогрессивная форма	3
215-79	Секционный материал	Иркутская область	1979	Острый КЭ, менингоэнцефалитическая форма	3
210-79	Сыворотка крови	Иркутская область	1979	Форма не известна	3
560-86	Ликвор	Республика Бурятия	1986	Хронический КЭ, энцефалитическая форма	3
1Г-98	Сгусток крови	Иркутская область	1998	Лихорадочная форма	2
3869-03	Сыворотка крови	Иркутская область	2003	Инаппарантная форма	2, 3
413-04	Сыворотка крови	Иркутская область	2004	Менингеальная форма, двухволновое течение	3
1392-04	Сыворотка крови	Республика Бурятия	2004	Лихорадочная форма	1, 3
2517-05	Сгусток крови	Иркутская область	2005	Хронический КЭ, прогрессивное течение	1

Таблица 2

Результаты генотипирования изолятов РНК вируса КЭ, выделенных в 2009 г. от больных людей
в Иркутской области

Изолят РНК	Клинический диагноз	Генотип
Ku-09	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	дальневосточный
H-09	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	дальневосточный
S-09	КЭ, менингеальная форма, тяжелое течение	дальневосточный
A-09	хронический КЭ, прогрессирующая форма	дальневосточный
L-09	КЭ; клещевой риккетсиоз	дальневосточный
Ko-09	КЭ, ИКБ, безэритемная форма	дальневосточный
G-09	КЭ, лихорадочная форма; гепатит А	дальневосточный
B-09	КЭ, лихорадочная форма, средней тяжести	урало-сибирский
J-09	КЭ, лихорадочная форма	урало-сибирский

лено. Клинический диагноз: клещевой энцефалит, лихорадочная форма, средней степени тяжести. Результаты ИФА от 27.07 и 3.08.09 на наличие IgM и IgG-антител к вирусу КЭ и возбудителю ИКБ — отрицательные. Исследование, проведенное нами с помощью ПЦР, показало наличие в крови РНК вируса КЭ дальневосточного генотипа.

Изолят РНК H-09 вируса КЭ дальневосточного генотипа был получен от *больного X.*, 28 лет, пострадавшего от укуса клеща на территории Осинского района Иркутской области. Заболевание развилось приблизительно через месяц после укуса клеща. Больной переносчика не исследовал, экстренную профилактику не проводил, против КЭ не привит. Госпитализирован 30 июля с жалобами на температуру до 39 °С, головные боли, слабость, потливость. При объективном осмотре — состояние средней тяжести, при надавливании на глазные яблоки — болезненность, менингеальных симптомов не обнаружено. Лабораторное исследование с помощью ИФА выявило наличие IgM и IgG-антител к вирусу КЭ. Результат на наличие антител к возбудителю ИКБ — отрицательный. Результат ПЦР на наличие вируса КЭ — положительный.

Изолят РНК S-09 вируса КЭ дальневосточного генотипа был получен от *больной С.*, 36 лет. Заражение произошло 12 июня 2009 г. при сборе черемши на территории Баяндаевского района Иркутской области. Пострадавшая отмечает множественное присасывание клещей (до 10) в поясничную область, нижнюю часть живота, правое плечо и шейную область. Клещей больная удаляла самостоятельно, их исследование не проводила, серопрфилактику не получала, не вакцинирована. Заболела 30 июня. В инфекционный стационар была госпитализирована 3 июля 2009 г. с жалобами на высокую температуру (до 40 °С), головные и суставные боли, тянущие боли в руках и ногах, боли в животе, потерю аппетита, многократную рвоту. Состояние больной тяжелое. Сознание не нарушено. При объективном обследовании выявлена резкая болезненность при надавливании на глазные яблоки, умеренная тугоподвижность мышц затылочной области, небольшая гиперемия

ротоглотки. Симптом Кернига отрицательный. Парезы и параличи отсутствуют. Положительный верхний симптом Брудзинского. При пунктировании — ликвор светлый, прозрачный, вытекает редкими каплями, при лабораторном обследовании выявлен умеренный цитоз. Результат ИФА крови на наличие IgM и IgG-антител к вирусу КЭ — положительный, к *B. burgdorferi* — отрицательный. Больная выписана 5 июля 2009 г. Заключительный клинический диагноз: клещевой энцефалит, менингеальная форма, тяжелое течение. Результат ПЦР на наличие РНК вируса КЭ — положительный (вирус КЭ дальневосточного генотипа).

Изолят РНК A-09 вируса КЭ дальневосточного генотипа был получен от *больной А.*, 25 лет. Укус клеща не отмечен. Больной себя считает с 2006 г. Первичный диагноз: миастения, генерализованная форма. Ризидуальная энцефалопатия: двусторонние органические неврологические симптомы, мозжечковые нарушения.

За консультацией врача-инфекциониста больная обратилась только в 2009 г. с жалобами на нарушения речи и походки, общую слабость, снижение памяти. При объективном осмотре выявлено: движения в глазных яблоках незначительно ограничены кнаружи, вверх. Слабость конвергенции. Установочный горизонтальный нистагм влево. Сглажена левая носогубная складка. Больная поперхивается. Дужки мягкого неба при фонации малоподвижны. Голос «гнусавый». Девияция языка вправо. Активные движения в конечностях сохранены. Мышечный тонус пирамидный. Сухожильные рефлексы с рук живые, коленные высокие, ахиллов рефлекс справа поликинетичен, слева оживлен, двухсторонний рефлекс Бабинского. Менингеальных симптомов нет. Атаксия при ходьбе. В позе Ромберга — покачивание. Интенционное дрожание при пальценосовой пробе с двух сторон. Состояние больной средней тяжести. Снижение критики к своему состоянию. При лабораторном исследовании крови в ИФА результат от 22.01.09 — IgG к вирусу КЭ — 1:270, от 22.06.09 — 1:450, антител к *B. burgdorferi* не обнаружено. При проведении ПЦР (22.06.09 и 17.09.09) выявлена РНК

вируса КЭ, что позволило нам установить этиологию органического поражения головного мозга и уточнить клинический диагноз у данной больной.

Окончательный диагноз: хронический клещевой энцефалит, первично-прогредиентное течение, энцефаломиелитическая форма. Умеренный квадрипарез, более выраженный в ногах. Псевдобульбарный синдром. Легко выраженная атаксия. Умеренно выраженные когнитивные, эмоционально-волевые расстройства. Данный случай еще раз подтверждает возможность участия вируса КЭ дальневосточного генотипа в развитии хронических форм заболевания.

Наличие РНК вируса КЭ дальневосточного генотипа также было обнаружено у больных, поступивших в инфекционный стационар с подозрением на клещевой энцефалит и выписанных из него с другими клиническими диагнозами.

Больная Л., 11 лет, пострадала от укуса клеща в п. Усть-Орда. Клинический диагноз: клещевой риккетсиоз.

Исследования, проведенные нами с помощью ПЦР, выявили в крови наличие РНК вируса КЭ дальневосточного генотипа (**изолят РНК L-09**), что позволило нам провести этиологическую расшифровку заболевания у данной больной, предварительный диагноз клещевого риккетсиоза у которой не нашел лабораторного подтверждения.

Больная К., 29 лет заболела 3.07.09. Укус клеща отрицает, однако отмечает, что приблизительно три недели назад была в поселке, расположенном по Качутскому тракту, где снимала с мужа присосавшегося клеща и раздавливала его в руках. Не привита. Серопротекцию не проводила. В инфекционный стационар поступила 9.07.09 с жалобами на слабость, жар (температура до 38,5 °С), озноб, сухость во рту. При объективном осмотре состояние средней тяжести, менингеальных симптомов нет, эритема отсутствует. При лабораторном обследовании выявлено: IgM и IgG-антитела к вирусу КЭ отсутствуют, обнаружены IgM к *B. burgdorferi*. Клинический диагноз: Иксодовый клещевой боррелиоз, безэритемная форма, средней тяжести. При исследовании крови с помощью ПЦР выявлена РНК вируса КЭ дальневосточного генотипа (**изолят РНК Ko-09**).

Изолят РНК G-09 был выделен от *больного Г.*, 18 лет, поступившего в инфекционный стационар с предварительным диагнозом — клещевой энцефалит. Из анамнеза выяснено, что укус клеща зафиксирован 28.06.09 в Жигаловском районе Иркутской области. Через 6 дней появилась температура до 39 °С, озноб, головная боль. При объективном обследовании менингеальных симптомов не выявлено. Состояние средней тяжести. Обнаружено увеличение печени, которая выходит за пределы реберной дуги на 2—3 см. Биохимическое исследование показало наличие повышенного билирубина, АЛТ и АСТ. При лабораторной диагностике выявлено наличие IgM-антител к HAV, IgG антител к вирусу КЭ и ИКБ. Клинический диагноз: острый вирусный гепатит, безжелтушная форма, средней тяжести.

Проведенное нами исследование крови с помощью ПЦР позволило выявить у данного больного инфицирование не только вирусом гепатита А, но и вирусом КЭ.

Как уже упоминалось выше, в двух случаях КЭ этиологическим агентом послужил вирус урало-сибирского генотипа. В обоих случаях диагностирована лихорадочная форма КЭ.

Изолят РНК В-09 вируса КЭ урало-сибирского генотипа был обнаружен в крови *больного Б.*, 31 г., который пострадал от укуса клеща 2 июня 2009 г. на территории Баяндаевского района Иркутской области. Заболел 9.06.09 г. При лабораторном обследовании выявлено наличие IgM и IgG-антител к вирусу КЭ. Клинический диагноз: клещевой энцефалит, лихорадочная форма, средней тяжести. ПЦР-исследование обнаружило присутствие в крови РНК вируса КЭ урало-сибирского генотипа.

Изолят РНК J-09 вируса КЭ урало-сибирского генотипа обнаружен в крови *больного Ж.*, 14 лет. Данный ребенок пострадал от укуса клеща на территории Ольхонского района Иркутской области в 2008 г. Клинический диагноз: клещевой энцефалит, лихорадочная форма средней степени тяжести. После проведенного лечения больной был выписан из стационара. Однако, при лабораторном обследовании через три месяца после лечения кроме IgG к вирусу КЭ (титр 1:1600) были выявлены и иммуноглобулины класса М. По мнению Кветковой Э.А. и соавт. длительное сохранение в крови IgM — антител может свидетельствовать в пользу продолжающейся персистенции возбудителя и являться плохим прогностическим признаком [6, 7]. В связи с этим было проведено лабораторное исследование крови ребенка в динамике. Через 6 месяцев после начала заболевания результат на присутствие в крови IgM-антител к вирусу КЭ — положительный, титр IgG — 1:12800. Через 9 месяцев: IgM не обнаружены, титр иммуноглобулинов класса G — 1:30000. При исследовании крови с помощью ПЦР обнаружена РНК вируса КЭ урало-сибирского генотипа. При повторном исследовании через три месяца — результат ПЦР отрицательный. Диагноз хронического клещевого энцефалита у пациента снят.

Этот клинический случай представляет интерес еще и тем, что пациент прошел полный курс вакцинации против КЭ незадолго до укуса клеща (две прививки вакциной «Энцефир» в 2007 г., ревакцинация — в 2008 г.). Как известно, вакцина «Энцефир» готовится на основе дальневосточного генотипа вируса КЭ, возможно, в связи с этим в данном случае не удалось предотвратить развитие заболевания, вызванного вирусом КЭ урало-сибирского генотипа, а также привело к задержке переключения иммуноглобулинов класса М на иммуноглобулины класса G.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, изучение штаммов вируса КЭ с использованием различных молекулярно-биологических технологий позволило установить, что в этиологии КЭ в Иркутской области и Республике Буря-

тия участвует вирус КЭ трех генотипов: урало-сибирского (генотип 3), дальневосточного (генотип 1) и европейского (генотип 2). Установлено, что вирус КЭ дальневосточного генотипа способен вызывать заболевания, имеющие широкий спектр клинических проявлений: острый КЭ (лихорадочная форма (средней тяжести), менингеальная форма (тяжелое течение)), хронический КЭ (прогредиентное течение). Вирус КЭ урало-сибирского генотипа в нашем исследовании участвовал в развитии лихорадочной (средней тяжести), менингеальной (двухволновое течение), менингоэнцефалитической форм острого КЭ, а также хронического КЭ (энцефалитическая, прогредиентная форма). Прямой корреляционной связи между клинической картиной заболевания, тяжестью течения и генотипом вируса не выявлено.

Учитывая, малочисленность изученной выборки, исследования по установлению роли различных генотипов вируса КЭ в региональной инфекционной патологии будут продолжены. Эти данные исключительно важны для правильной оценки существующей эпидемиологической ситуации, прогноза, а также применения адекватной стратегии и тактики лечебных и профилактических мер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генетическая вариабельность и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов / Т.В. Демина [и др.] // *Вопр. вирусол.* — 2009. — № 3. — С. 33–42.
2. Генотипирование вируса клещевого энцефалита молекулярно-биологическими методами / Л.С. Карань [и др.] // *Геномные технологии в медицине и медобразовании на рубеже веков: материалы междунар. науч.-практ. конф.* — Алматы, 2006. — С. 70–72.
3. Изучение штаммов вируса клещевого энцефалита различных генотипов, выделенных от больных с хроническим течением болезни / Е.Г. Безрукова [и др.] // *Медицина в Кузбассе. Актуальные проблемы клещевых нейроинфекций.* — Кемерово, 2008. — № 5. — С. 21–28.

4. Изучение этиологии клещевого энцефалита на основе молекулярно-биологических методов / Е.Г. Гамова [и др.] // *Современные научные и прикладные аспекты клещевого энцефалита: материалы всерос. науч. конф. к 70-летию открытия вируса клещевого энцефалита, 15–16 ноября 2007 г., Москва.* — М., 2007. — С. 28–29.

5. Карань Л.С., Браславская С.И., Мязин А.Е. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита // *Вопросы вирусологии.* — 2007. — № 6. — С. 17–22.

6. Кветкова Э.А., Переходова С.К., Дуринова Л.П. Иммунный ответ при клещевом энцефалите: динамика, клинко-иммунологические параллели // *Вирусы и вирусные инфекции человека.* — М., 1981. — С. 209–210.

7. Конькова А.Б., Ратникова Л.И., Стенько Е.А. Новые аспекты в лабораторной диагностике клещевого энцефалита // *Природно-очаговые инфекции в России: современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения.* — Омск, 1998. — С. 70–71.

8. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита / В.И. Злобин [и др.]. — Иркутск, 2003. — 271 с.

9. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. — Новосибирск: Наука, 1986. — 233 с.

10. Применение молекулярно-генетических методов для изучения структуры штаммов вируса клещевого энцефалита / Л.С. Карань [и др.] // *Бюллетень Сибирского отделения РАМН.* — 2007. — № 4. — С. 34–40.

11. Применение молекулярных методов в изучении распространенности возбудителей клещевых инфекций в сочетанных очагах / Л.С. Карань [и др.] // *Инфекционные болезни.* — 2009. — № 7 (приложение 1). — С. 87–88.

12. Этиология очаговых форм клещевого энцефалита с летальными исходами в Читинской области / Е.И. Андаев [и др.] // *Медицинская вирусология.* — М., 2006. — Т. XXIII. — С. 75–78.

Сведения об авторах

Козлова Ирина Валерьевна — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3, ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, Институт эпидемиологии и микробиологии; т. (3952) 33-39-51; e-mail: diwerhoz@rambler.ru)

Верхозина Марина Михайловна — кандидат биологических наук, биолог микробиологической лаборатории вирусологического отделения ПЦР-лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» (тел. (3952) 23-41-97; e-mail: diwerhoz@rambler.ru)

Дорошенко Елена Константиновна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: doroshchenko-virus@mail.ru)

Лисак Оксана Васильевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: lisak.lisa@rambler.ru)

Борисов Виктор Александрович — доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней ГОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» (e-mail: borisov40@mail.ru)

Тувakov Мурат бай Курбан Муратович — заведующий инфекционным отделением, г. Байкальск (e-mail: tuvakov@mail.ru)

Карань Людмила Станиславовна — старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологии зоонозов, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ (тел. (495) 305-5424; e-mail: karan@pcr.ru)

Ткачев Сергей Евгеньевич — младший научный сотрудник ГУ Институт ХБ и ФМ СО РАН (630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, д. 8; тел. (383) 333-36-77; e-mail: sergey.e.tkachev@mail.ru)

Джигоев Юрий Павлович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (e-mail: alanir07@mail.ru)

Н.Н. Кочкалова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.А. Лобовикова, Л.В. Савицкая, С.А. Бадарин, С.В. Генералов, Н.И. Костылева, Н.А. Шарапова, Ю.В. Иванов

ОПТИМИЗАЦИЯ ФОРМЫ ВЫПУСКА И ПОТРЕБИТЕЛЬСКОЙ ТАРЫ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Представлены данные по оптимизации формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. В ходе экспериментов использовали в качестве первичной упаковки ампулы и флаконы с наполнением препарата для лиофилизации объемом 5 мл. Проведено сравнительное исследование физико-химических, биологических характеристик и молекулярных параметров лиофилизированной и исходной жидкой форм иммуноглобулина. Установлено, что лиофилизированная форма способствует стабилизации свойств препарата и препятствует образованию фрагментов и агрегатов при хранении антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, лиофилизация, первичная упаковка, стабильность

OPTIMIZATION OF PRESENTATION AND CONSUMER CONTAINER OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN OBTAINED FROM HORSE SERUM

N.N. Kochkalova, E.G. Abramova, A.K. Nikiforov, M.N. Kireyev, O.A. Lobovikova, L.V. Savitskaya, S.A. Badarin, S.V. Generalov, N.I. Kostyleva, N.A. Sharapova, Yu.V. Ivanov

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

We presented the data concerning optimization of presentation and consumer container of anti-rabies immunoglobulin obtained from horse serum. During the experiments, ampoules and flasks were used for primary packaging. They were filled within 5 ml of the preparation of freeze-drying. Comparative analysis of physical, chemical and biological properties and molecular parameters of freeze-dried and initial forms of the immunoglobulin was carried out. Freeze-drying was demonstrated to promote stabilization of its properties and prevent emergence of fragments and aggregates during anti-rabies immunoglobulin storage.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, freeze-drying, primary packaging, stability

На сегодняшний день антирабический иммуноглобулин (АИГ) из крови лошади выпускается в жидкой форме. Жидкая форма данного лекарственного средства, как и многих других медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), применяемых в лечебных целях, достаточно экономична и удобна для использования потребителем. Однако существует ряд недостатков жидкой лекарственной формы: меньшая стабильность во время длительного хранения, возможное снижение титров специфических антител, более жесткие требования к транспортировке [5]. Согласно литературным данным, МИБП в форме лиофилизатов имеют более продолжительный срок годности с сохранением биологических и физико-химических свойств [4].

В соответствии с нормативной документацией (НД) на «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», выпускаемый РосНИПЧИ «Микроб», срок его хранения составляет 1 год 6 месяцев. Разработка лиофилизированной формы препарата, безусловно, позволит не только увеличить срок хранения, что является актуальным в связи с его высокой востребованностью на фармацевтическом рынке в России, но также избежать проблем, связанных с жесткими требованиями к транспортированию жидких иммунобиологических лекарственных средств.

При разработке сухой формы АИГ первоначально были проведены экспериментальные работы,

направленные на исследование физико-химических и биологических параметров иммуноглобулина, лиофилизированного при различных режимах в объеме 1 и 2 мл [10]. Исследования молекулярных параметров препарата АИГ сухой формы в объеме 1 мл показали хорошие результаты стабильности препарата в процессе длительного хранения [7]. Более глубокие исследования физических свойств препарата, таких, как температура эвтектики и тепловые параметры, позволили четко определить критические температурные зоны в процесс лиофилизации и определить влияние стабилизирующих веществ [8].

Цель настоящей работы заключалась в получении лиофилизированного антирабического иммуноглобулина в терапевтической дозировке 5мл, сравнительное исследование качественных характеристик полученных образцов, выборе оптимальной и удобной для конечного потребителя первичной упаковки.

МЕТОДИКА

Для экспериментов использовали антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, жидкий с содержанием белка (10 ± 1) %. Концентрация глицина, добавляемого в качестве стабилизатора, составляла ($2,25 \pm 0,25$) %. Основные физико-химические и биологические параметры соответствовали требованиям нормативной документации на препарат иммуноглобулина антирабического в жидкой форме.

Жидкий иммуноглобулин разливали по 5 мл в ампулы стеклянные для лекарственных средств тип В, стекло НС-1 номинальной вместимостью 10 мл (Туймазы, Россия) и флаконы ФО-1-10 НС-3 (Клин, Россия), замораживали в холодильной установке НС 700/50.2 (Чехия) до минус 50 °С. Лиофилизацию препарата осуществляли с применением установки лиофильного высушивания Heto PowerDry PL9000/-50/HSC (Дания); этап первичной сушки длился 21 ч при значении вакуума 0,12 гПа; этап досушивания составлял 9 ч при вакууме 0,08 гПа; общее время лиофилизации — 30 ч; установленное и поддерживаемое значение температуры полки составило 40 °С; температура конденсатора — минус (48 ± 0,2) °С.

Внешний вид сухой формы препарата и растворимость оценивали визуальным методом.

Определение потери в массе при высушивании (остаточную влажность) проводили весовым методом согласно ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [11].

рН определяли потенциометрически согласно ГФ XII, вып. 1 [1].

Прозрачность и цветность в сухом иммуноглобулине после растворения определяли спектрофотометрически согласно ФС 42-3874-99 [11].

Содержание белка определяли методом с биуретовым реактивом согласно ФС 42-3874-99 [11].

Уровень специфической активности жидкого и лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе с применением иммуносуппензионной тест-системы на основе наночастиц коллоидного золота [6].

Исследование стабильности иммуноглобулина проводили в тесте на «ускоренное старение», выдерживая препарат при температуре 37 °С в течение 4 недель, что является аналогом условий хранения в течение 2 лет [2]. Стресс-условия имитировали выдерживанием препарата при температуре 56 °С в течение 24 ч [3].

Определение агрегатов и фрагментов в препаратах АИГ определяли методом гель-фильтрации [11]. При проведении фракционирования иммуноглобулина использовали хроматографическую колонку размером 25 x 2,6 см (LKB, Швеция), в качестве наполнителя применяли ультрагель трисакрил GF 2000M (IBF, Франция) с областью разделения глобулярных белков от 120 до 15 000 кДа. Объем внесения анализируемой пробы — 1 мл. Фракционирование проводили в течение 2 ч со скоростью потока 0,8 мл/мин. Величину оптической плотности каждой фракции определяли при длине волны 280 нм на проточном спектрофотометре «Увикорд SP» (LKB, Швеция). Для количественного анализа хроматограммы применяли метод нормировки [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе выполненной работы были получены 3 экспериментальные серии лиофилизированного иммуноглобулина, разлитого по 5 мл в ампулы, и 3

экспериментальные серии лиофилизированного иммуноглобулина, разлитого по 5 мл во флаконы. Данный объем является оптимальной дозировкой препарата, близкой к терапевтической дозе иммуноглобулина. Следует отметить, что при использовании флаконов, в отличие от ампул, практически отсутствует брак, связанный с нарушением целостности упаковки.

Образцы иммуноглобулина лиофилизированной формы характеризовались следующими показателями.

Все лиофилизаты, как в ампулах, так и во флаконах, представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета мелкопористой структуры; потеря в массе при высушивании составила в среднем 0,5 %, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизированные лечебные иммуноглобулины, согласно которой данный параметр не должен превышать 3,0 %.

Все образцы лиофилизированного препарата во флаконах и ампулах характеризовались хорошей растворимостью — в среднем 2 мин (по Европейской Фармакопее — не более 10 мин).

Значение концентрации водородных ионов для образцов сухого препарата АИГ соответствовало требованиям нормативной документации на жидкий препарат — от 6,6 до 7,4.

Прозрачность и цветность растворенного после лиофилизации антирабического иммуноглобулина в основном не претерпели значительных изменений по сравнению с жидкой формой, и соответствовали требованиям ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин — не более 0,05 и не более 0,15 соответственно.

Исследование уровня белка в лиофилизатах в сравнении с исходными жидкими образцами показало снижение данного показателя в ходе высушивания в среднем на 8 %, что, тем не менее, не повлияло на степень активности препарата.

Определение *in vitro* специфической активности лиофилизатов выявило титры специфических антител от 1:5000 до 1:20000, аналогичные значения фиксировали и при исследовании активности жидких исходных образцов. Не произошло снижения активности и после испытания иммуноглобулина жидкой и сухой форм в тесте на «ускоренное старение».

Сравнительное исследование молекулярных параметров жидкой и лиофилизированной форм препарата, отражающих стабильность свойств иммуноглобулина, не выявило наличия фрагментов и агрегатов в препаратах на момент получения, при хроматографическом молекулярном разделении иммуноглобулина зарегистрирован один пик мономерной фракции. Изменения наблюдали после теста на «ускоренное старение», когда на хроматограммах образцов препарата жидкой формы регистрировали дополнительный пик, свидетельствующий об образовании фракции фрагментов, в количестве от 1,63 до 22,5 %, тогда как на хроматограмме лиофилизата дополнительный пик отсутствовал. Результаты гель-фильтрации

жидких и сухих образцов иммуноглобулина, выдержанного при стресс-условиях, демонстрировали образование агрегатов в образце жидкой формы в количестве 0,5 % при отсутствии данной фракции в лиофилизированном иммуноглобулине.

ВЫВОДЫ

Таким образом, получен лиофилизированный антирабический иммуноглобулин в оптимальной для потребителя дозе 5 мл, физико-химические и биологические параметры которого соответствуют требованиям нормативной документации. Исследование молекулярных параметров данных образцов, испытанных в тесте на «ускоренное старение» и при стресс-условиях, выявило преимущество лиофилизированной формы, что подтверждается отсутствием в лиофилизате фракций фрагментов и агрегатов. В качестве первичной упаковки при получении лиофилизированного препарата предпочтительнее использование флаконов ФО-1-10 НС-3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Часть 1. — М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». — 2008. — 704 с.
2. Европейская Фармакопея. — Изд. III-2000, V.2.6.20, монография № 0918.
3. Змачинская Т.Б., Анастасиев В.В. Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения // Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. — 2001. — № 1. — С. 70—73.
4. Иммуновенин — первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации / А.Г. Исрафилов [и др.] // Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка,

производство и применение. Материалы Всероссийской конференции. — 2005. — Ч. II. — С. 5—12.

5. Лаптева Л.К., Минакова Л.В., Гавриленкова В.Ю. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячном в зависимости от степени фрагментации IgG // Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. — 1987. — № 4. — С. 44—48.

6. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2010. — Вып. 1 (103). — С. 63—66.

7. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации / Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2010. — Вып. 4 (106). — С. 54—57.

8. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии / Кочкалова Н.Н. [и др.] // Биотехнология. — 2011. — № 5. — С. 80—84.

9. Основы аналитической химии / Под ред. Ю.А. Золотова. — М.: Высш. шк. — 1996. — Т. 1. — С. 319—325.

10. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств / Е.Г. Абрамова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 2 (108). — С. 75—78.

11. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874—99. — М.: Фармакопейный государственный комитет, 2000. — 77 с.

Сведения об авторах

Кочкалова Наталия Николаевна — младший научный сотрудник (e-mail: nkochkalova@mail.ru)

Абрамова Елена Геннадьевна — к.б.н., зав. лаб. профилактических иммуноглобулинов

Никифоров Алексей Константинович — к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе

Киреев Михаил Николаевич — зав. лаб. биохимии

Лобовикова Оксана Анатольевна — к.б.н., зав. ОБТК

Савицкая Лидия Владимировна — врач-бактериолог

Бадарин Сергей Анатольевич — врач-бактериолог

Генералов Сергей Владимирович — научный сотрудник

Шарапова Наталья Анатольевна — младший научный сотрудник

Костылева Наталья Ивановна — врач-бактериолог

Иванов Юрий Васильевич — зав. отделом экспериментальных фармацевтических форм

Н.Ф. Крюкова ¹, С.Н. Адамович ², А.Н. Мирскова ², Е.В. Анганова ³

СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА СТАФИЛОКОККА ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

¹ Нерюнгринская центральная районная больница (Нерюнгри)² Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)³ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

В статье показана возможность использования ряда биологически активных протонных (2-гидроксиэтил)аммониевых ионных жидкостей общей формулы $\text{HN}^+\text{R}_1\text{R}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_{3-n}^+\text{OOCCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}^-$; $\text{R} = \text{H}, \text{Me}$, $\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$; $n = 0-2$ в качестве стимуляторов роста *S. aureus*. Исследовано 24 штамма, выделенных от больных с гнойно-септическими осложнениями из отделения хирургического профиля. Установлено существенное ускорение роста *S. aureus* на питательной среде, содержащей желточно-солевой агар, при добавлении исследованных стимуляторов в концентрациях $10^{-4}-10^{-6}$ вес. %. Предложено применение стимуляторов для разработки усовершенствованной методики ускоренной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных *S. aureus*, что позволит значительно уменьшить время выдачи результата анализа и своевременно назначить адекватное лечение больного.

Ключевые слова: стафилококки, стимуляторы роста, питательная среда

STAPHYLOCOCCUS, STIMULATORS OF GROWTH FOR RAPID DIAGNOSIS OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS

N.F. Kryukova ¹, S.N. Adamovich ², A.N. Mirskova ², E.V. Anganova ³¹ Neryungri Central Regional Hospital, Neryungri² A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk³ Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

The possibility of using biologically active proton (2-hydroxyethyl) ammonium ionic liquids of the general formula $\text{HN}^+\text{R}_1\text{R}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_{3-n}^+\text{OOCCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}^-$; $\text{R} = \text{H}, \text{Me}$, $\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$; $n = 0-2$ as stimulators of growth *S. aureus* shows in the article. 24 strains isolated from patients with purulent-septic complications from the surgical department studied. There are shown a significant acceleration of growth of *S. aureus* in a agar nutrient containing yolk-salt agar, the addition of stimulants tested at concentrations $4.10-6.10$ wt. %. Proposed use of stimulants for the development of improved methods of rapid diagnosis of healthcare-associated infections caused by *S. aureus*, which will greatly reduce the time of issue analysis and prescribe adequate treatment promptly sick.

Key words: Staphylococcus, stimulators of growth, agar nutritium

АКТУАЛЬНОСТЬ

Нерациональное использование антибиотиков и сульфамидных препаратов привело к развитию резистентности к ним многих патогенных микроорганизмов, в первую очередь, стафилококков, и широкому распространению стафилококковых инфекций, принимающих угрожающий характер и являющихся причиной развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), особенно в хирургических отделениях, родильных домах, педиатрических стационарах (язвенные энтероколиты, энтериты, перитониты, эндокардиты, пневмонии, абсцессы легкого, стафилококковый сепсис и др.) [2, 4, 5, 9].

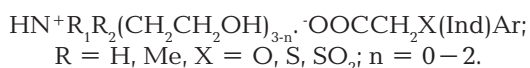
Длительность существующего производства бактериологических анализов негативно сказывается на оказании своевременной медицинской помощи пациенту, усложняя быстрое применение адекватной терапии. Поэтому вопросы ускоренной диагностики инфекций, вызванных стафилококками, являются актуальными.

В настоящее время для культивирования стафилококков применяются питательные среды, на которых длительность выращивания составляет

до 48 часов [7]. В ходе проведения исследований по изучению эпидемиологических и микробиологических особенностей ИСМП выявлено, что перспективным направлением для борьбы с их распространением и сокращением времени выдачи результатов анализа для быстрого назначения больному адекватной антибиотикотерапии может явиться разработка усовершенствованной методики ускоренной диагностики госпитальных инфекций, вызванных *S. aureus*. Для решения поставленной задачи в данной работе изучена возможность оптимизации питательных сред для роста стафилококков путем добавления в среду культивирования стимуляторов роста.

МЕТОДИКА

В качестве стимуляторов роста *S. aureus* впервые исследованы биологически активные соединения, синтезированные в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН — представители нового класса биологически активных протонных (2-гидроксиэтил)аммониевых ионных жидкостей [2, 6, 8, 10] общей формулы:



Их молекулы состоят из катионов протонированных 2-гидроксиэтиламинов и анионов биологически активных арил(индолил)окси-(сульфанил) (сульфонил)уксусных кислот. Известно, что фрагмент $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ -присутствует в молекулах холина, ацетилхолина и коламина, входит в состав фосфолипидов, коэнзима Q, витамина B_{12} . Моноэтаноламин является составной частью кефалинов, а диметилэтаноламин — лецитина, относящихся к классу фосфолипидов. Второй компонент — органические кислоты — также обладают высокой биологической активностью [1]. Так, ароксисукусные кислоты, индолилукусная кислота (гетероауксин) и их производные широко применяются в сельском хозяйстве в качестве гербицидов и стимуляторов роста растений.

Синтезированные (2-гидроксиэтил)аммониевые соли арил(гетерил)(сульфанил)-(сульфонил)уксусных кислот при низкой токсичности ($\text{LD}_{50} = 1300-6000$ мг/кг) проявляют высокую и разнообразную биологическую активность: гемо- и иммуностропную, кардиотропную, противовоспалительную, антитромботическую, антиоксидантную, адаптогенную, гипохолестеринемическую [3, 10], являются высокоэффективными ростстимулирующими препаратами для биотехнологических процессов [6]. Биологическая активность таких 2-гидроксиэтиламмониевых солей существенно превосходит или отличается от активности исходных кислот и алканолламинов.

Соединения данного класса проявляют ростстимулирующую активность в низких концентрациях (преимущественно в интервале $10^{-4} - 10^{-8}$ вес. %), легкодоступны благодаря разработанным нами химическим методам синтеза. Исследованные

в данной работе соединения №№ 1–5 (табл. 1) представляют собой бесцветные кристаллические вещества, имеют постоянный состав, устойчивые при хранении, хорошо растворимые в воде.

Испытания соединений №№ 1–5 в качестве потенциальных стимуляторов роста *S. aureus* проведены на базе бактериологической лаборатории МУЗ Центральной районной больницы г. Нерюнгри (Иркутская область). В работе использованы 24 штамма *S. aureus*, выделенных от больных с гнойно-септическими осложнениями из отделения хирургического профиля. Идентификацию выделенных микроорганизмов оценивали с помощью коммерческих тест-систем «STAPHYtest» фирмы LACHEMA (Чехия) [8].

В ходе испытания проводили растворение каждого потенциального стимулятора роста по следующей методике: растворяли 0,1 г (100,0 мг) вещества в 100,0 мл дистиллированной воды, получая 0,1%-й раствор (матричный). Дальнейшие разведения проводили следующим образом — первое разведение: 0,1 мл матричного 0,1%-го раствора добавляли в 100,0 мл желточно-солевого агара (ЖСА). Концентрация препарата в среде составила 10^{-4} . Второе разведение: 0,1 мл матричного 0,1%-го раствора добавляли в 1000,0 мл ЖСА. Концентрация препарата в среде составила 10^{-5} . В эксперименте использовали каждое разведение препарата в питательной среде и чистую культуру возбудителей ИСМП.

Из культуры золотистого стафилококка готовили взвесь 10^4 в физрастворе по стандарту мутности. Далее брали три разведения препарата в ЖСА, разливали агар по чашкам Петри (по три чашки каждого разведения препарата в питательной среде). На чашки высевали по 0,1 мл приготовленной взвеси золотистого стафилококка и инкубировали при 37 °С. Просмотр чашек производили каждые

Таблица 1

Структура исследованных соединений №№ 1–5

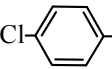
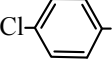
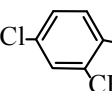
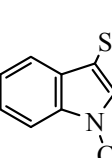
Соединение	Формула
1. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат	 $\text{SCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
2. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлор-фенил-сульфонилацетат	 $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
3. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-2-хлор-фенил-оксиацетат	 $\text{OCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
4. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-2-метил-4-хлор-фенилоксиацетат	 $\text{OCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$
5. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-1-бензил-индол-3-илсульфонилацетат	 $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{COO}^- \cdot \text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_3$

Таблица 2

Всхожесть *S. aureus* в питательной среде со стимуляторами роста №№ 1–5 и на контрольной среде ЖСА

№ стимулятора роста	Время, час	Концентрация, М %		
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
2	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
3	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
4	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
5	3	а	а	а
	6	б	б	б
	9	с	с	с
Контроль (без стимулятора роста)	3	д	«-»	«-»
	6	д	«-»	«-»
	9	а	«-»	«-»

Примечание: а – пылевидный рост микроорганизмов, б – единичные колонии микроорганизмов, с – рост микроорганизмов с выраженной лецитиназной активностью, д – отсутствие роста микроорганизмов, «-» – исследования не проводились.

3 часа, отмечая рост колоний. В качестве контроля были произведены посеы на ЖСА без стимулятора роста.

При применении синтезированных стимуляторов №№ 1 – 5 роста *S. aureus* в среде ЖСА устанавливали всхожесть микроорганизмов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные эксперименты показали значительные различия во всхожести штаммов *S. aureus* на средах со стимуляторами роста разной концентрации, а также на контрольной среде ЖСА. Так, при использовании всех стимуляторов роста при концентрациях 10^{-4} – 10^{-5} вес. %, а также стимулятора № 5 при концентрациях 10^{-4} – 10^{-6} вес. % через 3 часа имел место пылевидный рост микроорганизмов, через 6 часов отмечались единичные колонии, через 9 часов после посева наблюдался рост *S. aureus* с выраженной лецитиназной активностью (табл. 2).

При добавлении в питательную среду стимуляторов роста 1 – 4 в концентрации 10^{-6} вес. % через 3 и 6 часов после посева отмечался пылевидный рост микроорганизмов, через 9 часов – рост единичных колоний.

При посеве исследуемых культур на желточно-солевой агар без стимуляторов роста через 3 и 6 часов роста не отмечалось, и только через 9 часов появлялся пылевидный рост микроорганизмов. За

9 часов культивирования *S. aureus* в контроле не наблюдалось ни роста единичных колоний микроорганизмов, ни роста исследуемых с выраженной лецитиназной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые установлена рост-стимулирующая активность протонных (2-гидрокси-этил)-аммониевых ионных жидкостей общей формулы

$\text{HN}^+\text{R}_1\text{R}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_{3-n} \cdot ^-\text{OOCCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}$;
 $\text{R} = \text{H}, \text{Me}, \text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$; $n = 0 - 2$ в отношении *S. aureus* при добавлении в питательную среду на основе желточно-солевого агара. Предложенная питательная среда для методики ускоренной диагностики ИСМП, вызванных *S. aureus*, содержащая желточно-солевой агар и стимулятор роста, существенно сокращает (до 9 часов) время роста стафилококков (при использовании стимуляторов роста №№ 1 – 4 в концентрациях 10^{-4} – 10^{-5} вес. % и № 5 в концентрациях 10^{-4} – 10^{-6} вес. %). Использование предложенной методики позволяет значительно сократить время выдачи результата анализа для быстрого назначения адекватной антибиотикотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. 2-Гидроксиэтиламмониевые соли органо-сульфанил(сульфонил)уксусных кислот – но-

вых фармакологически активных соединений / А.Н. Мирскова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. — 2011. — Т. 19, № 5. — С. 467–478.

2. Nichols R.L. Preventing Surgical Site Infections // *Clinical Medicine, Research*. — 2004. — Vol. 2 (2). — P. 115–118.

3. Pat. RF 2086239; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1997, 22; Pat. RF 2 080 861; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1997, 16; Pat. RF 2 108 100; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1998, 10, 153; Pat. RF 2 034 540; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1995, 13 (in Russian).

4. Брискин Б.С. Внутрибольничная инфекция и послеоперационные осложнения с позиций хирурга // Инфекции и антимикробная терапия. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 561–583.

5. Внутрибольничные инфекции: Пер. с англ. / Под ред. Р.П. Венцела. — М.: Медицина, 2004. — 840 с.

6. Мирскова А.Н. Алканоламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот — новые стимуляторы биологических процессов // *ЖорХ*. — 2008. — Т. 44, Вып. 10. — С. 1501–1508. (Mirskova A.N., Levkovskaja G.G., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Hydroxyalkylammonium Salts of Organylsulfanyl(sulfonyl)acetic Acids — New Stimulators of Biological Processes. *Russ*

J Org Chem 2008, 44: 1478-1485. DOI: 10.1134/S1070428008100126).

7. Об улучшении медицинской помощи больным с гнойными хирургическими заболеваниями и усилении мероприятий по борьбе с внутрибольничной инфекцией: приказ МЗ СССР № 720 от 31.07.78 г.

8. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. Практические аспекты современной клинической микробиологии. — М.: Лабинформ, 2004. — С. 64–69.

9. Современные особенности эпидемиологии и профилактики септических инфекционных осложнений у больных отделений реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля / В.Г. Акимкин [и др.] // Поликлиника. — 2007. — № 3. — С. 62.

10. Трис-(2-гидроксиэтил) аммоний 2-метил- и 2-метил-4-хлор-феноксиацетаты — эффективные ингибиторы агрегации тромбоцитов и антиоксиданты / А.Н. Мирскова [и др.] // Докл. АН. — 2010. — Т. 433, № 5. — С. 710–712. (Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Tris-(2-Hydroxyethyl)- Ammonium 2-Methyl- and 2-Methyl-4-Chlorophenoxyacetate Serve as Effective Inhibitors of Thrombocyte Aggregation and Antioxidants, *Doklady Biological Sciences, Physiology*, 2010, Vol. 433, pp. 244–246. DOI: 10.1134/S0012496610040022.

Сведения об авторах

Крюкова Наталья Федоровна — врач-бактериолог высшей категории МУЗ «Нерюнгринская центральная районная больница», г. Нерюнгри

Адамович Сергей Николаевич — к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИриХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

Мирскова Анна Николаевна — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)

Анганова Елена Витальевна — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Н.В. Кулакова ¹, Т.А. Болотова ¹, М.А. Хаснатинов ², С.И. Беликов ¹**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ
КЛЕЩЕЙ РОДА *DERMACENTOR* В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)² Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

В работе представлены результаты анализа фрагмента гена митохондриальной 16S рДНК клещей *D. silvarum* и *D. nuttalli*, обитающих в Иркутской области. Установлено высокое генетическое сходство исследованных клещей с 99–100 % идентичностью генов *mt16S rRNA*. По результатам филогенетического анализа все исследуемые клещи также являются близкородственными и принадлежат одной кладе, вместе с образцами *D. nuttalli* и *D. silvarum*, обитающими на территории Китая.

Ключевые слова: *Dermacentor nuttalli*, *Dermacentor silvarum*, ген митохондриальной 16S rRNA, филогенетический анализ

**GENETIC IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS
OF *DERMACENTOR* SP. TICKS IN IRKUTSK REGION**N.V. Kulakova ¹, T.A. Bolotova ¹, M.A. Khasnatinov ², S.I. Belikov ¹¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Here we present the results of the analysis of *mt16S* ribosomal RNA gene of two species of ticks from Irkutsk region – *Dermacentor nuttalli* and *D. silvarum*. The ticks from are closely related to each other with 99–100 % identity of nucleotide sequence of *mt16S rRNA* gene. The phylogenetic analysis has shown that both species are closely related and formed the separate clade together with specimens of *D. nuttalli* and *D. silvarum* from China.

Key words: *Dermacentor nuttalli*, *Dermacentor silvarum*, mitochondrial 16S rRNA, phylogenetic analysis

Иксодовые клещи являются переносчиками ряда заболеваний, среди которых наиболее опасны для человека Лайм-боррелиоз, клещевой энцефалит и клещевой риккетсиоз. Клещи рода *Dermacentor* преимущественно переносят бактерий и риккетсий, зараженность которыми составляет до 70–80 %. В настоящее время на территории Восточной Сибири отмечены два вида клещей, *Dermacentor silvarum* и *Dermacentor nuttalli*, которые обладают схожими фенотипическими признаками, что затрудняет их морфологическое определение. Для генетической идентификации и определения филогенетического положения клещей рода *Dermacentor* нами проанализирован фрагмент гена 16S митохондриальной (mt) ДНК клещей, собранных в Ольхонском и Братском районах Иркутской области.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клещи *Dermacentor sp.* были собраны с помощью флага в окрестностях д. Булук (Братский район) и Ольхонском районе в 2006–2010 гг. Морфологическую идентификацию клещей проводили с помощью определителей Сердюковой и Филипповой [1–3]. ДНК выделяли из индивидуальных клещей с помощью набора Рибо-Сорб (Амписенс, Москва) и амплифицировали в ПЦР с праймерами 16Sf (5'-TTG CTG TGG TAT TTT GAC TA-3') и 16Sr (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC-3') [4]. ПЦР-ампликоны длиной 440 н.п. очищали из 0,8 % геля агарозы, после электрофоретического

анализа. Первичные последовательности ДНК были получены на приборе CEQ8800 (Beckman Coulter, США). Нуклеотидные последовательности выравнивали и редактировали в программе BioEdit [5]. Филогенетический анализ проводили методом Maximum Likelihood (ML), на основе 1000 повторов, с помощью программы Mega 5.0 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе выявления морфологических признаков, исследуемые клещи были определены как *D. nuttalli* и *D. silvarum*. Получено 11 нуклеотидных последовательностей клещей, собранных в Ольхонском районе, и 26 последовательностей клещей из Братского района. В результате анализа митохондриального фрагмента 16S рДНК длиной 380 н.о. обнаружены два переменных участка ТА и Т-повторов, где отмечены вставки и делеции длиной 1–2 н.о., а также две последовательности несли единичные замены по типу трансверсий.

За исключением вставок и делеций в переменных регионах, сходство полученных последовательностей было достаточно высоким, 98,9–100 %. В то же время, сходство с последовательностями *D. silvarum* и *D. nuttalli* из Китая составило 98,9–99,7 %. Несмотря на то, что существенные различия (гетерогенность 4–12 %) наблюдались при сравнении *mt 16S рДНК* других видов рода *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. occidentalis*, *D. hunteri*, *D. reticulatus*, *D. albipictus*, *D. variabilis*, *D. andersoni*, *D. nitens*), все исследуемые последова-

тельности а также последовательности *D. silvarum* и *D. nuttalli* из Китая были высоко гомологичными (гетерогенность 0–1 %), что указывает на их возможную принадлежность к одному виду.

Филогенетическое дерево получено с помощью метода максимального правдоподобия (ML) на основе фрагмента длиной 388 н.о.. В результате филогенетического анализа установлено, что род *Dermacentor* представлен двумя филогенетическими линиями, одна из которых объединяет виды, распространенные в Америке (*D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. variabilis*, *D. albipictus*, *D. nitens*, *D. occidentalis*), а другая представлена видами, сформированными в Евразии (*D. reticulatus*, *D. marginatus*, *D. nuttalli*, *D. silvarum*). В результате построения филогенетических деревьев, показано, что все проанализированные последовательности наиболее близко кластеризовались с *D. nuttalli* и *D. silvarum* из Китая и формировали отдельную кладу. В ближайшую близкородственную кладу вошли последовательности вида *D. marginatus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате анализа фрагмента митохондриальной 16S рДНК степных клещей *D. nuttalli* и *D. silvarum* в двух районах Иркутской области, установлено высокое генетическое сходство исследованных видов клещей с 99–100 % идентичностью генов mt16S rRNA. По результатам филогенетического анализа все исследуемые клещи также являются близкородственными и

принадлежат одной кладе, вместе с образцами *D. nuttalli* и *D. silvarum*, обитающими на территории Китая. Полученные результаты не согласуются с данными морфологической идентификации указанных видов и способствуют дальнейшему рассмотрению вопроса таксономического положения видов *D. nuttalli* и *D. silvarum* с привлечением дополнительных молекулярно-генетических маркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сердюкова Г.В. Иксодовые клещи фауны СССР. — М., Л.: Изд-во АН СССР, 1956. — 122 с.
2. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи. Подсемейства Ixodinae // Фауна СССР. Паукообразные. — Л.: Наука, 1977. — 396 с.
3. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae* // Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. — СПб.: Наука, 1997. — Т. 4. Вып. 5. — 436 с.
4. Black, WC 4th, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1994. — Oct 11, Vol. 91 (21). — P. 10034–10038.
5. Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
6. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar, S., 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution.

Сведения об авторах

Кулакова Нина Викторовна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории Аналитической биоорганической химии ФГБУ науки Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952)511-874)

Болотова Т.А. – студентка биолого-почвенного факультета Иркутского Государственного Университета (664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5; тел. (3952)241-870).

Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971)

Беликов Сергей Иванович – д.б.н., проф., зав. лаб. аналитической биоорганической химии ФГБУ науки Лимнологического института СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3; тел. (3952)511-874)

И.А. Кутырев ¹, Н.М. Бисерова ², Й.П. Шарсак ³, Й. Курц ³ПРОСТАГЛАНДИН E₂ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Москва)³ Университет г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных (Мюнстер, Германия)

Работа посвящена исследованию простагландина E₂ как потенциального иммуномодулятора лентеца чаечного, представляющего важное эпизоотическое и эпидемиологическое значение в озере Байкал и его бассейне. Методом конфокальной микроскопии выявлено, что в организме лентеца чаечного простагландин E₂ продуцируется и секретируется наружу специализированными фронтальными железами. Методом культуры лейкоцитов головного отдела почки исследовано влияние простагландина E₂ на иммунологические реакции рыб (на примере трехиглой колюшки). Выявлено, что данный иммуномодулятор снижает абсолютное содержание лейкоцитов и относительное число лимфоцитов. Несмотря на общее снижение респираторного взрыва лейкоцитов, респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит, остается неизменным.

Ключевые слова: простагландин E₂, иммуномодулятор, цестоды

PROSTAGLANDIN E₂ AS GULL TAPEWORM POTENTIAL IMMUNOMODULATORI.A. Kutyrev ¹, N.M. Biserova ², J.P. Scharsack ³, J. Kurtz ³¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAMS, Ulan-Ude² Biological Faculty, Lomonosov's Moscow State University, Moscow³ Animal Evolutionary Ecology Group, Institute for Evolution and Biodiversity, University of Münster, Münster, Germany

This article is devoted to investigation of prostaglandin E₂ as potential immunomodulator of gull tapeworm. This parasite has an important epizootic and epidemiological significance in the Lake Baikal and its basin. Using confocal microscopy, it was revealed that prostaglandin E₂ is produced and secreted with specialized frontal glands in the organism of gull tapeworm. Using the method of leukocyte culture, the influence of prostaglandin E₂ on immunological reaction of fishes was investigated (by way of example of three-spined stickleback). This immunomodulator decreased the absolute number of leucocytes and percentage of lymphocytes. Despite of total leukocyte respiratory-burst activity decreasing, respiratory-burst activity per 1 granulocyte remains constant.

Key words: prostaglandin E₂, immunomodulator, cestodes

Козволюция паразитов и их хозяев протекает динамично и стремительно. Благодаря своей высокой приспособительной способности и быстрому эволюционированию, паразиты распространены повсеместно. Способность паразитических червей регулировать иммунный ответ позволяет им существовать в организме хозяина длительное время. К настоящему времени изучен широкий спектр веществ, выделяемых гельминтами млекопитающих, которые играют роль иммунорегуляторов в организме хозяина [1, 2]. Иммунорегуляторные молекулы паразитов рыб остаются на сегодняшний день неизученными. Простагландины (PG) представляют собой группу синтезируемых паразитами структурно взаимосвязанных биоактивных липидных медиаторов, вовлеченных в развитие разнообразных симптомов, сопровождающих паразитозы. Одним из наиболее распространенных цестодозов в бассейне озера Байкал является дифиллоботриоз, вызываемый лентецом чаечным *Dipyllobothrium dendriticum* Nitsch., 1824. На фазе плероцеркоида он выступает доминантным паразитом лососевидных рыб подотряда Salmonoidei, а зараженность байкальского омуля *D. dendriticum* достигает 70–100 % [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Криотомные срезы плероцеркоидов *D. dendriticum* (8–10 мкм) в течение суток при температуре 4 °C инкубировали с моноклональными антителами против PG E₂ и α-тубулина (SIGMA, США), затем инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с флуорохромами, в течение 2 ч при температуре 4 °C. Срезы исследовали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SPE (Германия).

Для исследования влияния простагландина E₂ на иммунную систему рыб была использована культура лейкоцитов головного отдела почки трехиглых колюшек [4, 5]. В работе были использованы 22 особи рыб. Исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ СССР. Умерщвление животных осуществляли путем декапитации. В качестве позитивного контроля использовали липополисахариды (LPS). Кроме того, экстракт *S. solidus* (SS) был использован для стимуляции лейкоцитов в сочетании с простагландином E₂. Культура клеток инкубировалась в CO₂-инкубаторе с водяной рубашкой Thermo Scientific в течение

4 суток. Респираторный взрыв оценивался при помощи хемилиуминометра Тесап. Соотношение субпопуляций лейкоцитов — лимфоцитов и гранулоцитов анализировали при помощи проточного цитофлюориметра FACS Canto.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивная PG E₂-like-иммунореакция (ИР) выявлена в крупных клетках, расположенных в зоне кортикальной паренхимы и субтегумента. (рис. 1а, в). При двойном окрашивании срезов антителами к PG E₂ в сочетании с антителами к α-тубулину были выявлены участки наложения

иммунореактивности в тегументальной, субтегументальной областях и паренхиме (рис. 1б, г). PG E₂-like-иммунореактивные участки расположены внутри α-тубулин-иммунореактивных участков и занимают меньшую, по сравнению с ними, площадь.

До сих пор неизвестно, какие клеточные элементы продуцируют иммуномодуляторные молекулы цестод. Впервые выявленные у *D. dendriticum* PG E₂-like-иммунореактивные структуры свидетельствуют о наличии специализированных клеток, выделяющих простагландин E₂ на поверхность тегумента, в ткани хозяина.

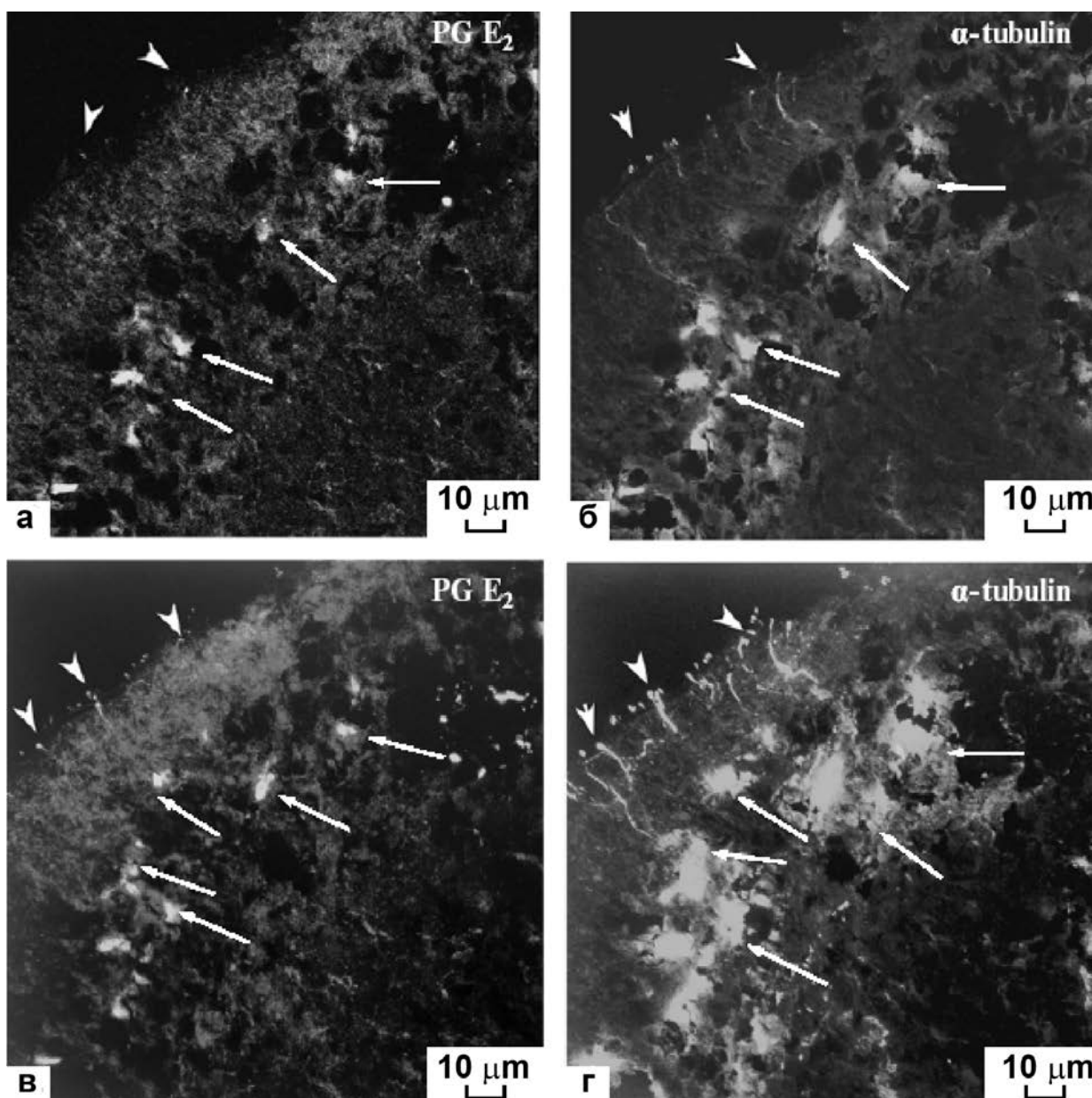


Рис. 1. Иммунореактивность к простагландину E₂ и ацетилированному тубулину в тегументе и паренхиме плероцеркоида *D. dendriticum*. Поперечные срезы, двойное окрашивание. **а** – PG E₂-like-иммунореактивные структуры в тегументе (короткие фигурные стрелки) и кортикальной паренхиме (длинные стрелки); **б** – α-тубулин-иммунореакция в той же области, конфокальная пара с **а**. Показаны иммунореактивные к тубулину клетки (длинные стрелки) с отростками, направленными в тегумент, а также каплевидные структуры на поверхности тегумента (короткие фигурные стрелки); **в** – PG E₂-like-иммунореактивные структуры в тегументе (короткие фигурные стрелки) и кортикальной паренхиме (длинные стрелки); **г** – α-тубулин-иммунореакция в той же области, конфокальная пара с **в**. Обозначения, как на рис. 1б.

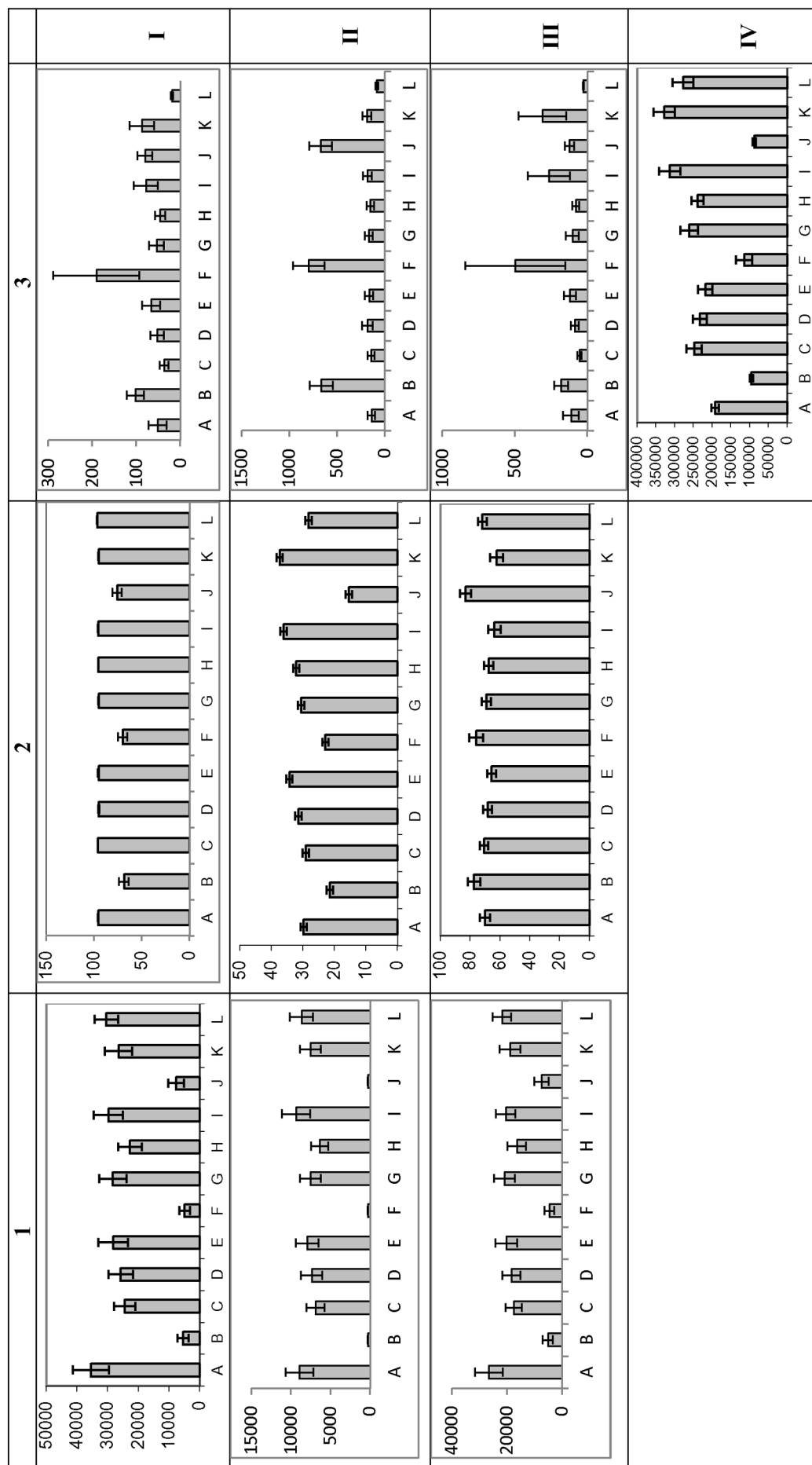


Рис. 2. Изменения характеристик лейкоцитов головного отдела почки трехглазой колюшки при воздействии PGE_2 ($X = M \pm SE$). Характеристики измерены после 4 дней культивирования лейкоцитов. **1** – абсолютное число клеток, **2** – процентное содержание клеток, **3** – процентное содержание клеток. **1-I, 2-I** – лейкоциты. **3-I** – респираторный взрыв в пересчете на 1 лейкоцит. **1-II, 2-II** – лимфоциты. **3-II** – респираторный взрыв в пересчете на 1 лимфоцит. **1-III, 2-III** – гранулоциты. **3-III** – респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит. **IV** – общий респираторный взрыв. А – Контрольная культура клеток, В – $10^{-4}MPGE_2$, С – $10^{-7}MPGE_2$, D – $10^{-10}MPGE_2$, E – экстракт *Shistosomula solidus* (SS), F – $10^{-4}MPGE_2$ + SS, G – $10^{-7}MPGE_2$ + SS, H – $10^{-10}MPGE_2$ + SS, I – липополисахариды (LPS), J – $10^{-4}MPGE_2$ + LPS, K – $10^{-7}MPGE_2$ + LPS, L – $10^{-10}MPGE_2$ + LPS.

Наложение зон иммунореактивности к PG E₂ и α-тубулину свидетельствует о принадлежности иммунореактивных элементов к железистым или нервным клеткам, имеющим укрепленные микротрубочками протоки или отростки и поэтому специфически взаимодействующим с антителами к тубулину. По расположению и ряду морфологических особенностей (форма перикариона, наличие длинных отростков, пронизывающих тегумент, формирование расширений в зоне тегумента, каплевидные структуры на поверхности тела), PG E₂-like-и α-тубулин-иммунореактивные элементы соответствуют железам, выносящим секрет на поверхность тегумента через собственные специализированные протоки. Такие железы присутствуют на всех стадиях онтогенеза дифиллоботриид и относятся к типу фронтальных желез [6]. Они обладают самостоятельными секреторными протоками, армированными субмембранным слоем микротрубочек. Их концевые отделы ограничены от цитоплазмы тегумента мембранами и специализированными контактами, выбрасывая секрет наружу под контролем нервной системы [7]. Ультраструктура желез изучена у некоторых дифиллоботриид, но их функциональная роль неизвестна: им приписывалась адгезивная функция или роль желез проникновения с выделением лизирующего секрета [8].

PG E₂ оказывает наибольший эффект на лейкоциты при максимальной концентрации (10⁻⁴М) как самостоятельно, так и в сочетании с SS и LPS (рис. 2). Он снижает как общее содержание лейкоцитов, так и отдельных субпопуляций. Однако снижение абсолютного числа лимфоцитов более выражено, по сравнению с гранулоцитами. Поэтому процентное содержание гранулоцитов достоверно не изменяется при концентрации 10⁻⁴М PG E₂ и возрастает под воздействием 10⁻⁴М PG E₂ в сочетании с SS и LPS, в противоположность лимфоцитам, процентное содержание которых снижается под воздействием 10⁻⁴М PG E₂.

Общий респираторный взрыв снижается под влиянием 10⁻⁴М PG E₂ как в отдельности, так и в сочетании с SS и LPS. В то же время, под воздействием 10⁻⁴М PG E₂ респираторный взрыв в пересчете на 1 лейкоцит, в частности, на 1 гранулоцит, достоверно не изменяется. В противоположность, респираторный взрыв в пересчете на 1 лимфоцит увеличивается в этом случае. При сочетании 10⁻⁴М PG E₂ с SS и LPS, респираторный взрыв значительно усиливается в пересчете как на 1 лимфоцит, так и 1 гранулоцит.

Поскольку лейкоциты инкубировались в течение 4 суток с вышеуказанными реагентами, можно предположить, что клетки адаптировались к их иммуномодулирующему воздействию. Респираторный взрыв — один из наиболее важных эффекторных механизмов клеточного врожденного иммунитета. Гранулоциты реализуют эту функцию. Нашими исследованиями показано, что, хотя снижается абсолютное и относительное количество лейкоцитов, процентное содержание

гранулоцитов остается неизменным. Таким образом, лейкоциты сохраняют на одном уровне процентное содержание гранулоцитов на фоне снижения процентного содержания самих лейкоцитов. Кроме того, не изменяется респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит. Общий респираторный взрыв снижается только благодаря снижению абсолютного числа лейкоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящим исследованием впервые показано, что цестоды, на примере *D. dendriticum*, могут продуцировать и секретировать PG E₂, используя специализированные фронтальные железы. Впервые показано влияние PG E₂ на культуру лейкоцитов рыб. Таким образом, исследованное вещество может являться иммуномодулятором цестод. PG E₂ в культуре лейкоцитов обладает эффектом, не сходным с экстрактом *S. solidus*. Однако, с другой стороны, данный экстракт — смесь различных биологически активных веществ. В связи с этим, необходимы дальнейшие более подробные исследования биохимического состава цестод, паразитирующих в рыбах.

Авторы выражают благодарность Н.М. Прониной, Т.Г. Бурдуковской (ИОЭБ СО РАН), А.В. Молчанову (РГУ ветеринарии «Бурятская республиканская станция по борьбе с болезнями животных»), Е. Цитрину (ИБР РАН) за помощь в сборе материала и техническую поддержку.

Работа выполнена по проекту СО РАН VI.43.1nпри финансовой поддержке грантов ОП-ТЭК (2012 год), РФФИ № 12-04-98002, Германской службы академических обменов (ДААД, № А/11/04242).

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов В.Г., Бисерова Н.М. Морфология двух типов фронтальных желез *Grillotiaerinaceus* (Cestoda:Trypanorhyncha) // Паразитология. — 1985. — Т. 19, № 1. — С. 32—37.
2. Куперман Б.И. Функциональная морфология низших цестод. — Л.: Наука, 1988. — 167 с.
3. Русинек О.Т. Паразиты рыб озера Байкал (фауна, сообщества, зоогеография, история формирования). — М.: КМК, 2007. — 600 с.
4. Andersen K.I. Ultrastructural Studies on *Dipyllobothrium ditremum* and *D. dendriticum* (Cestoda, Pseudophyllidea) // Parasitol. Res. — 1975. — Vol. 46. — P. 253—264.
5. Habitat specific adaptation of immune responses of stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) lake and river ecotypes / J.P. Scharsack [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. — 2007. — Vol. 274. — P. 1523—1532.
6. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity // Mol. Biochem. Parasit. — 2009. — P. 1—11.
7. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae / S.J. Jenkins [et al.] // Parasite Immunol. — 2005. — Vol. 27. — P. 385—393.

8. Scharsack J.P., Koch K., Hammerschmidt K. its specific vertebrate host // Proc. R. Soc. Lond. — 2007. — Vol. 274. — P. 3151—3158.
Who is in control of the stickleback immune system: interactions between *Schistocephalus solidus* and

Сведения об авторах

Кутырев Иван Александрович – к.б.н., младший научный сотрудник Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, Улан-Удэ, ул. Сахяновой, 6, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, р.т. (3012) 434229)

Бисерова Наталья Михайловна – д.б.н., старший научный сотрудник биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (119991, Москва, Воробьевы горы, 1, Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова)

Шарсак Йорн – к.б.н., научный сотрудник Университета г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных (D-48149, Германия, г. Мюнстер, Хюфферштрассе, 1, Университет г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных)

Курц Йоахим – д.б.н. профессор, заведующий группой (D-48149, Германия, г. Мюнстер, Хюфферштрассе, 1)

М.В. Лахтин, А.Л. Байракова, В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

КОФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ МУЛЬТИКОМПОНЕНТНОГО ПРОБИОТИКА И ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОБИОТИЧЕСКОГО КОМПАРТМЕНТА БИОТОПА НА ПРИМЕРЕ АУТОРЕГУЛЯТОРНОЙ ЛАКТОБАЦИЛЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

С помощью лектинов Ацилакта проведен скрининг клинических изолятов лактобацилл влагалищного биотопа человека. Популяции лактобацилл биотопа классифицированы в функциональные группы по способности реагировать на присутствие лектинов. Результаты указывают на ауторегуляторные сигнальные свойства лектинов пробиотических микроорганизмов.

Ключевые слова: лектины, пробиотик, лактобациллы, микробиоценоз, биотоп

CO-FUNCTIONING OF LECTINS OF MULTICOMPONENT PROBIOTIC AND POTENTIAL PROBIOTIC COMPARTMENT OF BIOTOPE ON THE EXAMPLE OF AUTOREGULATOR LACTOBACILLUS SYSTEM

M.V. Lakhtin, A.L. Bayrakova, V.M. Lakhtin, A.V. Aleshkin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Using lectins of Acilact, clinical isolates of Lactobacillus from vaginal biotope were screened. Lactobacilli of the biotopes were classified to functional groups. Results indicate autoregulation signal properties of probiotic microbial lectins.

Key words: lectins, probiotic, lactobacilli, microbiocenosis, biotope

ВВЕДЕНИЕ

Лектиновые процессы распознавания глико-конъюгатов и регуляции их функционирования широко распространены в биоэкосистемах [3, 9, 11]. Нами из пробиотических штаммов лактобацилл и бифидобактерий человека были впервые выделены и охарактеризованы имитирующие пробиотики синергидные препараты лектинов с набором регуляторных свойств метаболомбиотиков, включающих антимикробное и антипатогенное действие [4, 8, 13]. Однако взаимоотношения лектинов пробиотиков и потенциального пробиотического компартмента биотопа не исследовались.

Цель — изучение влияния лектинов лактобацилл (ЛЛ) пробиотических штаммов на популяции лактобацилл нормофлоры урогенитального биотопа человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источниками лектинов служили ингредиенты штаммы лактобациллярного пробиотика «Ацилакт», видовая принадлежность которых была установлена как *L. casei/paracasei* K₃III₂₄, *L. helveticus* 100аш и *L. helveticus* NK1 [2]. Препараты ЛЛ получали как описано ранее [8]. Исходная концентрация лектинов в физрастворе была 100 мкг/мл. В работе использовали штаммы лактобацилл нормофлоры урогенитального тракта. Лактобациллы выращивали 2–3 суток при 37 °С в анаэробных генбоксах (GENbox, BioVerieux, Франция) на среде *Lactobacillus* MRC Agar (HiMedia Lab., Индия), а также с использованием среды Шадлера [Shaedler] на агаровой основе. Бактерии культивировали в стандартных условиях в присутствии диск-лектинов на агаре или после внесения лектинов в суспензии

бактерий с известной оптической плотностью (D_{540}). Рассчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл с учетом разведений.

Использовали метод серийных разведений для оценки антагонистической активности ЛЛ (табл. 1).

Таблица 1
Взаимодействие ЛЛ с суспензиями штаммов лактобацилл

Штаммы (Группы*)	Разведения препарата					
	1:10 А	1:100 Б	1:1000 В	1:10 Г	1:100 Д	1:1000 Е
2 (II)	5 × 10 ⁷	4 × 10 ⁶	10 ⁶	10 ⁹	3 × 10 ⁸	10 ⁸
9 (I)	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
14 (II)	5 × 10 ⁶	4 × 10 ⁶	10 ⁶	5 × 10 ⁶	3 × 10 ⁶	10 ⁶
15 (I)	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
21 (II)	5 × 10 ⁷	3 × 10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁸	4 × 10 ⁸	10 ⁸
30 (III)	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
51 (II)	5 × 10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	5 × 10 ⁸	3 × 10 ⁸
53 (II)	5 × 10 ⁷	4 × 10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁸	3 × 10 ⁸	10 ⁸
54 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
215 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷
239 (III)	10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
288 (I)	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
296 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	3 × 10 ⁸
664 (I)	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹	5 × 10 ⁹
683 (III)	10 ⁷	5 × 10 ⁷	6 × 10 ⁷	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
856 (II)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁶	10 ⁶

Примечание: суспензии с мутностью 0.5 (А, Б, В) или 5.0 (Г, Д, Е). Даны значения КОЕ/мл. *Группы штаммов с противоположным ответом (II, III) или резистентные к ЛЛ (I).

Определение концентрации культуры по оптической плотности проводили на денсифометре (Densi-la-Meter, Erba Lachema, Чешская Республика). Диск-лектины получали и использовали, как описано ранее [13]. Измеряли на агаре диаметры зон вокруг дисков с отсутствием роста бактерий (табл. 2). Результаты усреднены по трем измерениям.

Таблица 2
Взаимодействие дисковых ЛЛ и изолятов лактобацилл

Штаммы (Группы**)	Разведения препарата			
	1:10 А*	1:10 Б	1:100 В	1:100 Г
2 (II)	14 ± 1	17 ± 1	14 ± 1	19 ± 1
9 (III)	14 ± 1	21 ± 2	14 ± 1	14 ± 1
14 (I)	18 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
15 (II)	14 ± 1	14 ± 1	22 ± 2	24 ± 2
21 (II)	14 ± 1	14 ± 1	16 ± 1	18 ± 1
30 (II)	21 ± 2	35 ± 2	14 ± 1	14 ± 1
51 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
53 (II)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	21 ± 2
54 (II)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	19 ± 1
215 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
239 (III)	16 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	16 ± 1
288 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
296 (II)	18 ± 1	17 ± 1	19 ± 1	21 ± 2
664 (I)	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
683 (I)	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1	17 ± 1
856 (III)	14 ± 1	33 ± 2	14 ± 1	25 ± 2

Примечание: * – исходные суспензии лактобацилл с мутностью 2 (А, В) или 1 (Б, Г). Даны диаметры зон отсутствия роста (мм). **Группы: штаммы с противоположным ответом на ЛЛ (II, III) или резистентные к ЛЛ (I).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблице 1 приведены данные о взаимодействии ЛЛ с лактобациллами в суспензиях. Препарат ЛЛ в разбавлениях в 10 – 1000 раз проявлял бактериоста-

тическое действие в отношении штаммов 296, 2, 14 и 30. Препарат оказывал умеренное бактериостатическое действие на штаммы 21 и 51 при разбавлениях 1:100 и выше. Исследование ЛЛ в более широком диапазоне концентраций в отношении изолята 856 показало выраженное бактериостатическое действие препарата в разбавлениях в 10 – 1000 раз. Значение мутности суспензии (D_{540}) лактобацилл до внесения лектинов мало влияла на характер взаимодействия препарата с клетками, однако более низкая плотность суспензии была предпочтительной при исследовании расширенного спектра свойств лектинов.

Результаты дополнительных исследований различных концентраций препарата в условиях роста культуры на плотной дифференциальной среде в присутствии дисков с ЛЛ подтвердили антагонистическое действие катионных ЛЛ в отношении лактобацилл в разбавлениях 1:10 и 1:100. Результаты приведены в таблице 2. Полученные данные были сходны с результатами, полученными другим методом (табл. 1). Препарат ЛЛ оказывал выраженное или умеренное бактериостатическое действие в отношении ряда штаммов. Суспензии лактобацилл с плотностью 2 позволяли более отчетливо выявлять эффект супрессии роста по сравнению с суспензиями с плотностью 1.

По результатам таблиц 1 и 2 все штаммы были разделены на функциональные группы (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе установлены взаимоотношения между лектинами, продуцируемыми пробиотическими бактериями (их консорциумами, как в случае пробиотика «Ацилакт») и варьирующими популяциями потенциально полезной микрофлоры (на примере лактобацилл). С 2004 года нами было впервые показано, что лектиновые системы потенциального пробиотического компартмента биотопов (на примере лактобацилл и бифидобактерий) реализуют спектр полезных для человека активностей и тем самым участвуют в сигнальных коммуникациях в направлениях «Микроб – Микроб» и «Микроб – Хозяин» [4, 8, 13]. Другими авторами подтверждено наличие у лактобацилл наборов (муцин слизистой

Таблица 3
Группирование популяций лактобацилл нормофлоры урогенитального биотопа лектинами пробиотических лактобацилл человека

Группы	Штаммы	Отношение к лектинам	Предполагаемые функции популяций в биотопе
I	215, 664, 288	Резистентные	Пробиотик-подобные популяции, устойчивые к сигналам экзопробиотиков
II, III	2, 9, 14, 15, 21, 30, 51, 53, 54, 239, 296, 683, 856	Чувствительные	Модулируемый/управляемый пробиотическим компартментом пул популяций
III	14, 15, 51, 54, 296,	Резистентные в одних и слабо супрессируемые в других условиях	Близкие к пробиотик-подобным популяции с обратимыми изменениями
III/I	9, 683	Резистентные в одних и слабо индуцируемые в других условиях	Близкие к пробиотик-подобным популяции с обратимыми изменениями
II/III	30, 856	Выраженно модулируемые	Сенсорные/сигнальные, образующие инфосеть
II	2, 21, 53	Супрессируемые выражено и умеренно	Мишени элиминации пробиотиками: ослабленные, неконкурентные, слабо измененные в сторону патологии
III	239	Индуктируемый	Активный участник чувства кворума, вовлекаемый в регуляцию плотности популяции

кишечника)-связывающих белков с малоисследованными свойствами [7, 10]. Участие белковых компонентов пробиотических бактерий в сети коммуникаций типа чувства кворума [quorum sensing] и перекрестного разговора [cross-talking] в обоих направлениях в настоящее время находит новые подтверждения [5, 6, 10, 12, 14]. Анализ секрета лактобацилл выявил набор типов лектиновых и сходных с лектинами ключевых метаболитных белков, в том числе «сброшенных» с клеточной поверхности [5, 7, 10]. Можно ожидать, экспонирование на поверхности лактобацилл, сходных с препаратом ЛЛ муцинсвязывающих белков (характерно для пробиотических хорошо адгезирующих лактобацилл), не будет приводить к существенным взаимодействиям таких популяций с ЛЛ (возможен скрининг кандидатных пробиотических штаммов). Экспонирование гидрофобных липотейхоевых кислот, наоборот, усилит взаимодействие таких популяций лактобацилл с ЛЛ, что может привести к модуляции дальнейшего роста биомассы. В то же время присутствие на поверхности гидрофильных экзополисахаридов может обеспечить другую направленность сорбции ЛЛ и тем самым вызвать другого рода метаболические активности таких популяций. Вместе можно говорить о влиянии ЛЛ на синергидное кофункционирование потенциального консорциума лактобацилл биотопа. В этом смысле систему «Популяции лактобацилл — эндогенные ЛЛ» можно рассматривать как саморегулирующуюся, обеспечивающую здоровый статус биотопа. Учитывая штаммовый состав Ацилакта [2], можно предположить участие ЛЛ в регуляции межвидовых и внутривидовых взаимоотношений лактобацилл в биотопе.

Результаты нашей работы указывают на то, что лектины пробиотической нормофлоры вовлекаются в процессы чувства кворума лактобацилл в условиях совместной инкубации. Результаты свидетельствуют о наличии ауторегуляторных дифференцированно модулирующих рост популяций лактобацилл активностей лектинов пробиотиков. Полученные данные подтверждаются и другими исследователями, показавшими, что изменение локальной концентрации (плотности суспензии) популяций лактобацилл в условиях выживания и стресса регулирует метаболическую сеть и обратимый морфогенез лактобацилл [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, полученные результаты расширяют представления о ключевых функциях лектинов пробиотических микроорганизмов в организме человека. Пробиотические лектины, по-видимому, не только осуществляют надзор против экспрессии негативных свойств условно-патогенной микрофлоры (потенциально патогенного компартмента биотопа) и поддерживают защитные системы хозяина, но и участвуют в сигнальном мониторинге поддержки здорового статуса биотопа. Полученные данные указывают на новые перспективные области применения лектинов пробиотиков в

индустриальной (скрининг и отбор про- и синбиотических консорциумов) и медицинской (использование лектинов как вспомогательных ингредиентов лекарств) биотехнологии и микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям / Н.А. Голод [и др.] // Микробиология. — 2011. — Т. 78. — С. 317–335.
2. Ботина С.Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии : автореферат дис. ... д.б.н. — М., 2011. — 46 с.
3. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека / М.В. Лахтин [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 1. — С. 27–36.
4. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма / М.В. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2010. — № 2. — С. 3–8.
5. Шендеров Б.А. Молекулярный язык пробиотических микроорганизмов // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. — 2009. — № 1. — С. 47–48.
6. Alcantara C., Revilla-Guarinos A., Zuniga M. Influence of two-component signal transduction systems of *Lactobacillus casei* BL23 on tolerance to stress conditions // Appl. Environ. Microbiol. — 2011. — Vol. 77. — P. 1516–1519.
7. LAB-Secretome: a genome-scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface-associated proteins of lactic acid bacteria / M. Zhou [et al.] // BMC Genomics. — 2010. — Vol. 11. — P. 651; www.biomedcentral.com/1471-2164/11/651
8. Lactobacillus and bifidobacterial lectins as possible signal molecules regulating intra- and interpopulation bacteria-bacteria and host-bacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physicochemical characterization and some biological activity investigation / V.M. Lakhtin [et al.] // Microb. Ecol. Health. Dis. — 2006. — Vol. 18, N 1. — P. 55–60.
9. Lakhtin V., Lakhtin M., Aleshkin V. Lectins of living organisms. The overview // Anaerobe. — 2011. — Vol. 17, N 6. — P. 452–455. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.06.004.
10. Lebeer S., Van Der Leyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2008. — Vol. 72. — P. 728–764.
11. Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily / M. Lakhtin [et al.] // Beneficial Microbes. — 2011. — Vol. 2, N 2. — P. 155–165. DOI: 10.3920/BM2010.0014.
12. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide / D. Bernardo [et al.] // PLoS ONE. — 2012. — Vol. 7 (5): e36262. DOI:10.1371/journal.pone.0036262
13. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus*

aureus clinical strains: new class of pathogen biofilm destructors / M. Lakhtin [et al.] // *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. — 2010. — Vol. 2, N 3. — P. 186 — 196. DOI: 10.1007/s12602-010-9046-3.

14. QS-системы у бактерий и перспективы создания новых метаболитных пробиотических препаратов / Л.Н. Петров [и др.] // *Вестник РАМН*. — 2006. — № 1. — С. 38 — 45.

Сведения об авторах

Лактин Михаил Владимирович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Байракова Александра Львовна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лактин Владимир Михайлович — доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Андрей Владимирович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

М.В. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.М. Лахтин, В.А. Алешкин

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ВЫЖИВАНИЯ И ГИБЕЛИ АССОЦИАТОВ МИКРОБНЫХ ПАТОГЕНОВ В ПРИСУТСТВИИ ЛЕКТИНОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ: ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ТЕРАПИИ

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

Предложена и развита концепция прогнозируемых ответов массива микробиоты в условиях системно локализованных лектинов пробиотиков. Она позволяет оценивать поведение ассоциата патогена как коммуникативного организма. Сформулированы правила поведения эукариотического патогена в присутствии каскада пробиотических лектинов. Предложены новые критерии патогенности. Развита концепция поможет конструировать детерминированные ландшафты и метаболические состояния микробиоценозов для медицинской биотехнологии.

Ключевые слова: ассоциатные микробиоценозы, лектины пробиотиков, патогены

PREDICTING SURVIVAL AND DEATH OF MICROBIAL PATHOGEN ASSOCIATES IN THE PRESENCE OF LECTINS OF PROBIOTICS: SIGNIFICANCE FOR THERAPY

M.V. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.M. Lakhtin, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Developed by us conception of micropathogen associate acting like communicative organism was proposed. It allows predicting some pathogen responses to the presence of systemic localized lectins of probiotics. The rules of eukaryotic pathogen behavior in the presence of cascade probiotic lectins are formulated. New criteria of pathogenicity are described. The data will provide understanding the relationships of microbiota in biotopes as well as constructing directed space cascades of microbiocenose landscapes for medical biotechnology.

Key words: associated microbiocenoses, lectins of probiotics, pathogens

ВВЕДЕНИЕ

В условиях химиотерапии и радиотерапии в организме пациентов нарушается баланс нормофлоры, повышается выраженность эукариотических патогенов и ассоциатов микробных патогенов (АМП) [2]. Среди микроорганизмов и бактерий распространены наборы гликопротеиновых поверхностных регуляторов, противопоставленных в микробиоценозах функционально и организационно лектинам пробиотиков (ЛП) [6, 8, 12]. Мы исследовали поведение грибковых и стафилококковых ассоциатов в условиях их пролонгированного роста и выживания на твердых агаровых средах и в составе суспензий в присутствии ЛП [4, 10, 13]. При этом ЛП имитируют свойства пробиотиков [1].

Цель работы — суммирование собственных данных в рамках развития концепции предсказуемых ответов АМП на присутствие ЛП.

Концепция выживания АМП как коммуникационного тела

Признаки коммуникационного тела кандид:

- Разметка территории (симметричная, секторная, пограничная, поздняя или ранняя) [1, 10].
- Быстрое формирование внешней границы АМП.
- Максимальный захват пространства.
- Способность формировать ниши и валы (в том числе гребни по периметру круга чашки, нависающие над дисками и т.д.) в ответ на стресс.
- Способность к псевдоорганогенезу в коммуникационном биополе популяций клеток. Формирование функционально различных псевдоподий

и концевых «буров» (скоплений — выпячиваний соответственно организованных градиентов определенных субпопуляций клеток АМП) [9]. Это следует из различий организации и функционирования тела микрогриба в центральных и периферических областях массива.

- Узнавание образов и создание преемственной последовательности ответных инфообразов (их «сложение» из первоначальных «двоичных» ответов типа «Лакуна-Вал») сигналов стресса по всей территории АМП; необратимое расходование территории на размещение образов; влияние предшествующих изображений на форму последующих; превращение массива гриба в островковый ландшафт [9] (для терапии: возможности разработки алгоритмов распознавания образов грибами; выбор алгоритмов направленного воздействия на АМП).
- Каннибализм, безотходные утилизация и перераспределение собственных ресурсов и биоматериала в направлении благоприятных для выживания областей, апоптоз пограничных сенсорных стрессовых популяций и в рамках ответов типа «двоичных» образов «Лакуна + Вал» [9] (для терапии: возможности использования аутопсевдоантагонизма и апоптоза для борьбы с АМП).

Концепция предсказуемых ответов АМП на присутствие ЛП [1, 5, 9, 10, 13]

Принципы и правила поведения системы «АМП — ЛП»:

- Существование карт оптимального расположения (распределения) антимикробных точек (дотов), зависящих от конфигурации массива патогена, для заданного ЛП-воздействия на АМП (распределения ЛП в рамках деления массива на неблагоприятные и благоприятные для выживания патогена области занимаемой территории) [10] (для терапии: проектирование эффективных оптимальных мозаичных ландшафтных каскадных комбинаций антимикробных мультидотов, в том числе с учетом выбранной мишени в составе мультивидового АМП).
- Скоординированное синергидное направление развития ЛП-эффекта против АМП (центробежное и/или центростремительное через массив, влево и/или вправо по периметрам массива, вверх и вниз в трехмерной проекции) [10, 13] (для терапии: возможности задания необходимого направления ЛП-воздействия на патоген, в том числе с учетом прогнозируемого биоискривления биопространства, когда, например, под воздействием соседних периферических ЛП-дотов синергидно искривляются первоначально прямые оси разметки территории гриба, соединяющие периферические доты с центральным [5]).
- Синергидное широкополосное проявление действия против АМП в периферической области массива при соседнем расположении двух ЛП-дотов в периферической области, приближенной к границе АМП (для терапии: возможность локализации АМП приграничными полосами анти-АМП-зон с целью временной консервации массива и недопущения дальнейшего его разрастания).
- Синергидная реализация сложных конфигураций (круговой и других) анти-АМП-зон (вторичных измененных образных ответов) при расположении соседних ЛП-дотов в периферической области массива (для терапии: возможность формирования дополнительных, расширяющих предшествующие, анти-АМП-зон путем расположения/ перераспределения ЛП-дотов в прогнозируемых для этого местах повышенной эффективности).
- АМП грамположительных бактерий (стафилококков) с нарушенной сборкой и метаболизмом в присутствии лектинов лактобацилл и/или бифидобактерий (для терапии: прогнозируемая ЛП-зависимая направленная деградация биопленок [3]).
- Отсутствие роста аспергиллов в местах реализованного действия ЛП против кандид (меченых грибом местах анти-АМП-действия для себя и близких в таксономическом отношении организмов: пограничной и околоцентральной анти-АМП-областях [7] (для терапии: возможность прерывания микробных экологических цепочек патогенов, в том числе в составе АМП, с использованием ЛП).

Из вышесказанного следует, что устранение АМП должно осуществляться как лечение системных болезней — синергидными препаратами си-

стемного действия (в том числе посредством приема лекарств внутрь с последующей доставкой кровью), а в случае грибковых инфекций — в сочетании (одновременном или в близких временных режимах) с внешним воздействием препаратов (в каждом конкретном случае) через кожу, легкие, слизистые, а также с использованием физиотерапии.

Новые признаки патогенности АМП (на примере кандид):

- Устойчивость массива к деградации в присутствии ЛП (на фоне варьирующей устойчивости к антибиотикам), в том числе в максимально благополучных местах для выживания (в центральных, внутренних защищенных областях [10] (для терапии: возможность тактики нарушения/разрыхления границ с последующей деградацией всех АМП).

- Отсутствие ландшафтного искривления под воздействием препаратов в центральной околодисковой области прямых разметочных линий «периферический диск — центральный диск» как следствие резистентности патогена к антимикробным факторам.

- Способность АМП к скачкообразному (переход одного качества в другое) переключению ландшафта, метаболического состояния и развитию волнового направленного процесса изменений по всему непрерывному массиву в присутствии ЛП [13] (для терапии: возможность учета процессов переключения в выборе комбинаций эффективных антимикробных препаратов).

- Выраженность обратной связи, когда потенциально более вирулентные АМП (например, продуцирующий гидролазные факторы вирулентности штаммы или виды) инициируют более выраженную антагонистическую активность ЛП (существование эволюционно закрепленной обратной связи противопоставленных компартментов в микробиоценозах биотопов) [5, 11] (для терапии: конструирование чувствительных и спаренных с метаболизмом патогена противодействующих специфичных лектиновых систем, в том числе биодеградирующих с образованием антимикробных сигналов и эффекторов).

- Необходимость поиска мультисинергидных комбинаций ЛП и антибиотиков против АМП [5] (для терапии: возможность одновременного сравнительного тестирования вариантов мультисинергизма между наборами из вальирующих трех дисковых носителей эффекторов против АМП) [1, 5, 10].

Описанные выше принципы и правила поведения АМП в присутствии ЛП являются базовыми для прогнозирования, дают новые подходы к оценке патогенности эукариотических микроорганизмов и разработке эффективных каскадных препаратов и схем борьбы с патогеном. В частности, концепции позволяют прогнозировать развитие дрожжевых ландшафтов со сменой метаболических состояний под воздействием ЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепция прогнозируемых ответов указывает на широкие возможности прогнозируемого

использования бесклеточных ЛП против АМП. Она может служить руководством для скрининга патогенности штаммов, а также при испытании системных и каскадных антимикотических и антибиотик-подобных препаратов, в том числе в вариантах мультисинергизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. Борьба за пространство и ресурсы между пробиотическим и условно патогенным компартментами в потенциальном биотопе: лектиновые имитаторы пробиотиков против эукариотических патогенов — значение для биотехнологии // Ключови выпроси в съвременната наука : материали за 8-а международна научна практична конференция. — 2012. — Т. 28. — С. 28—33 (Биологии. Селско стопанство. София. «Бял ГРАД-БГ» ООД, ISBN 978-966-8736-05-6).
2. Лектины пробиотиков при химиотерапии рака / В.М. Лахтин [и др.] // Сопроводительная фитотерапия в онкологии : сб. материалов международной НПК, 24—25 марта, Москва. — М., 2012. — С. 153—157.
3. М.В. Лахтин [и др.] Биопленки грамположительных бактерий с нарушенными сборкой и метаболизмом в присутствии лектинов лактобацилл и бифидобактерий: прогнозируемая деградация биопленок // Научное пространство Европы : сб. материалов международной НПК, 7—15 апреля, 2012, Польша. — Т. 32. — С. 57—63 (Materiały VIII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Naukowa przestrzeń Europy — 2012» Volume 32. — P. 50-57. Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia. ISBN 978-966-8736-05-6).
4. Поведение *Candida tropicalis* и *Candida krusei* в присутствии пробиотических лектинов / М.В. Лахтин [и др.] // Астраханский медицинский журнал. — 2011. — № 3. — С. 97—101.
5. Поведение патогенных грибов рода *Candida* в присутствии пробиотических лектинов / М.В. Лахтин [и др.] // Астраханский мед. ж. — 2011. — № 2. — С. 73—76.
6. Пробиотические лектины человека в защите от дисбиозов в различных биотопах человека / М.В. Лахтин [и др.] // Практ. фитотер. — 2011. — № 1. — С. 4—13.
7. Противогрибной потенциал лектиновых пробиотических и фитопрепаратов: типы, механизмы и факторы действия против патогенных грибов человека / М.В. Лахтин [и др.] // Практ. фитотерапия. — 2009. — № 4. — С. 17—25.
8. Роль лектинов пробиотических микроорганизмов в жизнеобеспечении макроорганизма / М.В. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2010. — № 2. — С. 3—8.
9. Фито- и пробиотик-аналоговая терапия грибных инфекций: теория и практический потенциал в развитии / М.В. Лахтин [и др.] // ARS MEDICA. — 2011. — № 15. — С. 183—187 (ISSN 2220-5497).
10. Фито- и пробиотические лектины — синергичные антипатогены / М.В. Лахтин [и др.] // Практ. фитотерапия. — 2010. — № 1. — С. 5—11.
11. Interaction of probiotic bacterial lectins to *Candida* species / M. Lakhtin [et al.] // Науки и технологии: шаг в будущее : Сб. статей VIII международной научно-практической конференции, 27 марта — 5 апреля, 2012, Прага, Чехия. — Т. 29. — С. 34—41 (Materiály VIII mezinárodní vědecko-praktická conference «Věda a technologie: krok do budoucnosti — 2012». — Díl 29. Biologické vědy: Praha. Publishing House «Education and Science». ISBN 978-966-8736-05-6).
12. Lectins of beneficial microbes: system organization, functioning and functional superfamily / M. Lakhtin [et al.] // Beneficial Microbes. — 2011. — Vol. 2. — P. 155—165 (DOI: 10.3920/BM2010.0014).
13. Probiotic lactobacillus and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: New class of pathogen biofilm destructors / M. Lakhtin [et al.] // Probiotics & Antimicrobial Proteins. — 2010. — Vol. 2. — P. 186—196 (DOI: 10.1007/s12602-010-9046-3).

Сведения об авторах

Лахтин Михаил Владимирович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Владимир Михайлович — доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

М.В. Лахтин, В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, Ю.В. Кулакова, Е.В. Беликова,
Ю.В. Агапова

ЭКЗОПОЛИМЕРЫ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ И БИФИДОБАКТЕРИЙ (НОВЫЕ ПОДХОДЫ И СВОЙСТВА)

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

Обобщены результаты собственных электрофоретических и сопутствующих исследований экзополимерных соединений (ЭПС) пробиотических лактобацилл и бифидобактерий. ЭПС лактобацилл были значительно менее выражены и обладали меньшим сродством к флуоресцентному красителю, чем в ЭПС бифидобактерий. Впервые идентифицированы системы высокомолекулярных биосурфактантов лактобацилл и бифидобактерий, а также описаны варианты электрофоретических сборочных слоевых градиентов ЭПС бифидобактерий с белковым ядром в пористом гидрофильном геле. Выявлены катионные предшественники биосурфактантов. Описаны некоторые новые перспективные свойства ЭПС. Используемые подходы удобны для скрининга продуцентов ЭПС и мониторинга их потребления и деградации. Электрофорез в пористом геле может быть использован для получения сборочных градиентов ассоциатов ЭПС, (глико)протеинов и (глико)липидов.

Ключевые слова: ЭПС, пробиотики, электрофорез, флуоресценция

EXOPOLYMERS OF PROBIOTIC LACTOBACILLI AND BIFIDOBACTERIA (NEW APPROACHES AND FEATURES)

M.V. Lakhtin, V.M. Lakhtin, A.V. Aleshkin, S.S. Afanasiev, Y.V. Kulakova, Y.V. Belikova,
Y.V. Agapova

G.N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

This paper summarizes the results of electrophoretic and other studies of exopolymeric substances (EPS) of probiotic lactobacilli and bifidobacteria of human origin. It finds that EPS of lactobacilli were significantly less produced and low stained with fluorescent dye compared to bifidobacterial ones. For the first time, the systems of biosurfactants of bacilli and bifidobacteria were identified. Also the pictures of physical layer EPS gradients of bifidobacteria were described for the first time. Part of EPS included cationic latent biosurfactants. Perspective features of EPS are described. The used approaches are suitable for both screening probiotic producers of EPS and monitoring EPS consumption or degradation. Electrophoresis in pore gels can be used for obtaining directed 3D gradients of EPS associated with (glyco)proteins and (glyco)lipids.

Key words: EPS, probiotics, electrophoreses, fluorescence

ВВЕДЕНИЕ

Экзополимерные соединения (ЭПС: экзополисахаридные и другие), культуральных жидкостей (КЖ) пробиотических микроорганизмов широко применяются в качестве профилактических и лечебных препаратов различной направленности. Новые подходы в исследовании ЭПС, разработанные и использованные нами, могут помочь в выявлении новых перспективных для биотехнологии свойств биополимеров [1–8].

Цель: обобщить результаты собственных исследований свойств ЭПС супернатантов (С) индустриальных штаммов пробиотических лактобацилл и бифидобактерий человека — ключевых ингредиентов широкого ряда пробиотиков.

МЕТОДЫ

Исследовали пробиотические штаммы *Lactobacillus helveticus* (*L. acidophilus*) NK1 и 100_{аш}, *L. casei/paracasei* (*L. acidophilus*) K₃III₂₄ (ингредиентные штаммы Ацилакта), *Bifidobacterium adolescentis* MC-42, *B. bifidum* № 1, *B. bifidum* X, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve*, *B. gallinarum* ГБ и *S. thermophilus lactis*, а также отечественные пробиотики Ацилакт, Бифидин, Бификол и Колибактерин.

Использовали растущие в обезжиренном молоке, гидролизате казеина с автолизатом дрожжей (казеин-дрожжевой среде — далее КДС) или Бифидум-среде (БС, п. Оболенск, Моск. обл.) бактерии. Из КЖ получали концентрат микрофильтрацией С через Steriflip (Millipore) и мембранной ультрафильтрацией в Centricon Plus-20 (Millipore). С помощью изоэлектрофокусирования (ИЭФ) ЭПС (более 27 кД) разделяли в пластине полиакриламидном геле (ПААГ) в градиенте pH 4–8 в присутствии мочевины (ночь, 10 °С), электрооблаторовали (удаление примесей) на иммобилон-Р (Millipore). Молекулярные массы определяли электрофорезом в ПААГ в присутствии детергента в системе Леммли. Гели и блоты проявляли флуоресцентным красителем SYPRO Ruby (www.probes.com/syprodyes) Флуоресценцию регистрировали в камере BioChem System (UVP, Calif.). Анализ картин проводили с помощью программного обеспечения Labworks4. Использовали спектрофотометрические методы определения белков и ЭПС. Биосурфактанты (Б) определяли модифицированным методом Youssef et al. (2005). Антифризные свойства ЭПС исследовали в условиях длительного ИЭФ в ПААГ (ночь, 8 °С).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рост бактерий в КДС (37°C, 18–24 ч). Проведен функционально-протеомный анализ потенциальных антимикробных белковых систем Ацилакта и составляющих его штаммов. Белки лактобацилл характеризовались присутствием наборов 8 выраженных групп, относительное содержание которых снижалась в ряду: (59–61 кД) > (200–250) > (27–28) > (49–51) > (34–36) > (18–20) > (14–16) > (11–13). Белки 21–33 кД (5–6 полос с pI 7.15–7.60) были ассоциированы (располагались в замкнутом контуре ЭПС) с (глико)липидными идентичными высокомолекулярными Б Ацилакта и NK1 (NK1 >> Ацилакт), которые маскировали эти белки (были ассоциированы с ними). С помощью ИЭФ в ПААГ идентифицированы 29 белков в составе 4-х блоков: блок-1 (pI 4.4–5.37; 7 полос); блок-2 (pI 5.37–6.10; 6 полос); блок-3 (pI 6.15–6.9; 7 полос); блок-4 (pI 7.0–8.0; 9 полос). Структура блока-1 у NK1, *B. adolescentis* MC-42 и *S. thermophilus lactis* была сходной. Два типа ЭПС (в виде совмещенных замкнутых контуров с единым центром; «двуслойных» с различной молекулярной массой; верхний слой вызывает более сильное набухание ПААГ) в блоке-4 NK1 и Ацилакта (расхождение у Ацилакта вначале верхнего слоя ЭПС с большим диаметром замкнутого контура) отсутствовали у K_3III_{24} и 100_{аш}. Клеточно-стеночные наборы белков Ацилакта и штаммов были индивидуальными (штамм-зависимыми) и локализовались в области pI 4–6 (18 полос у Ацилакта). Распределение белков у Ацилакта было сходным с NK1. Максимальные различия между Ацилакта и штаммами выявлялись при pI 6–7 на фоне установленного максимального антимикробного потенциала у Ацилакта (в сравнении с ингредиентными штаммами).

Известно, что Б действуют как альтернативные антимикробные гликолипидные агенты (детергентные кофакторы), характеризующие штамм. Были проведены скрининг и электрофоретическое определение Б. Степень действия Б (диаметры кругов просветления слоя минерального масла на поверхности воды после капельного внесения содержащего Б концентрата С) снижалась в ряду: *B. bifidum* 1 (6.0–2.8 мм, диаметры просветления) > *B. gallinarum* (5.2–3.3) > K_3III_{24} (4.2–2.7) > Ацилакт (4.0–2.8) > 100_{аш} (3.0–2.4) > *B. adolescents* MC-42 (2.8–2.5) > NK1 (2.6–1.0). Кроме того, максимально высокий уровень Б наблюдался у *S. thermophilus lactis*, высокие уровни — у *B. longum*, *B. breve*, средний — у Бификола, низкие уровни — у *B. infantis* и Колибактерина. Выявлялись различия между Б генераций штамма (на примере *B. gallinarum* ГБ). Активности Б в составе концентратов были устойчивы при хранении более года при –35 °С. С помощью электрофореза идентифицированы латентные высокомолекулярные предшественники Б, проявляющие родо- и видоспецифичность и ассоциированные с децентрализованными по отношению к круговым конфигурациям ЭПС катионными белками

pI 7.2–7.6 (лактобациллярными) или pI 7.4–8 (бифидобактериальными). Положение белков в поле Б у лактобацилл (три мажорных более высокомолекулярных плюс два минорных с меньшей молекулярной массой), и у бифидобактерий (два мажорных более высокомолекулярных плюс два слегка менее выраженных, но с меньшей молекулярной массой: все превосходят по интенсивности флуоресценции лактобациллярные белки в Б) было смещено (децентрализовано) в сторону снижения молекулярной массы. Мажорные формы Б обнаруживались в интервалах 21–33 кД (плюс слабо окрашиваемая минорная форма 27–42 кД с радиусом в геле в 2.4 раза меньшим, чем у мажорной формы) или 20–28 кД (плюс в равной с мажорной формой степени окрашивания минорная форма 17–21 кД с радиусом в геле в 2.7 раза меньшим, чем у мажорной формы) в случае лактобацилл или бифидобактерий, соответственно (характер взаимодействия Б с красителем различался, что указывало на различную химическую природу Б лактобацилл и бифидобактерий). Их выраженность при разделении посредством ИЭФ в ПААГ снижалась в порядке: NK1 (2 типа ЭПС) > 100_{аш} (1 тип) > Ацилакт (преимущественно 1 тип) > K_3III_{24} (следы) > *S. thermophilus lactis* (нет). Такой ряд снижения отражал степень превращения (потребления, расходования) латентных высокомолекулярных (21–42 или 17–28 кД в случае лактобацилл или бифидобактерий, соответственно) в активные низкомолекулярные Б (смотри выше ранжированные активности Б в отношении минерального масла). Таким образом, по электрофоретическому профилю высокомолекулярных Б можно было прогнозировать биологическую активность Б.

После разделения концентратов в ПААГ антифризные свойства были максимально выражены у NK1 (белковые антифризы с pI 7.1–7.4) и 100_{аш} (не белковые антифризы с pI 7.5–8). В катионной области геля у этих штаммов были выражены ЭПС (регистрировалось набухание геля). Слабовыраженные белки, ассоциированные с Б, в случае Ацилакта не защищали содержимое пор ПААГ от кристаллообразования, а почти невидимый белок (гликопротеин) у 100_{аш} в области Б проявлял себя как отличный от NK1 компонент антифриза. После кипячения концентрата 5 мин с детергентом наблюдалась максимальная защита от кристаллообразования (вклад детергента и Б), прямо коррелирующая с выраженностью видимого белкового материала в треках лактобацилл. В целом, в области pI 4.5–8 антикристаллообразование снижалось в ряду NK1 ≥ Ацилакт >> 100_{аш}. В области расположения катионных Б встречаемость кристаллов снижалась: 100_{аш} > Ацилакт > NK1. В слабокислой области, примыкающей к Б, видимость кристаллов снижалась как 100_{аш} >> Ацилакт > NK1 (нет). В случае бифидобактерий антикристаллообразование снижалось в ряду: № 1 (нет кристаллов в треке) > MC-42 (несколько кристаллов при pI 4–5) > ГБ (слабые кристаллы при pI 7). В случае

препаратов, обработанных LiCl, антикристаллообразование снижалась в ряду: Ац (кристаллы только при pI 7–7.5; недостаточное присутствие ЭПС) > 100_{аш} (кристаллы при pI 4–7; присутствие катионных ЭПС) > NK1 (кристаллы вдоль всего трека; вклад кристаллизующихся белков слоев поверхности лактобацилл).

Рост в обезжиренном молоке (этап образования сгустка С). Наблюдались штамм-типизируемые картины флуоресценции. В КЖ штаммов NK1, K₃III₂₄ и 100_{аш} идентифицированы 36 групп белков в составе 4-х блоков: 1 (pI 4.0–5.4; 12 полос), 2 (pI 5.4–6.1; 9 полос), 3 (pI 6.1–6.9; 8 полос) и 4 (pI 7.0–8.0; не менее 7 полос). В случае K₃III₂₄ блоки (как и в условиях роста в КДС) характеризовались увеличенной протяженностью вдоль градиента pH и уреженностью полос. Ацилакт характеризовался суммированным набором белков штаммов, а в условиях роста в КДС — максимальным их протезолизом. NK1 и Ацилакт имели сходную структуру блока-4 (в условиях роста в КДС высокомолекулярные Б этого блока расходовались, особенно у Ацилакта). При росте в различных средах 100_{аш} проявлял промежуточную выраженность блоков 3 и 4. Блок-2 был наименее выраженным у МС-42. В случае *B. bifidum* № 1 выраженность блоков снижалась в ряду 1 >> 3 > 2 > 4. Картины полос блоков 1, 2 и 3 *B. bifidum* № 1 дополняли таковые штамма МС-42. Белковые наборы блока-1 штаммов № 1, K₃III₂₄ и 100_{аш} также были взаимодополняемыми (возможно взаимное донорство компонентов при конструировании пробиотических смесей). В случаях K₃III₂₄ и Ацилакта выявлялся тип деградированного ЭПС с повышенными значениями pI , не обнаруживаемый в условиях роста в КДС. По-видимому, это — результат действия деполимеризующих факторов с молекулярной массой ниже 27 кД (то есть ЭПС-дестабилизирующие факторы могут быть устранены на этапе мембранной ультрафильтрации).

Рост бифидобактерий в БС. Наблюдалось штамм-типизируемое распределение около 40 флуоресцирующих белковых полос в составе 15 субблоков 4 главных блоков: сильно кислого — 1 (3 субблока), средне- и слабокислого — 2 (по 3 субблока) и 3 (3 субблока) и катионного — 4 (3 субблока). Ку-масси R-250, хотя и выявлял большое число белков, но устранял их видимую сблоченность белковую и индивидуальность штаммов. Белковые картины были взаимодополняемыми. В случае *B. bifidum* X и *B. gallinarum* все блоки были выраженными и протяженными (значительные различия между блоками 2 и 3). Родовые и видовые признаки выявлялись в блоке-4 (его более или менее щелочной области, соответственно) — наиболее устойчивом к протеолизу блоке. Блок-4 позволял судить о способности штамма продуцировать ЭПС в интервале pI 7-9 (особенно в случаях *B. bifidum* X, *B. bifidum* № 1, *B. infantis* и *B. gallinarum*). Присутствие ЭПС (как коллоидобразующих и антифризных заполнителей пор сорбентов) приводило к набуханию геля, повышению его криопротекторных свойств.

Бифидин и Бификол характеризовались преимущественно выраженным блоком-2 или 1, соответственно. У Бификола блоки 3 и 4 выявлялись лишь как следовые (выявляемые лишь при специальном редактировании флуоресцентных образов; блоки содержали по 3 субблока с различающимся относительным содержанием). Отсутствие блока-4 коррелировало с отсутствием ЭПС. У бифидобактерий, в отличие от лактобацилл (выявляются белки с pI 3.7), отсутствовали в блоке-1 белки с pI около 4. Наблюдалось преимущественное и устойчивое во времени флуоресцентное окрашивание компонентов КЖ бифидобактерий, в отличие от более ранней и более кратковременной флуоресценции компонентов КЖ лактобацилл. Результаты указывают на дополнительный вклад ассоциатов ЭПС с белками в общую флуоресценцию разделенных посредством ИЭФ в ПААГ компонентов и подтверждают наличие в них дополнительных хромофоров.

ЭПС располагались, главным образом, в блоке-4. Потребление и/или деградация ЭПС (*B. breve* > *B. longum* > *B. infantis*) шла в направлении от менее катионных (как более нестабильных; продуцируемые в повышенном количестве ЭПС *B. infantis* сорбировались на стеклянный электрод и сильно замедляли время установки pH при измерении на pH-метре) к более катионным (с повышенной стабильностью). Исчезновение ЭПС сопровождалось исчезновением капельно-видных катионных белковых ассоциатов внутри контуров ЭПС и указывало на присутствие в белковых ассоциатах еще одного типа ЭПС. Процесс элиминации ЭПС начинался с нарушения менее катионного замкнутого контура (как в случаях *B. infantis*, *B. gallinarum*) с образованием перемещающейся (по мере усиления процесса разрушения ЭПС) в направлении к катоду неровной разрыхленной границы ЭПС (как в случаях *B. longum*, *B. breve*). Процесс видимой деградации полимеров носил либо тотальный характер (разрушение белков и ЭПС по всему треку в интервале pH 4–8, что отражало действие гидролаз разных типов; оценка гидролиза как максимального в случае *B. breve*; возможность мониторинга гидролазного потенциала препаратов с вкладом эндогликаназ, гликоамидаз, протеиназ, эстераз и прочих ЭПС-деполимераз), либо строго ограничивался элиминацией белковых полос (по всему треку, как в случае *B. bifidum* № 1 (пример устойчивости хранения ЭПС бифидобактерий благодаря отсутствию ЭПС-деполимераз); возможность мониторинга протеиназ, в том числе в отношении блоков, субблоков и отдельных белковых полос, подобно сравнительному анализу действия протеиназ растущих в КДС лактобацилл в отношении белков блоков 1 и 2).

Катионные белки и их ассоциаты, наборы типов ЭПС перспективны в типировании пробиотических бактерий (особенно, бифидобактерий) и их смешанных культур. На это указывают результаты ИЭФ в ПААГ в щелочной области, ЭПС

бифидобактерий в блоке-4 защищают важные для типирования наборы белков от деградации). В катионном блоке-4 бифидобактерий выявлялись 2 области ЭПС. Первая зона ЭПС располагалась ближе к нейтральному pH (видны 4 субтипа ЭПС у *B. bifidum* № 1 и 3 субтипа ЭПС у *B. infantis*, как совмещенные замкнутые контуры [«контур-в-контуре»] с единым «белковым» центром. Слои (различающихся) ЭПС были организованы градиентно в направлении сборки от условного центра — каплевидного ассоциатного белка в толще ПААГ. Эти ЭПС потреблялись (начиная с наружного слоя) в процессе пролонгированного роста (или деградировали при хранении С) вместе с катионными белковыми каплевидными ассоциатами. Вторая зона ЭПС была более удаленной от нейтрального pH. В этой зоне ЭПС были представлены 2 субтипами у всех тестируемых видов бифидобактерий в виде совмещенных замкнутых контуров. Выявлялся тонкослойный ЭПС отличающегося типа, примыкающий к каплевидному белковому ассоциату и полностью резистентный к красителю. ЭПС второй зоны вместе с катионными белковыми каплевидными ассоциатами к деградации характеризовались максимальной устойчивостью к флуоресцентному красителю. Каплевидные белковые ассоциаты (менее выраженные и с меньшим относительным содержанием в С) обнаруживались и в других блоках (преимущественно в 3-м и между 1-м и 2-м).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен мониторинг разделенных ЭПС и белков С (до 40 групп в рамках: молекулярная масса более 27 кД, рI 4–8) бифидобактерий и лактобацилл, позволяющий ранжирование относительного содержания компонентов в КЖ. Выявлены системы Б, дополняющие друг друга в случае лактобацилл и бифидобактерий. Разработанные подходы позволяют оценивать образование, распад или потребления ЭПС (в том числе Б) и включающих ЭПС белковых ассоциатов. Результаты важны для диагностической и прогностической оценки биополимеров и их комплексов, секретомного анализа полимеров в микрообразцах и микрокультурах. Предлагаемые подходы важны для скрининга типов ЭПС, их ассоциатов и способов сборки для более полной оценки антимикробного потенциала пробиотиков. Полученные результаты являются базовыми для прогнозирования (есть соответствующие алгоритмы) новых синбиотических комбинаций пробиотических штаммов микроорганизмов (на примере лактобацилл и бифидобактерий) в сочетании с безмикробными высокомолекулярными про/пребиотическими компонентами (в том числе ЭПС и Б, ассоциатами ЭПС с белками). Пополнение картин разделенных высокомолекулярных компонентов КЖ штаммов и смешанных культур является ключевым для конструирования пробиотиков (оценка взаимного донорства важных

функциональных полимеров и их сочетаний). Перспективным направлением дальнейшего изучения новых высокомолекулярных компонентов пробиотиков являются выявленные нами дополнительные качества содержащих ЭПС концентратов бифидобактерий и лактобацилл, важные для биотехнологии и медицины: способности «разрыхлять» биоосадки, «тромбировать» наружные поры гидрофобных полимеров, «размягчать» полистирол, стимулировать рост пробиотических массивов, осуществлять направленные деградацию и лизис биопленок патогенов, препятствовать продуцированию микроорганизмами факторов вирулентности, кофункционировать с защитными системами человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белковый состав в сочетании с экзополисахаридами культуральных жидкостей бифидобактерий человека / В.М. Лахтин [и др.] // Современные технологии обеспечения биологической безопасности : сб. материалов конф. — Оболенск, 2011. — С. 284–287.
2. Высокомолекулярные биосурфактанты грамположительных бактерий человека / В.М. Лахтин [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2010. — № 9. — С. 37–38.
3. Карты протеома культуральных жидкостей производственных штаммов пробиотических бактерий человека / В.М. Лахтин [и др.] // Сб. материалов конф. «Современные технологии обеспечения биологической безопасности». — Оболенск, 2011. — С. 287–290.
4. Нанотехнологии и перспективы их использования в медицине и биотехнологии / В.М. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2008. — № 4. — С. 50–55.
5. Оценка деградации бактериальных препаратов с помощью двухпараметровой pH-метрии и электрофореза на примере пробиотических бифидобактерий и лактобацилл человека / В.М. Лахтин [и др.] // Современные достижения биотехнологии : сб. материалов конф., г. Ставрополь, 21–23 июня, 2011. Часть 2. Раздел «Биологически активные добавки». — М.: НОУ «Образовательный НТЦ молочной промышленности», 2011. — С. 51–52.
6. Преимущества пробиотического консорциума «Ацилакт» в сравнении с ингредиентными штаммами с использованием алгоритма ранжирования качеств / В.М. Лахтин [и др.] // Materiały VIII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Naukowa przestrzeń Europy — 2012» Volume 32. — P. 50–57 (Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia. ISBN 978-966-8736-05-6).
7. Ранжирование качеств производственных ингредиентных пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл человека для прогнозирования новых пробиотических формул / В.М. Лахтин [и др.] // Современные достижения биотехнологии : сб. материалов конференции, г. Ставрополь, 21–23 июня, 2011. Часть 2. Раздел

«Биологически активные добавки». — М.: НОУ «Образовательный научно-технический центр молочной промышленности», 2011. — С. 49—51.

8. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего / В.М. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2008. — № 2. — С. 33—44.

Сведения об авторах

Лахтин Михаил Владимирович — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Владимир Михайлович — доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Андрей Владимирович — доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович — заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Кулакова Юлия Владимировна — научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Беликова Евгения Викторовна — младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Агапова Юлия Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Россия, 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел. (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

О.Е. Мазур, А.С. Фомина

СОСТАВ И ЗАРАЖЕННОСТЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ И ДЕФИНИТИВНЫХ ХОЗЯЕВ *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* (LEUCKART, 1858) В БАСЕЙНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ (РЕСПУБЛИКА БУРЯТИЯ)

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)

На основании литературных данных и собственных исследований представлены материалы по зараженности *Echinococcus multilocularis* диких животных в бассейне озера Байкал (Республика Бурятия). *E. multilocularis* циркулирует по схеме: лисица обыкновенная, волк обыкновенный (дефинитивные хозяева) — грызуны (промежуточные хозяева) — лисица обыкновенная, волк обыкновенный (дефинитивные хозяева). Круг промежуточных хозяев в дикой фауне включает грызунов семейства Мышиные (крыса), Хомяковые (ондатра, красная полевка, когтистая песчанка), Беличьи (глинохвостый суслик).

Ключевые слова: *Echinococcus multilocularis*, Бурятия, грызуны, хищники

COMPOSITION AND INFECTION OF INTERMEDIATE AND DEFINITIVE HOSTS OF *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* (LEUCKART, 1858) IN BASIN OF LAKE BAIKAL (BURYATIA)

O.E. Mazur, A.S. Fomina

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Based the available data and our own researches materials on *Echinococcus multilocularis* infection of wild animals in the basin of Lake Baikal (Republic of Buryatia) are presented here. *E. multilocularis* circulated by the circuit: red fox, common wolf (definitive hosts) — rodents (intermediate hosts) — red fox, common wolf (definitive hosts). The range of intermediate hosts in wild fauna includes rodents of family: Muridae (brown rat), Cricetids (muskrat, northern red-backed vole, Mongolian gerbil), Squirrels (long-tailed ground squirrel).

Key words: *Echinococcus multilocularis*, alveolar echinococcosis, Buryatia, rodents, carnivores

Одной из важнейших задач паразитологии является определение роли диких животных в распространении инвазий, опасных для человека, домашних, сельскохозяйственных животных и в поддержании природно-очаговых зоонозов. Среди гельминтозоонозов особое место занимает альвеолярный эхинококкоз, представляющий серьезную эпизоотическую и эпидемиологическую угрозу [1, 13, 14].

Возбудителем альвеолярного эхинококкоза является цестода *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1858) из семейства Taeniidae, Ludwig, 1886. Паразит распространен повсеместно по всему ареалу хозяев Голарктики. При этом выявлены тенденции к расширению ареала цестоды [15].

Echinococcus multilocularis развивается по диксенному жизненному циклу со сменой в онтогенезе нескольких хозяев: промежуточных, преимущественно грызунов, и дефинитивных — хищных млекопитающих в основном семейств Canidae, Mustelidae. Человек тоже включается в жизненный цикл *E. multilocularis*, как промежуточный каптивный хозяин, являясь биологическим тупиком в данной паразитарной системе.

Исследования, посвященные фауне гельминтов и отдельным гельминтозам диких животных в Бурятии проводились П.Г. Ошмариным [11], А.А. Спасским, К.М. Рыжиковым, В.Е. Судариковым [12], С.Н. Мачульским [8—10], Ю.А. Елтышевым [3, 4], А.В. Некрасовым и др. [2], Д.-С.Д. Жалцановой [5, 6] и др.

Вместе с тем, за последний, более чем 30-летний период целенаправленных паразитологических исследований диких животных по альвеолярному эхинококкозу в регионе не проводилось.

МЕТОДИКА

В основу работы положен ретроспективный анализ данных (1958—1980 гг.) по гельминтофауне микромамалий и хищных млекопитающих Бурятии, а также собственные исследования, проведенные в 2011 г. в дельте реки Селенги. Материал для исследований был получен от ондатр, добытых отстрелом с июня по октябрь 2011 г. из различных участков южной части дельты реки (протоки Харауз, Мосалиха, Толстая ножка). Методом неполных гельминтологических вскрытий по К.И. Скрябину исследовано 69 экз. ондатр, разного возраста и пола. Все зараженные особи представлены старшими возрастными группами (3+).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обобщенные литературные и собственные данные по зараженности промежуточных и дефинитивных хозяев альвеолярным эхинококком на территории Бурятии представлены в таблице 1.

За период с 1946 по 1959 гг. гельминтологических исследований в Бурятии П.Г. Ошмариным, А.А. Спасским, К.М. Рыжиковым, В.Е. Судариковым [11, 12] изучению подверглось 5 видов млекопитающих, С.Н. Мачульским [8—10] 31 вид

Таблица 1

Состав и зараженность (Экстенсивность инвазии (ЭИ)) промежуточных и дефинитивных хозяев *Echinococcus multilocularis* в бассейне оз. Байкал (Республика Бурятия)

Семейство и вид хозяев	Район обнаружения	ЭИ, %	Авторы
Промежуточные			
Хомяковые			
Ондатра	Баргузинский	0,5	Елтышев [2]
	Дельта р. Селенги	4,4	Собственные данные [6]
Красная полевка	Хр. Малый Хамар-Дабан	0,3	Жалцанова [5]
Когтистая песчанка	Бассейн р. Селенги	0,5	Мачульский [9]
Беличьи			
Длиннохвостый суслик	Баргузинский	0,9	Елтышев [3]
Мышиные			
Крыса	не указан	12,0	Жалцанова [5]
Дефинитивные			
Псовые			
Лисица обыкновенная	Бассейн р. Селенги	15,0	Жалцанова [5]
	Баргузинский	40,0	Елтышев [2]
Волк обыкновенный	Заиграевский, Селенгинский, Мухоршибирский	6,7	Некрасов [10]

животных из различных районов Бурятии, но инвазию *E. multilocularis* обнаружить удалось только у когтистой песчанки (табл. 1). В течение последующих исследований с 1958 по 1980 гг. Ю. Елтышевым [4, 6], сотрудниками лаборатории паразитологии Института биологии БНЦ СО АН СССР [2, 6] проведен гельминтологический анализ 25 видов грызунов и зайцеобразных, 20 видов хищных млекопитающих из 56 точек отбора материала по республике. Однако альвеолярный эхинококк был отмечен на ларвальной фазе развития только у 4 видов грызунов, относящихся к 3 семействам и на имагинальной стадии у 2 видов хищников семейства Canidae (табл. 1). По нашим данным, в дельте р. Селенги метацестода *E. multilocularis* выявлена у двух ондатр (самец и самка) в летней выборке и у одной ондатры (самка) в осенней выборке [7].

Анализ имеющихся материалов по зараженности диких животных *E. multilocularis* в бассейне оз. Байкал показал, что циркуляцию инвазии в паразитарной системе как дефинитивные хозяева поддерживают лисица (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) и волк (*Canis lupus* L.), имеющие тесные экологические связи с грызунами, а в круг промежуточных хозяев цестоды включаются микромамалии трех семейств: хомяковые (Cricetidae), мышиные (Muridae) и беличьи (Sciuridae). В эпизоотологический процесс альвеолярного эхинококка в Бурятии, могут включаться также корсак (*Vulpes corsac* L.) и американская норка (*Neovison vison* Schreber), в пищевой рацион которых входит ондатра. Однако этот вопрос остается открытым.

Дополнительным источником для распространения *E. multilocularis* в Бурятии являются тушки зараженных животных, оставленные охотниками в период массовых промысловых заготовок, которые становятся легкой добычей для диких плотоядных, а также собак. Такая ситуация существенно повы-

шает риск формирования синантропных очагов альвеолярного эхинококкоза. Интенсивное внедрение человека в экосистему Байкала с целью ресурсоиспользования, развитие туризма, спортивной охоты, браконьерство также увеличивает контакты человека природными сообществами, создавая угрозу для заражения людей альвеолярным эхинококком.

В связи с вышеизложенным возникает необходимость в разработке комплексных программ эпидемиологического и эпизоотического надзора за природно-очаговыми инвазиями, адаптированных к региональным особенностям эпидемического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные материалы показывают, что в условиях Бурятии, в распространении *E. multilocularis* определенную роль играют некоторые представители микромамалии и хищных млекопитающих. *E. multilocularis* в природном биоценозе циркулирует по схеме: лисица обыкновенная, волк обыкновенный (дефинитивные хозяева) — грызуны (промежуточные хозяева) — лисица обыкновенная, волк обыкновенный (дефинитивные хозяева). В качестве промежуточных хозяев альвеолярного эхинококка в дикой фауне бассейна оз. Байкал выступают грызуны: серая крыса (семейство Мышиные), ондатра, красная полевка (семейство Хомяковые), длиннохвостый суслик (семейство Беличьи), когтистая песчанка (семейство Песчанковые).

Работа выполнена в рамках программы НИР СО РАН, проект VI.43.1.3 и программы Президиума РАН «Живая природа России» (проект Р 30.11, руководитель д.б.н., Н.М. Пронин).

Авторы выражают благодарность главному специалисту-эксперту А.В. Молчанову (Управ-

ление ветеринарии), заведующему В.И. Елизову («Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов») и Д.Н. Никонову («Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов») за помощь в получении материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессонов А.С. Эхинококкоз *Echinococcus multilocularis* — альвеолярный гидатидоз в странах СНГ // Ветеринария. — 1998. — № 4. — С. 31–34.
2. Гельминты диких хищных зверей Западного Забайкалья / А.В. Некрасов [и др.] // Зоопаразитология бассейна озера Байкал / Тр. БИЕН СО АН СССР. — Улан-Удэ, 1979. — С. 65–76.
3. Елтышев Ю.А. Гельминтофауна млекопитающих Баргузинской котловины и опыт ее географического анализа // В сб. Паразитические организмы Северо-Востока Азии. — Владивосток, 1975. — Ч. 1. — С. 135–167.
4. Елтышев Ю.А., Маклакова Л.П. К гельминтофауне длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* (Pallas, 1779) Забайкалья / Ю.А. Елтышев, Л.П. Маклакова // Тр. ГЕЛАН СССР. — М., 1971. — Т. 21. — С. 11–16.
5. Жалцанова Ж.-С.Д. Гельминты млекопитающих бассейна озера Байкал. — М.: Наука, 1992. — 204 с.
6. Жалцанова Ж.-С.Д. Эколого-фаунистический анализ гельминтов грызунов и зайцеобразных Западного Забайкалья // В сб. Паразиты животных и вредители растений Прибайкалья и Забайкалья. — Улан-Удэ, 1979. — С. 44–63.

7. Мазур О.Е., Фомина А.С. Обнаружение *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1856) у ондатры (*Ondatra zibethicus*) дельты реки Селенги (Россия) // Российский журнал биологических инвазий. — 2012.

8. Мачульский С.Н. Гельминтофауна забайкальской лисицы Бурятской АССР // Тр. Бурят. зоовет. ин-та. — Улан-Удэ, 1949. — Вып. 5. — С. 24–39.

9. Мачульский С.Н. Паразитофауна ондатры, акклиматизированной в Бурят-Монгольской АССР // Тр. Бурят. зоовет. ин-та. — Улан-Удэ, 1948. — Вып. 4. — С. 73–78.

10. Мачульский С.Н. Гельминтофауна грызунов Бурятской АССР // Работы по гельминтологии (к 80-летию акад. К.И. Скрябина). — М.: Наука, 1958. — С. 219–224.

11. Ошмарин П.Г. Паразитические черви промысловых животных Бурят-Монгольской АССР // Тр. ГЕЛАН СССР. — М., 1946. — С. 186–188.

12. Спасский А.А., Рыжиков К.М., Сударинов В.Е. Гельминтофауна диких млекопитающих зоны озера Байкал // Тр. ГЕЛАН СССР. — М., 1952. — Т. VI. — С. 85–94.

13. Шайкенов Б.Ш. Биология возбудителей трихинеллеза и альвеолярного эхинококкоза / Б.Ш. Шайкенов. — Алматы: НИЦ «Гылым», 2003. — 308 с.

14. Liver cystic echinococcosis in humans — a study of 30 cases / D.J. Жулafiж [et al.] // Helminthologia. — 2007. — V. 44, N 4. — P. 157–161.

15. Romig T., Dinkel A., Mackenstedt T. The present situation of echinococcosis in Europe // Parasitol. Int. — 2006. — Vol. 55. — P. 197–191.

Сведения об авторах

Мазур Ольга Евгеньевна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, 8 (9021) 607952, факс: 8 (3012) 433034, e-mail: olmaz33@yandex.ru)

Фомина Анастасия Сергеевна — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, факс: 8 (3012) 433034, e-mail: anafoma@mail.ru)

О.Е. Мазур, Л.В. Толочко

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ В НЕРЕСТОВЫЙ ПЕРИОД НА ФОНЕ ИНВАЗИИ *DIPHYLLOBOTHRIUM DENDRITICUM* (CESTODA: PSEUDOPHYLLIDAE)*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)*

На основе собственных исследований предпринята попытка оценить комплекс гематологических показателей системы кроветворения у байкальского омуля в период нереста и зараженного *D. dendriticum*. Установлены следующие эффекты: низкая функциональная активность Т-клеточного звена иммунитета; устойчивый уровень В-клеточного звена иммунитета; интенсификация эритропоэза; характер клеточных реакций имеет признаки эндогенной интоксикации. В целом, выявленные гематологические изменения как зараженных, так и незараженных особей байкальского омуля протекали в пределах адаптивных возможностей вида.

Ключевые слова: байкальский омуль, *Diphyllbothrium dendriticum*, кровь, нерест

HEMATOLOGICAL ANALYSIS OF THE HEALTH STATUS OF THE BAIKAL OMUL IN THE SPAWNING SEASON AGAINST INVASION *DIPHYLLOBOTHRIUM DENDRITICUM* (CESTODA: PSEUDOPHYLLIDAE)

O.E. Masur, L.V. Tolochko

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Based on original research we attempted to assess the range of hematological parameters of the hemopoietic system in the Baikal omul infected *D. dendriticum* in the spawning period. The following effects were found: low functional activity of T-cell immunity, constant level of B-cell immunity; the intensification of erythropoiesis; cellular responses give evidences of endogenous intoxication. Overall, identified hematologic changes as in infected as in uninfected subjects of the Baikal omul proceeded were in adaptive criterias.

Key words: Baikal omul, *Diphyllbothrium dendriticum*, blood, spawning

Познание механизмов инвазионных патологий относится к одной из наиболее актуальных проблем современной паразитологии. Значимую категорию данных заболеваний составляют атропозоонозные инвазии, имеющие ареалы в дикой природе. К их числу относится дифиллоботриозы, вызываемые 3 видами лентецов: *Diphyllbothrium latum* (Linnaeus, 1758), *Diphyllbothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824), *Diphyllbothrium ditremum* (Creplin, 1825). В Бурятии важное эпидемическое и эпизоотическое значение имеет лентец чаечный *D. dendriticum*. В Байкальском природном очаге циркуляция *D. dendriticum* на половозрелой фазе развития происходит за счет рыбоядных птиц и плотоядных млекопитающих, в том числе человека [8, 9]. На фазе плероцеркоида *D. dendriticum* является доминантным паразитом байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgy, 1775). В данной паразитарной системе омуль является облигатным дополнительным хозяином лентеца.

В доступной литературе данных по вопросам патогенеза дифиллоботриоза рыб немногочисленно. Авторы отмечают негативное воздействие лентеца чаечного на морфофункциональное состояние органов и тканей зараженных хозяев — гидробионтов: лососей, сигов, форели, хариуса [1 — 2, 10]. Кроме того, паразитарный фактор, сам по себе достаточно патогенетический, а во время нерестовых миграций, при отсутствии экзогенного питания и возрастающих энергетических затратах рыб, он может приобретать элиминирующий характер.

В связи с вышеизложенным содержанием, в данной работе предпринята попытка оценить комплекс гематологических показателей системы кроветворения у байкальского омуля в период нереста и зараженного *D. dendriticum*.

МЕТОДИКА

Материал для исследования взят от половозрелых особей (9 + — 11 +) байкальского омуля (рыбозаводный завод, с. Большая Речка, Бурятия) в нерестовый период. Сбор и обработка проб проводились по общепринятой методике [4]. Материалом для гематологического анализа служила цельная кровь, которую отбирали стерильной пастеровской пипеткой из гемального канала хвостового стебля рыб. Гематологические исследования проводили по общепринятым методикам [5]. Общее число лейкоцитов рассчитывали косвенным методом [11]. Мазки крови изготавливали на месте отбора, высушивали и фиксировали красителем Май-Грюнвальда с последующим окрашиванием раствором Романовского. На препаратах определяли соотношение зрелых и полихроматофильных эритроцитов на 500 клеток, лейкоцитарную формулу на 200 клеток белой крови. Для иммунологического исследования часть крови набирали в гепарин (1000 ЕД/мл) для определения относительного количества Т-, В-лимфоцитов (Е-РОК, ЕАС-РОК) согласно методическим рекомендациям [11]. Количество общего белка сыворотки крови устанавливали рефракто-

метрически, общее количество иммуноглобулинов — методом осаждения насыщенными растворами фосфатов [11]. Выраженность эндогенной интоксикации и развитие патологического процесса определяли по лейкоцитарному индексу интоксикации (отношение суммы плазматических клеток и всех нейтрофилов к сумме лимфоцитов, моноцитов, базофилов и эозинофилов) и индексу гетерофильного сдвига (отношение суммы молодых нейтрофилов к сумме зрелых форм) [7].

В данной статье для отображения общего характера изменений изучаемых показателей использовали качественные (сильная, средняя, слабая) характеристики в виде векторов направления того или иного признака.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кровь — дифференцированная ткань, обладающая высокой реактивностью, что позволяет успешно использовать ее элементы в качестве маркеров физиологического состояния организма. Клетки крови, первыми в организме реагируют на абиотические и биотические факторы среды, легко перераспределяются, тем самым, обеспечивая развитие адаптивного и иммунного ответа.

В ходе наших исследований у омуля, зараженного плероцеркоидами *D. dendriticum*, по сравнению с незараженными особями изменения в эритроцитарном и иммунологическом профиле имели в основном характер тенденции. Вместе с тем, некоторые гематологические трансформации в организме зараженного лентецом омуля типичны для токсикоза (таблица).

Таблица
Интенсивность гематологических реакций
байкальского омуля, зараженного
Diphyllbothrium dendriticum

Показатель	Омуль
Гемоглобин	↓
Эритроциты	↓
Полихроматофильные эритроциты	↑↑
Бластные клетки	↑↑
Лейкоциты	N
Имуноглобулины	↓
Т-лимфоциты	↓↓
В-лимфоциты	N
Лейкоцитарный индекс интоксикации	↑↑
Индекс нейтрофильного сдвига	N

Примечание: ↑ — увеличение в уровне показателя; ↓ — уменьшение, изменения: «↑» — слабые; «↑↑» — средние; «↑↑↑» — сильные; «N» — нет изменений.

Повышенное число полихроматофильных эритроцитов, бластных клеток и низкодифференцированных форм нейтрофилов, пойкилоцитоз свидетельствуют о развитии компенсаторных реакций организма под влиянием патогенных факторов, оказывающих антигенное и токсическое

воздействие на клетки, и кроветворные органы. Продукты жизнедеятельности плероцеркоидов и распад поврежденных тканей, в результате миграции и развития паразита приводит к эндогенной интоксикации, о чем свидетельствует и увеличенный уровень лейкоцитарного индекса интоксикации. Выявленные эффекты модулируют развитие опосредованного иммунного ответа рыб, что подтверждается снижением функциональной активности Т-лимфоцитов. Вместе с тем, при исследовании иммунных органов у омуля при дифиллоботриозе, вызываемом *D. dendriticum* И.А. Кутырев и др. [6] регистрировали активную пролиферацию иммунных клеток, что указывает на развитие защитно-компенсаторных реакций в ответ на инвазию лентеца.

Отсутствие изменений в В-клеточном звене иммунитета, слабо выраженные отличия в антителообразовании при сохраненном числе лейкоцитов говорят об обратимости патологических процессов. Стабильный уровень индекса нейтрофильного сдвига у зараженных лентецом особей омуля также свидетельствует об отсутствии развития тяжелых патологических процессов в организме зараженных рыб. Обратимый характер морфологических изменений при дифиллоботриозе рыб подтверждаются и гистопатологическими исследованиями органов локализации цестоды [10]. Авторами отмечено, что патологические изменения, возникающие в желудке и пищеводе байкальского омуля во время миграции лентеца, характеризуются в основном очаговостью и полным восстановлением нормального строения оболочек органов. Коадаптация паразита и хозяина достигается формированием соединительнотканной капсулы вокруг плероцеркоида, что приводит к длительному существованию системы «*D. dendriticum* — омуль» и сохранению популяции хозяина в жизнеспособном состоянии.

Следует отметить, что в период нереста в крови у омуля, незараженного лентецом чаечным, отмечено, хотя и в меньшей степени, чем у зараженных особей, низкое содержание гемоглобина и эритроцитов в крови, присутствие полихроматофильных эритроцитов и низкодифференцированных форм лейкоцитов, способных к активной пролиферации. Мы не исключаем влияние на рыбу и других различных по этиологии факторов (бактериальные, вирусные, антропогенные), индуцирующих в организме рыб развитие защитно-адаптационных реакций или структурных нарушений в гемопоэзе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования комплекса гематологических показателей организма омуля в паразито-хозяинной системе «*Diphyllbothrium dendriticum* — байкальский омуль» установлено: низкая функциональная активность Т-клеточного звена иммунитета; устойчивый уровень В-клеточного звена иммунитета; интенсификация эритропоэза; характер клеточных реакций имеет признаки эндогенной интоксикации. Выявленные гемато-

логические трансформации как зараженных, так и незараженных особей байкальского омуля протекали в пределах адаптивных возможностей вида, что является благоприятным прогностическим признаком для выживания популяции в период нерестовых миграций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 12-04-98002).

Авторы искренне признательны за помощь в отборе проб и ценные советы по подготовке статьи г.б.н. Пронину Н.М., к.б.н. Кутыреву И.А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Byland G. Pathogenic effects of diphyllobothriid plerocercoids its hosts fishes // Comment. Biol. Soc. Sci. fenn. — 1972. — № 58. — P. 3—11.
2. Needham P.R., Behnke R.J. The effect of nematode (Philonema) and cestoda (Diphyllobothrium) parasites in rainbow trout of Tebay Lake, Alaska // Trans. Amer. Fish. Soc. — 1965. — Vol. 94, N 2. — P. 184—186.
3. Sharp G.J.E., Pike A.W., Secombes C.J. The immune response of wild rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, to naturally acquired plerocercoid infections of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1925) // J. Fish Biol. — 1989. — Vol. 35. — P. 781—794.
4. Быховская-Павловская И.Е. Паразитологические исследования рыб. Методы паразитологических исследований. — Л.: Наука, 1969. — 108 с.

5. Иванова Н.Т. Атлас клеток крови рыб. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. — 184 с.

6. Кутырев И.А., Пронина С.В., Пронин Н.М. Изменения лейкоцитарного состава органов иммунной системы Байкальского омуля при дифиллоботриозе // Аквакультура Европы и Азии: реалии и перспективы развития и сотрудничества : матер. междунар. науч.-практ. конф. — Тюмень: ФГУП Госрыбцентр, 2011. — С. 106—107.

7. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2006. — № 6. — С. 50—53.

8. Пронин Н.М. Паразиты рыб и других гидробионтов Байкальского региона опасные для людей // Проблемы общей и региональной паразитологии. — Улан-Удэ: БСХА. — 2000. — С. 20—25.

9. Пронина С.В., Пронин Н.М. Байкальский природный очаг дифиллоботриоза (структура, эпизоотология и эпидемиология). — Улан-удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета, 2010. — 44 с.

10. Пронина С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминты — рыбы (на тканевом, органном и организменном уровнях). — М.: Наука, 1988. — 176 с.

11. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб / Под общ. Ред. Н.Я. Яременко. — М.: Агро-Вестник, 1999. — Ч. 2. — 236 с.

Сведения об авторе

Мазур Ольга Евгеньевна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, 8 (9021) 60-79-52, факс: 8 (3012) 43-30-34, e-mail: olmaz33@yandex.ru).

Толочко Лариса Витальевна — инженер лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, факс: 8 (3012) 43-30-34).

Ю.А. Маркова ¹, А.В. Духанина ², Е.В. Анганова ^{2,3}, Л.А. Беловежец ⁴, Е.Д. Савилов ^{2,3}**КОНТАМИНАЦИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПАТОГЕННЫМИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ**¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск)² Институт эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)³ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)⁴ Институт химии им. Фаворского СО РАН (Иркутск)

Проведено изучение контаминации овощей и фруктов патогенными и условно-патогенными энтеробактериями. Показано, что в смывах с поверхности плодов и зелени достаточно часто встречаются представители исследуемой группы. В то же время, бактериологический анализ поверхностно обработанных плодов выявил встречаемость энтеробактерий в растительных тканях, где они существуют в качестве эндофитных микроорганизмов. Полученные результаты доказывают возможность сохранения патогенных и условно-патогенных бактерий в растительных тканях после санитарной обработки, что свидетельствует о том, что продукты растительного происхождения, употребляемые в пищу без термической обработки, могут быть источником инфицирования человека.

Ключевые слова: продукты питания растительного происхождения, энтеробактерии, эндофиты

CONTAMINATION OF PHYTOGENIC FOODS WITH PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC ENTEROBACTERIAYu.A. Markova ¹, A.V. Duhanina ², E.V. Anganova ^{2,3}, L.A. Beloveshets ⁴, E.D. Savilov ^{2,3}¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk² Institute of Epidemiology and Microbiology of «Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk³ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk⁴ Irkutsk Institute of Chemistry named after A.E. Favorsky SB RAS, Irkutsk

Studying contamination of vegetables and fruit pathogenic and opportunistic enterobacteria was conducted. It is shown that in washouts from a surface of fruits and greens often enough there are representatives of investigated group. At the same time, the bacteriological analysis of superficially processed fruits has revealed occurrence *Enterobacteriaceae* in vegetative fabrics where they exist in quality endophytic microorganisms. The received results proved possibility of preservation of pathogenic and is conditional-pathogenic bacteria in vegetative fabrics after sanitary processing that testifies that the products of a phytogenesis used in food without thermal processing can be a source of an infection of the person.

Key words: plants foods, *Enterobacteriaceae*, endophyte

Вспышка острой кишечной инфекции, вызванная *E. coli* O104:H4 в Европе летом 2011 г., убедительно доказала необходимость контроля качества продуктов питания растительного происхождения [3, 8]. Однако это был не единственный случай массового заражения людей после употребления растительных продуктов. Большинство таких вспышек ассоциировано с проростками люцерны, бобов и других растений, популярных в Европе в качестве источника здорового питания [2, 5, 6], а также непастеризованного сока, овощей и фруктов.

Все изложенное свидетельствует о том, что бактерии, патогенные для человека, могут быть ассоциированы с растительными организмами. И действительно, исследованиями последних лет доказано, что многие виды энтеробактерий и псевдомонад успешно колонизируют внутренние ткани растений, относясь к группе так называемых эндофитных бактерий [4, 7]. Эти бактерии, локализуясь в межклетниках и сосудах растений, практически не доступны действию большинства дезинфектантов.

Таким образом, **цель работы** состояла в определении контаминации овощей и фруктов бактериями, патогенными для человека, представителями семейства *Enterobacteriaceae*.

МЕТОДИКА

Объектами исследования стали фрукты, овощи и зелень, приобретенные в розничной торговой сети г. Иркутска, — персик (Китай), слива (Узбекистан), нектарин (Китай), черный виноград (Узбекистан), томат (Китай), зеленый лук и петрушка (Иркутск, теплицы), перец болгарский (Узбекистан), огурец (Ангарск, теплицы), груша (Китай), яблоко (Китай), апельсин (Марокко), банан (Эквадор).

С поверхности каждого растительного объекта делали смыв и рассеивали на среды. Затем проводили обработку поверхности исследуемого образца с помощью 96% спирта и 3% перекиси водорода. После этого гомогенизировали и рассеивали объемом по 200,0 мкл в чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА), средой Эндо (селективная для ряда энтеробактерий) и висмут-сульфит агаром (БСА) (среда селективная для сальмонелл). Чашки Петри инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24–48 часов. Идентификацию проводили с помощью биохимических тестов, используя систему для определения энтеробактерий ммТЕ1 и ммТЕ2 (НПО «Аллерген» г. Ставрополь). Для определения значимости различий показателей использовали критерия Боярского [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами продемонстрировано, что поверхность исследуемых образцов была в высокой степени осеменена различными микроорганизмами. Наибольшее количество КОЕ выросло на среде МПА (до 1500 для смыва с поверхности банана), несколько меньшее — на средах Эндо и ВСА (100 — 200 КОЕ с поверхности огурца). Обработка поверхности привела к значительному сокращению количества микроорганизмов, однако, единичные колонии вырастали на средах Эндо и ВСА.

Всего было выделено 228 культур. Из них из смывов — 142, из ткани — 86. Сравнение соотношения морфологических типов бактерий показало, что как в ткани, так и в смывах представлены большей частью грамотрицательные палочки (52,3 % в тканях и 54,9 % в смывах), грамотрицательные кокки чаще встречались в смывах (8,1 % и 14,8 % соответственно) (рис. 1). Количество грамположительных палочек в мякоти растений было более чем в два раза больше, чем в смывах (25,6 и 11,3 %, соответственно), тогда как количество грамположительных кокков практически не различалось (13,9 и 19,0 %). Анализ контаминации исследованных образцов бактериями различных

типов в смывах и тканях показал, что значимые различия выявлены только в содержании грамположительных палочек.

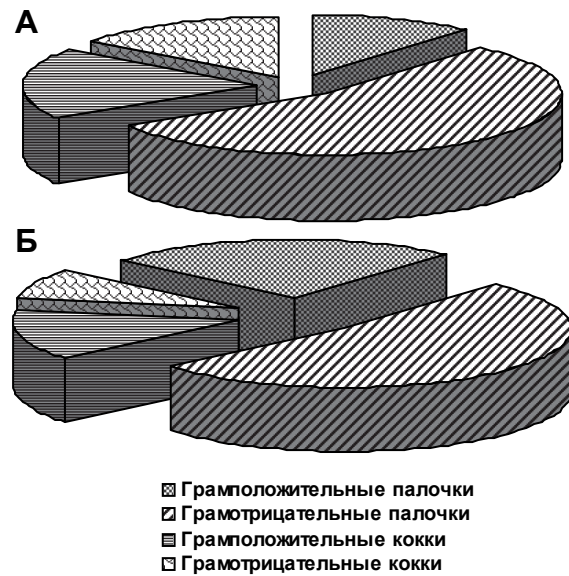


Рис. 1. Соотношение морфологических форм в тканях (А) и смывах (Б) исследованных овощей и фруктов.

Виды энтеробактерий, выделенных из смывов и ткани овощей и фруктов

Таблица 1

Растение	Смыв/ткань	Вид
Томат (Китай)	Смыв	<i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>C. divresus</i> , <i>C. divresus</i> , <i>E. cloacae</i>
	Ткань	—
Зеленый лук (Иркутск)	Смыв	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Ткань	—
Груша сорт «Медовая» (Китай)	Смыв	—
	Ткань	<i>C. freundii</i>
Перец болгарский (Китай)	Смыв	<i>C. divresus</i> , <i>H. alvei</i> , <i>E. amylovora</i>
	Ткань	—
Апельсин (Китай)	Смыв	<i>Enterobacter</i> sp., <i>C. freundii</i> , <i>C. freundii</i>
	Ткань	<i>C. freundii</i>
Петрушка зелень (Иркутск)	Смыв	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. vulgaris</i>
	Ткань	—
Банан (Эквадор)	Смыв	<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. asburiae</i>
	Ткань	—
Огурец (Иркутск)	Смыв	<i>E. asburiae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>S. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
	Ткань	<i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i>
Томат (Иркутск)	Смыв	<i>Salmonella</i> sp., <i>Salmonella</i> sp., <i>C. freundii</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>Citrobacter</i> sp
	Ткань	<i>Enterobacter</i> sp., <i>E. asburiae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>M. morganii</i> , <i>Enterobacter</i> sp
Зеленый лук (Иркутск)	Смыв	<i>C. freundii</i> , <i>Salmonella</i> sp
	Ткань	<i>C. freundii</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>E. asburiae</i>
Петрушка зелень (Иркутск)	Смыв	<i>P. vulgaris</i> , <i>C. freundii</i>
	Ткань	—
Слива (Узбекистан)	Смыв	—
	Ткань	<i>C. freundii</i> , <i>C. freundii</i>
Банан (Эквадор)	Смыв	<i>C. freundii</i>
	Ткань	—

Из 123 культур граммотрицательных палочек, выделенных из смывов и мякоти, каталазоположительных, оксидазо-отрицательных было 68 (55,3 %). Из них 48 (39,0 %) культур по результатам биохимических тестов были отнесены к семейству *Enterobacteriaceae* (табл. 1).

Таким образом, из смывов было выделено 33 культуры, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae*, из тканей — 15. И в смывах, и в мякоти большая часть исследованных культур относилась к родам *Enterobacter* (33,3 % в смывах, 46,7 % в тканях) и *Citrobacter* (33,3 % и 40,0 %, соответственно). Отмечены единичные случаи выделения в смывах *Proteus vulgaris* (9,1 %), *Klebsiella pneumonia* (6,1 %), *Hafnia alvei* (3,0 %), *Serratia marcescens* (3,0 %). Следует отметить, что 9,1 % выделенных из смывов культур на основе биохимических тестов отнесены к роду *Salmonella*. 13,3 % культур выделенных из ткани, идентифицированы как *Morganella morganii*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что приобретаемые в розничной продаже фрукты и овощи содержат условно-патогенные энтеробактерии не только на своей поверхности, но и в мякоти. Несмотря на то, что количество энтеробактерий в мякоти значимо (по критерию Боярского) ниже их содержания на поверхности овощей и фруктов, наличие данных бактерий в местах, недоступных для действия санитарной обработки, свидетельствует о возможности инфицирования людей при употреблении таких продуктов.

Изложенное позволяет сделать вывод о целесообразности мониторинга микробиологической

контаминации овощей и фруктов, употребляемых в пищу в свежем, необработанном виде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эпидемиологический анализ. Методы статистической обработки материала / Е.Д. Савилов и [др.]. — Новосибирск: Наука-Центр, 2011. — 156 с.
2. Erickson M.C., Doyle M.P. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* // J. Food Prot. — 2007. — N 70. — P. 2426 — 2449.
3. German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts / U. Buchholz [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2011. — Vol. 10, N 365. — P. 1763 — 1770.
4. Iniguez A.L., Dong Y.M., Triplett E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342 // Mol. Plant-Microb. Interact. — 2004. — Vol. 17. — P. 1078 — 1085.
5. Outbreak of *Salmonella* Stanley in Sweden associated with alfalfa sprouts, July — August 2007 / S. Werner [et al.] // Euro Surveill. — 2007. — N 12. — P. 3291 — 3292.
6. Outbreak of *Salmonella* Weltevreden infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July — October 2007 / K.E. Emberland [et al.] // Euro Surveill. — 2007. — N 12. — P. 3321 — 3323.
7. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / E. Franz [et al.] // Food Microbiol. — 2007. — Vol. 24. — P. 106 — 112.
8. Similarity of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Strains from Italy and Germany / G. Scavia [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, N 10. — P. 1957 — 1958.

Сведения об авторах

Маркова Юлия Александровна — к.б.н., с.н.с. Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, (тел. (3952)425009; e-mail: juliam06@mail.ru)

Духанина Алла Владимировна — к.б.н., с.н.с. института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Анганова Елена Витальевна — к.м.н., доцент ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», с.н.с. института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Беловежец Людмила Александровна — к.б.н., с.н.с. института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Савилов Евгений Дмитриевич — д.м.н., профессор, проректор по научной и лечебной работе ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», в.н.с. института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

В.Ю. Марченко, К.А. Шаршов, А.М. Шестопалов

ЭКОЛОГИЯ ВИРУСА ГРИППА В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ ПТИЦ ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)*

Представлены результаты мониторинга вируса гриппа А среди диких птиц Центральной Азии в 2003–2009 гг. Было исследовано 2604 образца от диких птиц. На территории Казахстана было собрано 279 проб от диких птиц, 650 образцов было собрано на территории Монголии и 1675 на территории России. Выделение вируса было показано из проб, собранных в Монголии (13 изолятов) и России (4 изолята). В результате вирусологического анализа было показано, что 6 изолятов относятся к H3N6-субтипам вируса гриппа, 5 к H4N6. Также было выделено 2 вируса гриппа H1N1 субтипа, H10N7, H3N8 и новый для Центральной Азии H13N8 субтип вируса гриппа А.

Ключевые слова: Вирус гриппа А, Центральная Азия, дикие птицы

ECOLOGY OF INFLUENZA VIRUS IN WILD BIRD POPULATIONS IN CENTRAL ASIA

V.Yu. Marchenko, K.A. Sharshov, A.M. Shestopalov

Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo

The study provides the results of AIV surveillance in Central Asia region during 2003–2009. We have analyzed 2604 samples from wild birds. These samples were collected in Kazakhstan (279), Mongolia (650), and Russia (1675). Isolated viruses from samples collected in Mongolia (13 isolates) and in Russia (4 isolates) were described. Virological analysis has shown that 6 isolates belong to H3N6 subtype and 5 isolates belong to H4N6 subtype. Two H1N1 influenza viruses, one H10N7 virus, two H3N8 viruses, and H13N8 virus, which is new for Central Asia, have been also isolated. Samples were taken from birds of 6 orders, including several species, preferring water and semi-aquatic biotopes, one species, preferring dry plain regions, and one more species which can inhabit both dry and water biotopes.

Key words: influenza A virus, Central Asia, wild birds

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа А типа (Orthomyxoviridae, Orthomyxovirus) выделяются от различных видов птиц и млекопитающих, включая человека [8]. К настоящему моменту циркуляция вирусов гриппа А со всеми известными подтипами гемагглютинина и нейраминидазы зарегистрирована только среди птиц [7, 8]. Миграции диких птиц способствуют географическому распространению различных вариантов вирусов [1]. Изучение циркуляции вирусов гриппа среди диких птиц в регионах, расположенных на путях миграций птиц, является необходимым элементом для оптимизации мероприятий по контролю над распространением возбудителя. Важным регионом для контроля и изучения распространения вируса гриппа птицами во время миграции в Евразии является Центральная Азия, особенно юг Красноярского края (Россия) и территория западной части Монголии, а именно, Котловина Больших Озер, являющаяся средой обитания и гнездования большого видового разнообразия птиц.

Физико-географические характеристики и структура орнитофауны определяют важность Центральной Азии в экологии вируса гриппа А. Через данный регион проходят основные миграционные маршруты диких птиц между Китаем, странами Юго-восточной Азии и Россией, объединяя огромные популяции птиц различных видов в Центрально-Азиатский пролетный путь [3, 4]. По результатам недавних исследований, современная

орнитофауна Центральной Азии включает в себя 383 вида птиц, относящихся к 20 отрядам. На долю птиц водно-болотного комплекса, которые являются природным резервуаром вируса гриппа А, приходится более 30 %. Во время сезонных миграций на озерах Центральной Азии наблюдается высокая концентрация различных видов диких птиц. Это объясняется небольшим количеством подходящих для гнездования водоемов. Высокая концентрация птиц может являться благоприятным условием для передачи вируса гриппа между различными видами, что в свою очередь может привести к реассортации геномов различных штаммов вируса гриппа А и появлению в природе новых субтипов..

Следует также отметить, что подобные исследования на данной территории немногочисленны [5]. Имеющихся данных недостаточно, чтобы однозначно делать заключения о закономерностях эволюции и экологических особенностях вируса гриппа на территории Центральной Азии.

В связи с этим, настоящая работа посвящена изучению современного разнообразия циркулирующих в Центральной Азии вариантов вируса гриппа типа А, а также определению таксономической и экологической гетерогенности видов диких птиц, поддерживающих эту циркуляцию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В нашем исследовании мониторинг ВГА систематически проводился на территории западной части республики Монголия, республики Казахстан

и юга Центральной Сибири (Красноярский край, республика Хакасия) в России. Места проведения мониторинговых работ определялись в соответствии с данными о миграциях птиц таким образом, что точки сбора материала лежали в пределах миграционных маршрутов диких птиц, летящих Центрально-Азиатским пролетным путем. Сбор биологического материала проводили, в основном, в осенний период, на территориях крупных озер в местах наибольшего скопления дикой птицы. На территории Монголии сбор материала проводили на озерах Убсу-Нур, Ачит-Нур, Хар-ус-нур, на территории Казахстана — на озере Алаколь, на территории России — на озере Убсу-нур, а также на небольших озерах республики Хакасия и на юге Красноярского края. Птицы добывались отстрелом, а также при помощи орнитологических паутинных сетей (мелкие воробьинообразные и кулики).

Биологический материал представлял собой клоакальные смывы и фрагменты кишечника. Клоакальные смывы помещались в 2 мл пробирки, содержащие транспортную среду, содержащие стерильный фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH = 7,2), стерильный глицерин в соотношении объемов 1:1 и антибиотики: пенициллин, стрептомицин, гентамицин и нистатин в концентрациях 2×10^6 ед/л, 0,20 г/л, 0,25 г и $0,5 \times 10^6$ ед/л соответственно [10].

Изоляцию вируса проводили путем инокуляции клоакальных смывов или гомогенатов органов в аллантоисную полость девятидневных развивающихся куриных эмбрионов согласно рекомендациям ВОЗ [10].

Идентификацию изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинации с использованием набора диагностических референс антисывороток (WHO, 2002; Reference antisera and antigens to the HA of influenza A and B viruses), любезно предоставленную доктором Вэбстером (Мэмфис, США), а также с помощью ПЦР с использованием субтипированных праймеров [ссылка].

ПЦР амплификация и сиквенс. Вирусная РНК была выделена из аллантоисной жидкости с помощью набора SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation, USA). Для обратной транскрипции были использованы универсальные праймеры Uni12 и AMV-reverse Transcriptase (Fermentas, Lithuania). Для ПЦР были использованы праймеры, специфичные к каждому гену [11]. Ампликоны выделяли с помощью набора QIAquick gel extraction kit (Qiagen, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате мониторинга вируса гриппа среди диких птиц Центральной Азии было собрано и обследовано 2604 проб биологического материала от птиц (табл. 1). На территории Казахстана было собрано 279 проб от диких птиц, 650 образцов было собрано на территории Монголии и 1675 на территории России.

В общей сложности, 102 вида диких птиц, относящихся к 14 отрядам, было проверено на носитель-

ство вируса гриппа. Основное количество особей составили птицы трех отрядов — Гусеобразные (Anseriformes), Ржанкообразные (Charadriiformes) и Воробьинообразные (Passeriformes). Процентное соотношение количества особей птиц данных отрядов было примерно одинаковым и составило, от общего числа, 23,2, 26,3, 25,9 % соответственно. 11,5 % птиц принадлежали к отряду Аистообразные (Ciconiiformes). На долю остальных 10 отрядов птиц пришлось около 13 %.

Из обследованного материала было выделено 17 штаммов вируса гриппа (табл. 2). Результаты исследований показывают, что основную роль в циркуляции вируса гриппа птиц на территории Центральной Азии играют дикие водно-болотные птицы. В нашем исследовании к ним относятся птицы, относящиеся к семействам Anatidae, Laridae, Podicipedidae and Phalacrocoracidae. От птиц данной группы было выделено 14 штаммов ВГА, что составило 82,4 % от всех выделенных в данной работе изолятов. Для представителей водно-болотных птиц, относящихся к отряду гусеобразные (хохлатая чернеть, черный турпан, большой крохаль, кряква, огарь, красноголовый нырок, чирок-свистунок и широконоска) в данной работе выделение вируса составило 53 % и 29,4 % для отрядов ржанкообразные (серебристая чайка), поганкообразные (чомга) и пеликанообразные (большой баклан).

Виды птиц, от которых нами был выделен вирус гриппа, являются мигрирующими на значительные расстояния Евразии. Так, например, красноголовый нырок мигрирует в прибрежные области Средиземного и Черного морей, Восточную Африку, на побережье Каспия, Иран и Индию. Восточные популяции мигрируют на восток и юго-восток, достигая территорий Юго-Восточной Азии, Японских островов [9]. Область гнездования различных популяций чирка-свистунка очень обширна, захватывает почти всю Западную Европу и большую часть Средней Азии на юге до северной части Ирана, Северо-Западной Монголии и Маньчжурии включает северную половину Японии и западную часть Северной Америки до Великих озер. Зимует чирок-свистунок в Западной Европе, Средиземноморье, на юге Азии [2].

Из мировой литературы известно, что штаммы вируса гриппа А выделены более чем от 105 видов, принадлежащих к 12-ти из 50-ти отрядов птиц [5, 8], хотя доля каждого отряда и вида птиц в поддержании циркуляции вируса гриппа А пока не достаточно определена. Однако среди различных экологических групп птиц была выявлена гетерогенность в распределении субтипов вируса гриппа. Хотя наибольшее количество и разнообразие вируса гриппа изолируется от водоплавающих птиц, было замечено, что например штаммы вируса гриппа H13 подтипа чаще всего встречаются среди птиц береговой линии и чаек [2, 6, 9].

Наши исследования подтвердили этот факт. Так от серебристой чайки (*Larus argentatus*), пойманной на территории озера Убсу-нур, был выделен изолят вируса гриппа А субтипа H13N8 — штамм А/

Таблица 1

Таксономическая и количественная характеристики диких птиц Центральной Азии

Отряд	Семейство	Количество видов	Количество особей	Количество положительных проб
Гусеобразные	утиные	17	604	9
Ржанкообразные	бекасовые	14	684	1
	чайковые	4		
	ржанковые	3		
	крачковые	1		
	шилоклювковые	1		
Воробьинообразные	врановые	6	674	2
	мухоловковые	6		
	трясогузковые	5		
	овсянковые	4		
	жаворонковые	3		
	воробьиные	2		
	славковые	2		
	вьюрковые	2		
	дроздовые	2		
	сорокопутовые	1		
	скворцовые	1		
	ласточковые	1		
	суторовые	1		
Аистообразные	цаплевые	2	300	
	ибисовые	1		
Журавлеобразные	пастушковые	2	118	
	настоящие журавли	1		
Поганкообразные	поганковые	2	45	1
Пеликанообразные	баклановые	1	95	3
Хищные птицы	ястребиные	6	42	1
	соколиные	1		
Курообразные	фазановые	3	16	
Голубеобразные	голубиные	3	18	
Ракшеобразные	удодовые	1	3	
Кукушкообразные	кукушковые	1	2	
Дятлообразные	дятловые	1	2	
Совообразные	совиные	1	1	
Всего: 14	33	102	2604	17

herring gull/Mongolia/454/08 (GenBank: JF775470-JF775477).

Результаты проведенных исследований показали, на территории Центральной Азии активно циркулируют вирусы гриппы у диких птиц различных видов. Наличие большого количества озер и разнообразие орнитофауны на них играет важную роль в поддержание циркуляции вируса гриппа птиц на данной территории и в распространении по всему континенту.

Проведенные исследования показали, что в поддержание циркуляции вируса гриппа в обследо-

ванном регионе вовлечены различные виды диких птиц. В основном, это птицы отряда гусеобразные (хохлатая чернеть, черный турпан, большой крохаль, кряква, огарь, красноголовый нырок, чирок-свистунок и широконоска), что подтверждает их ключевую роль в распространении вируса как основных хозяев. Отмечено носительство гриппа у хищных птиц (Лунь болотный) и видов, экологически не связанных с водоемами (сорока, каменка плясунья). Что касается последних, то вовлеченность данных видов в эпизоотический процесс мало описана и, скорее, носит случайный характер. В

литературе описан ряд случаев выделения вируса гриппа от представителей отрядов соколообразные и воробьинообразные. От птиц данных отрядов выделяли как низкопатогенные варианты, так и высокопатогенные вирусы гриппа H5N1 субтипа. Однако так и не описано дальнейшего распространения вирусов гриппа данными видами птиц. В связи с этим, можно предположить, что данные виды, скорее всего, являются эволюционным тупиком в распространении вируса гриппа.

Тем не менее, широкий круг видов птиц, поддерживающих циркуляцию вируса гриппа, позволяет ему существовать и эффективно распространяться среди отрядов и видов восприимчивых хозяев. Это является весьма благоприятным условием для реассортации геномов различных штаммов вируса гриппа А, что, в свою очередь, ведет к увеличению гетерогенности вирусной популяции и обеспечивает формирование большего разнообразия вирусов. Так, например, от серебристой чайки нами был выделен уникальный для Центральной Азии штамм вируса гриппа H13N8 субтипа. В литературе до сих пор нет данных о выделении данного субтипа вируса гриппа в исследуемом регионе. Следует отметить, что для штаммов H13 субтипа гемагглютинина характерна экологическая связь с различными видами чаек. Подобная ситуация показана и в нашем исследовании. Несмотря на то, что в генофонде ВГА сравнительно редко регистрируются новые комбинации, нам удалось впервые выделить новый для территории Азии субтип вируса гриппа.

Ранее показано, что вирус гриппа птиц H3N8 и H3N6 субтипов, подобный выделенным в нашей

работе вариантам, широко распространен среди популяций диких птиц Евразии и Америки. Подавляющее большинство видов-хозяев данных субтипов принадлежит отряду гусеобразные [8]. Полученные нами результаты дополняют современную картину распространения этих субтипов в Центральной Азии. Следует отметить, что, по данным литературы, среди вируса гриппа H3-субтипа гемагглютинина не было выявлено высокопатогенных для птиц вариантов. Однако описаны варианты H3N8, которые адаптированы к млекопитающим. В частности, некоторые из них вызывают эпизоотии гриппа лошадей с последующей передачей собакам.

Вирус гриппа H10-субтипа гемагглютинина распространен в меньшей степени. Ранее он был выделен на Североамериканском континенте, в Германии, Иране, Египте, Корее, Японии (данные GenBank). Наши исследования подтверждают присутствие этого субтипа в популяциях птиц, обитающих в Центральной Азии. На примере вируса гриппа H10N7 была показана острая необходимость ветеринарного контроля сельскохозяйственной продукции. Вирус этого субтипа был изолирован из мяса птицы, ввезенной контрабандой из Китая в Италию. При этом данный штамм содержал нуклеотидные последовательности генов PB2 and NS, имеющие высокую гомологию таковым у высокопатогенного штамма A/duck/Zhejiang/52/2000 (H5N1).

В целом, вирусывыделение составило менее одного процента. Подобный низкий процент выделения вируса гриппа, в сравнении со значением 5–15 % по литературным данным, мы объясняем физико-географическими характеристиками данного региона и экологическими особенностями

Таблица 2

Субтипы вируса гриппа А, выделенные от диких птиц

Штамм	Субтип	Год и место выделения	Объект выделения
A/magpie/Mongolia/17/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Сорока
A/isabelline wheater/Mongolia/19/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Каменка плясунья
A/grebe/Mongolia/24/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Чомга
A/cormorant/Mongolia/5/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Баклан большой
A/cormorant/Mongolia/2/03	H4N6	Август 2003, Монголия	Баклан большой
A/cormorant/Mongolia/22/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Баклан большой
A/tufted duck/Mongolia/16/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Хохлатая чернеть
A/velvet scoter/Mongolia/19/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Черный турпан
A/common merganser/Mongolia/29/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Большой крохаль
A/marsh harrier/Mongolia/30/04	H3N6	Август 2004, Монголия	Лунь болотный
A/Mallard/Mongolia/2307/2006	H1N1	Сентябрь 2006, Монголия	Кряква
A/roody shelduck/Mongolia/632/2007	H1N1	Сентябрь 2007, Монголия	Огарь
A/herring gull/Mongolia/454/08	H13N8	Сентябрь 2008, Монголия	Серебристая чайка
A/pochard/Siberia/249/08	H10N7	Август 2008, Республика Хакасия	Красноголовый нырок
A/european teal/Siberia/237/08	H3N8	Август 2008, Красноярский край	Чирок-свистунок
A/shoveler/Siberia/236/08	H3N6	Август 2008, Красноярский край	Широконоска
A/mallard/Siberia/294/08	H3N8	Август 2008, Красноярский край	Кряква

авиафауны. И мы считаем, что особенности экологических связей хозяев вируса гриппа приводят к более низкому, чем в других регионах, проценту носительства вируса гриппа в популяциях диких птиц.

С другой стороны, несмотря на низкий процент выделения, показано достаточно большое разнообразие субтипов вируса гриппа (табл. 2), включая выделение нового для Центральной Азии субтипа H13N8, а также участие в циркуляции вируса среди видов хозяев различных таксономических и экологических групп. Высокопатогенного вируса гриппа типа А субтипа H5N1 в наших исследованиях не выявлено. Однако следует отметить, что с 2006 г. на территории республики Тыва (Россия) регулярно фиксировались вспышки среди диких птиц, вызванные высокопатогенным вирусом гриппа H5N1 субтипа. Хронология возникновения вспышек в Центральноазиатском регионе может свидетельствовать о том, что территория Центральной Азии является ключевым регионом в эпизоотологии вируса гриппа.

Таким образом, исследования, проведенные по изучению циркуляции вируса гриппа у диких птиц, обитающих или мигрирующих в Центральной Азии, подтверждают важность этой территории в распространении вируса гриппа птиц для всей Евразии и подчеркивает необходимость мониторинговых исследований в этом регионе.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

Сведения об авторах

Марченко Василий Юрьевич – научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»; тел./факс: (383)336-75-40; e-mail: marchenko_vyu@vector.nsc.ru)
Шаршов Кирилл Александрович – к.б.н., заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»
Шестопалов Александр Михайлович – д.б.н., заведующий отделом ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. — М., 1979. — 270 с.
2. Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа А в популяциях диких птиц Северного Каспия / С.С. Ямникова [и др.] // Вопр. вирусол. — 2001. — №. 4. — С. 39–43.
3. Национальный атлас МНР. — Улан-Батор, М: Изд-во АН МНР и АН СССР 1990. — 144 с.
4. Рябицев В.К. Птицы Урала, Приуралья и Западной Сибири: Справочник-определитель. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2002. — 608 с.
5. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979–2002 гг.) / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. — 2004. — № 3. — С. 17–24.
6. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species // Vet. Microbiol. — 2000. — Vol. 74. — P. 3–13.
7. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls / R.A. Fouchier [et al.] // J. Virol. — 2005. — Vol. 79 (5). — P. 2814–2822.
8. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // Microbiol. Rev. — 1992. — Vol. 56. — P. 152–179.
9. Horimoto T., Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 14. — P. 129–149.
10. The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. — Harbin, 2001. — 79 p.
11. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann [et al.] // Arch. Virol. — 2001. — Vol. 146. — P. 2275–2289.

А.Н. Мирскова, С.Н. Адамович, **Е.Я. Виноградов**, Р.Г. Мирсков**СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МЕНИНГОКОККА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕНИНГИТА
НА ОСНОВЕ СОЛЕЙ 2-ГИДРОКСИАЛКИЛАМИНОВ**

Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)

Разработаны методы синтеза 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео- и 2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксацикло-[3,3,0]октанов; йодметилатов L-(+)-трео-, D-(-)-трео- и D-(-)-, L-(+)-трео-4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксацикло-[3,3,0]октанов. Впервые установлена высокая ростстимулирующая активность оптически-изомерных йодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксацикло-[3,3,0]октанов в отношении штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных, что указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита. Разработана селективная «Питательная среда сухая medium nutritum ad meningococcus siccum» для выделения и культивирования менингококков и способ ее приготовления. На основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомицетина (Chloramphenicol) — «L-треоамина» разработаны методы синтеза новых стимуляторов роста микроорганизмов.

Ключевые слова: стимуляторы роста менингококка, питательная среда

**MENINGOCOCCUS GROWTH STIMULATORS FOR MENINGITIS DIAGNOSTICS
BASED ON 2-HYDROXYLALKYLAMINE SALTS**A.N. Mirskova, S.N. Adamovich, **E.Ya. Vinogradov**, R.G. Mirskov

A.E. Favorsky Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk

The methods for the synthesis of 4-(4'-nitrophenyl)-L-(+)-treo- and 2,8-dimethyl-4-(4'-nitro-phenyl)-L-(+)-treo-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes as well as iodomethylates of L-(+)-treo-, D-(-)-treo- and D-(-)-, L-(+)-treo-4-(4'-nitrophenyl)-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes have been developed. It has been shown for the first time that optically isomeric iodo-methylates of 4-(4'-nitrophenyl)-1-aza-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]octanes possess high growth-stimulating activity with respect to meningococcus strains isolated from cerebrospinal fluid of patients thus indicating the possibility of these compounds application for qualitative diagnostics of meningitis. A method for the preparation of elective «Dry medium nutritum ad meningococcus siccum» for isolation and cultivation of meningococci has been elaborated. Methods for the synthesis of novel potential stimulators of microorganisms growth have been worked out on the basis of biologically active aryloxy(arylsulfanyl)acetic acids and waste of Levomecetin (Chloramphenicol) production, «L-treoamine».

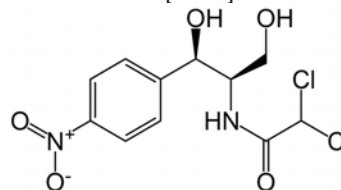
Key words: meningococcus growth stimulators, medium nutritum

Стимуляция роста возбудителей инфекционных заболеваний связана с проблемой надежной и быстрой диагностики заболеваний. Разработка питательных сред, обеспечивающих максимальную скорость размножения возбудителя с сохранением его полного антигенного комплекса, чрезвычайно важна. Применяемые в настоящее время сухие питательные среды для культивирования и выделения *N. meningitidis* на основе сердечно-мозгового экстракта, ферментативных гидролизатов казеина, сои, мяса с добавлением нативной сыворотки крови, витаминов, аминокислот и др. дефицитны и дороги. В практике здравоохранения для диагностики менингококковой инфекции в основном используется 20%-ный сывороточный агар на основе гидролизата мяса по Хоттингеру. Однако производство отечественных стандартных питательных сред для диагностики менингита в необходимых количествах является актуальной задачей.

**1. Новые стимуляторы роста менингококка
из промышленного отхода производства
антибиотика левомицетина**

Левомицетин (хлорамфеникол) — первый синтетический антибиотик широкого спектра действия, не утративший своей ценности для ра-

дикального излечения многих бактериальных и вирусных заболеваний [1–3]:

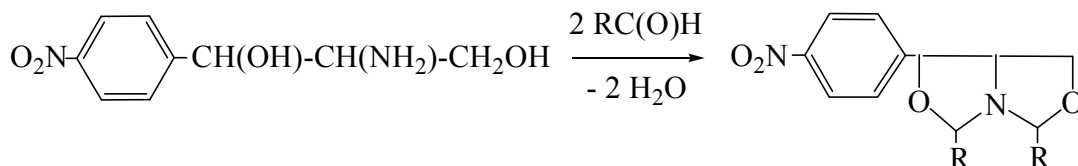


В производстве левомицетина используется только оптически активный левовращающий изомер D-(-)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиол («D-треоамин»), а его правовращающий L-(+)-изомер («L-треоамин») является крупнотоннажным отходом [4].

Нами предложены варианты утилизации отхода производства левомицетина — «L-треоамина» — L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола путем получения на его основе новых биологически активных соединений, представляющих практический интерес для микробиологии и медицины.

На основе «L-треоамина» разработаны методы синтеза 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео- и 2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксацикло-[3,3,0]октанов (А) Для

получения соединений (А: **1**, **2**) L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиол подвергают взаимодействию с параформом или ацетальдеги-



А: **1**, R = H; **2**, R = CH₃

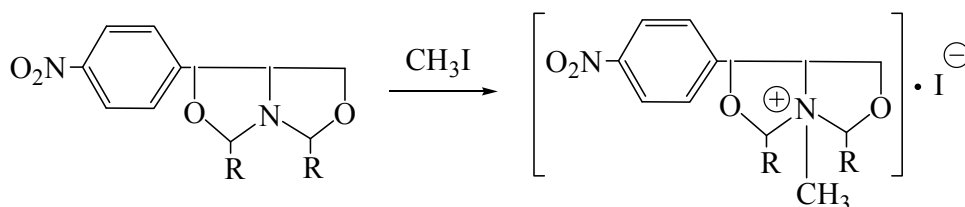
Соединения **1**, **2** — белые порошки, без запаха, устойчивые при хранении, растворимые в органических растворителях, не растворимые в воде. Циклическую структуру соединений **1**, **2** доказывает отсутствие в ИК спектрах полос поглощения первичной и вторичной гидроксильных групп, а также аминогруппы, характерных для исходного соединения.

Проведенные ранее фармакологические исследования соединений (А) (Естественно-научный инсти-

дом в соотношении 1:2, в среде кипящего бензола или толуола в течение 10-20 часов с полным удалением образующейся воды:

тут при Пермском государственном университете) показали, что новые соединения (А: **1**, **2**) при низкой токсичности обладают высокой противовоспалительной активностью, превышающей активность медицинского препарата бутадиона, что позволяет предполагать возможность их применения в медицине.

Реакцией соединений **1**, **2** с йодистым метилом в абсолютном эфире получены с высокими выходами соответствующие йодметилаты (В: **3**, **4**)



(В: **3**, R = H; **4**: R = CH₃)

Соединения (**3**, **4**) — порошки желтого цвета, растворимые в воде, нетоксичные (LD₅₀ 2000-4000 мг/кг). Аналогично синтезу соединения **3** из изомеров D-(–)-*трео*- и смеси D-(–)-с L-(+)-*трео*-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиолов последовательными реакциями с параформом и йодистым метилом синтезированы йодметилаты D-(–)-*трео*-(В: **5**) и D-(–)-, L-(+)-*трео*-4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октан (В: **6**).

Биологическая активность новых соединений **3**, **5**, **6** в качестве стимуляторов роста менингококка была впервые исследована в лаборатории детских бактериальных инфекций С.-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, где было установлено их существенное стимулирующее действие на развитие менингококков.

МЕТОДИКА

Ростстимулирующую активность оптически-изомерных соединений **3**, **5**, **6** изучали на штаммах менингококка, выделенных из спинномозговой жидкости больных. В качестве тест-культуры использовали эталонные штаммы вида *N. meningitidis*. Штаммы культивировали на полужидких и плотных питательных средах (агар Хоттингера с различными объемами сыворотки) с добавлением соединений **3**, **5**, **6**, которые вносили в питательные среды в концентрациях 10⁻⁴ — 10⁻⁸ вес. %. В опытах использовали питательные среды с содержанием аминного азота 170 — 180 мг %, pH 7,4, NaCl 0,5 %. Из взвеси 18 часовой культуры менингококков готовили ряд серийных разведений с коэффициентом 10. Вносили 0,1 мл каждого разведения в чашки Петри с агаром, содержащим различные концентрации стимуляторов (три повторности). Инкубировали 18 ч при 37°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность соединений **3**, **5**, **6** для роста менингококков представлена в таблице 1. Все соединения стимулировали рост менингококков даже на такой полноценной питательной среде, как сывороточный агар Хоттингера. Наиболее эффективным оказался йодметилат **3**, соединения **5**, **6** занимают примерно равное положение, но колонии менингококков, выращенные на средах с этими стимуляторами, более мелкие.

Таблица 1
Эффективность стимуляторов (**3**, **5**, **6**) для менингококков в % к посеву микробных клеток

Стимуляторы	Штаммы, выделенные из спинномозговой жидкости			
	1949	208	139	1520
Йодметилат 3 50 мкг/мл с 20% сыворотки	90	89	60	80
Йодметилат 3 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	79	80	85	75
Йодметилат 5 50 мкг/мл + агар с 20% сыворотки	80	85	70	87
Йодметилат 5 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	79	80	82	85
Йодметилат 6 50 мкг/мл + агар с 20% сыворотки	80	85	79	93
Йодметилат 6 50 мкг/мл + агар с 5% сыворотки	60	70	68	65
Агар с 20% сыворотки без стимулятора (контроль)	50	40	50	50
Простой агар, без сыворотки и без стимулятора (контроль)	2	10	роста нет	роста нет

В присутствии стимуляторов количество выросших колоний менингококков было больше на 30 – 50 % в сравнении с первым контролем (сывороточный агар) и на 60 – 90 % в сравнении со вторым контролем (простой агар). Стимуляторы не изменяли физиологических свойств менингококков. Агглютинабельность культур сохранялась.

Впервые установленная высокая ростстимулирующая активность оптическиизомерных йодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октанов (**В**) в отношении штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных (что особенно ценно), указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита. Поиск стимуляторов роста проводится в основном в отношении менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных и обладающих чрезвычайной лабильностью и прихотливостью к составу питательной среды.

Предложено использование йодметилата **3**, полученного из отхода производства левомецитина, для конструирования селективных питательных сред. Установлено, что добавление этого стимулятора в питательную среду позволяет уменьшить количество вносимого нативного белка (дорогой и дефицитной сыворотки лошадей и крупного рогатого скота на 15 %), способствует максимальному прорастанию микробных клеток из минимальной посевной дозы (1000 и 100 клеток) и значительно улучшают ростовые качества применяемой питательной среды, что, в свою очередь, повышает ценность бактериологических исследований.

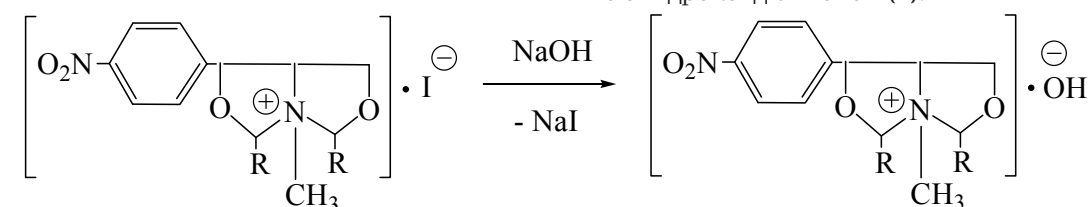
Преимуществом стимулятора (**3**) является его доступность, неограниченная сырьевая база, низкая стоимость при получении химическим путем из отхода крупнотоннажного производства, постоянный состав, хорошая растворимость в воде, устойчивость при хранении, нетоксичность, эффективность в низких концентрациях для максимальной скорости размножения возбудителя менингококка с сохранением его полного антигенного комплекса.

Разработана селективная «Питательная среда сухая medium nutritium ad meningococcus siccum» для выделения и культивирования менингококков и способ ее приготовления, включающая йодметилат 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октан (**3**) в качестве стимулятора роста и заменителя сыворотки лошадей и крупного рогатого скота.

2. Арилокси(арилсульфанил)ацетаты 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана как потенциальные стимуляторы роста микроорганизмов

С целью создания новых потенциальных стимуляторов роста микроорганизмов и изучения зависимости биологической активности от их строения разработаны методы синтеза структурных аналогов соединений (**В**) на основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомецитина - L-(+)-трео-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола («L-треомина»).

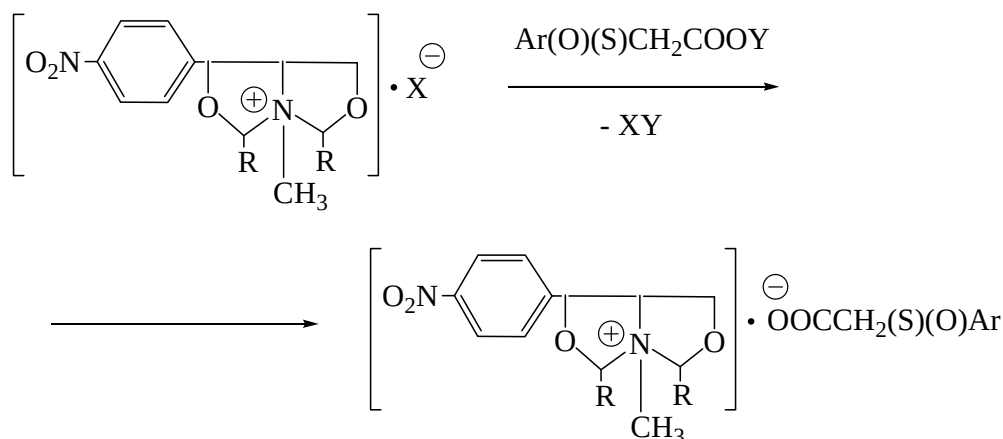
Реакцией ионного обмена из йодида 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана (**3**) получено соединение с гидроксид-анионом (**7**):



3, 7

Реакциями арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот или их солей с йодидом (**3**) или гидроксидом (**7**) синтезированы первые представители неизвестных ранее арилокси-(арилсульфанил)ацетатов

1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]-октана (**8, 9**) с потенциальной ростстимулирующей и фармакологической активностью:



8, 9

8: R = H, Ar = 4-Br-C₆H₄S, X = I, Y = K; **9:** R = H, Ar = 2-CH₃-C₆H₄O, X = OH, Y = H.

Соединения **7–9** — твердые кристаллические соединения, растворимые в воде, спирте, нерастворимые в органических растворителях. Строение их доказано данными ИК, ЯМР ^1H и ^{13}C спектров и элементным анализом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИМИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (1)

21.2 г (0.1 моль) 1-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-2-амино-1,3-пропандиола (т. пл. 160–163 °С), 6.4 г (0.2 моль) параформа и 100 мл бензола нагревают до кипения с ловушкой Дина-Старка в течение 10–15 часов до прекращения выделения воды. Растворитель отгоняют в вакууме. Остаток растворяют в этаноле, фильтруют и высаживают в гексан. Пересаживают повторно дважды. Получают 18.9 г (80 %) продукта с т. пл. 67–69 °С. ИК спектр: 1607 (C_6H_4), 1532 (C-N), 1050–1080 (C-O). Найдено, %: C, 56.71; H, 5.07; N, 11.87. $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: C, 56.77; H, 5.08; N, 11.40.

2,8-диметил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (2)

21.2 г (0.1 моль) 1-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-2-амино-1,3-пропандиола, 8.8 г (0.2 моль) ацетальдегида и 100 мл бензола нагревают до кипения с ловушкой Дина-Старка до полного прекращения выделения воды. Растворитель отгоняют в вакууме. Остаток перекристаллизовывают из гексана. Перекристаллизацию повторяют дважды. Получают 22.4 г (85 %) **2** с т. пл. 52–53 °С. ИК спектр: 1605 (C_6H_4), 1532 (C-N), 1050–1080 (C-O).

Найдено, %: C, 59.14; H, 6.42; N, 9.83. $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: C, 59.09; H, 6.06; N, 10.1.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (3)

В колбу, снабженную мешалкой и обратным холодильником с хлоркальциевой трубкой, помещают 50 г (0.024 моль) 4-(4'-нитрофенил)-L-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (**1**), 30 г (0.035 моль) свежеперегнанного иодистого метила и 30 мл абсолютного эфира. Смесь нагревают в течение 20 час. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, промывают абсолютным эфиром и сушат до постоянного веса. Получают 72 г (90 %) (**3**) с т. пл. 195 °С. Кристаллы светло-желтого цвета. Растворимы в воде, спирте, ДМСО, нерастворимы в эфире, бензоле. ИК спектр: 1670 (C_6H_4), 1532 (C-N), 1050–1080 (C-O). Найдено, %: C, 37.81; H, 3.99; I, 34.05; N, 7.71. $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_4$.

Вычислено, %: C, 38.09; H, 3.96; I, 33.59; N, 7.41.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (5)

Получали аналогично из 4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-трео-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана и иодистого метила. Выход 95 %. Найдено, %: C, 37.95; H, 3.95; I, 33.70; N, 7.50. $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{IN}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: C, 38.09; H, 3.96; I, 33.59; N, 7.41.

Йодид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-D-(–)-, L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (6)

Получали аналогично **5** из D,L-изомера. Выход 95 %. Для соединений **4,5** и **3** т. пл. совпадают.

Гидроксид 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (7)

Метанольный раствор 0.4 г (0.1 моль) NaOH прикапывали к метанольному раствору 3.78 г (0.1 моль) йодида (**3**). Реакционную смесь перемешивали 4 час при 20 °С и 4 час при 60 °С, охлаждали до 0 °С (72 часа). Выпавшие крупные призматические кристаллы NaI отфильтровывали. Растворитель отгоняли. Остаток промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 2.22 г (73 %). Светло-желтый порошок с т. пл. 160–165 °С. Умеренно растворяется в воде и спирте.

ЯМР ^1H (D_2O): 8.25–7.66 (м, 4H, C_6H_4); 5.52 (с, 4H, OCH_2N); 5.27 (с, 1H, CH); 4.93 (с, 1H, CH); 4.67 (с, 2H, OCH_2); 3.41 (с, 3H, N^+CH_3). ИК: 3339 (OH), 1678 (C_6H_4), 1525 (C-N), 1060–1090 (C-O). Найдено, %: C, 54.00; H, 5.75; N, 10.50. $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$.

Вычислено, %: C, 53.72; H, 6.01; N, 10.44.

4-Бромфенилсульфанилацетат 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (8)

3.78 г (0.01 моль) йодида **3** и 2.85 г (0.01 моль) калиевой соли 4-бромфенилсульфанилуксусной кислоты в 75 мл метанола нагревали до кипения 8 час. Смесь охлаждали до 0 °С 72 часа. Образовавшиеся кристаллы KI отфильтровывали. Растворитель отгоняли. Остаток промывали эфиром и высушивали в вакууме. Выход 1.22 г (63 %). Светло-желтый порошок с т. пл. 118 °С. Растворяется в воде и спирте. ЯМР ^1H (D_2O): 8.02–7.30 (м, 8H, $2\text{C}_6\text{H}_4$); 5.50 (уш. с, 4H, OCH_2N); 5.25 (уш. с, 1H, CH); 4.90 (уш. с, 1H, CH); 4.65 (с, 2H, OCH_2); 3.69 (с, 2H, SCH_2); 3.40 (с, 3H, N^+CH_3).

ИК: 1680 (C_6H_4), 1581 (C=O), 1515 (C-N), 1050–1085 (C-O). Найдено, %: C, 51.83; H, 4.75; N, 6.30. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_6\text{Br}$. Вычислено, %: C, 51.62; H, 4.55; N, 6.02.

2-Метилфеноксиацетат 1-метил-4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-азония-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октана (9)

2.68 г (0.01 моль) гидроксида **7** и 1.66 г (0.01 моль) 2-метилфеноксиуксусной кислоты в 50 мл метанола перемешивали 8 час при 20 °С. Отгоняли растворитель и H_2O . Остаток тщательно промывали сухим эфиром и высушивали в вакууме над P_2O_5 . Выход 3.09 г (74.5 %). Желтоватый порошок с т. пл. 104–106 °С. Растворяется в воде, спирте. ЯМР ^1H (D_2O): 8.12–6.73 (м, 8H, $2\text{C}_6\text{H}_4$); 5.57 (уш. с, 4H, OCH_2N); 5.27 (уш. с, 1H, CH); 4.90 (уш. с, 1H, CH); 4.61 (с, 2H, OCH_2); 4.43 (с, 2H, OCH_2COO); 3.41 (с, 3H, N^+CH_3); 2.18 (с, 3H, CH_3). ИК: 1685 (C_6H_4), 1595 (C=O), 1522 (C-N), 1058–1088 (C-O). Найдено, %: C, 60.81; H, 5.76; N, 6.51. $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено, %: C, 60.56; H, 5.80; N, 6.72.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлена высокая ростстимулирующая активность оптически изомерных йодметилатов 4-(4'-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло-[3,3,0]октанов в отношении

штаммов менингококков, выделенных из спинномозговой жидкости больных, что указывает на возможность их применения для качественной диагностики менингита.

2. Предложено использование йодметилата 4-(4'-нитрофенил)-L-(+)-трео-1-аза-3,7-диоксибицикло-[3,3,0]октана в качестве стимулятора роста и заменителя сыворотки лошадей и крупного рогатого скота для конструирования элективных питательных сред для выделения и культивирования менингококков.

3. На основе биологически активных арилокси(арилсульфанил)уксусных кислот и отхода производства левомицетина — L-(+)-трео-1-(4'-нитрофенил)-2-амино-1,3-пропандиола - раз-

работаны методы синтеза новых потенциальных стимуляторов роста микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Современные синтетические и природные лекарственные средства: Кр. Справочник. Изд. 2-е, перераб. и доп. — Пятигорск, гос. фармац. акад. 2002. — 335 с.
2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. — М.: Высш. шк., 1986. — 448 с.
3. Машковский М.Д. Лекарственные вещества. В 2-х тт. 14 изд. — М.: Новая Волна, 2000. — Т. 1 — 2.
4. Шарипова С.Х., Зайцев В.А. Левомицетин и химия 1-(п-нитрофенил)-2-аминопропан-диола-1,3. // Хим. фарм. журн. — 1986. — № 7. — С. 858 — 862.

Сведения об авторах

Мирскова Анна Николаевна — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)

Адамович Сергей Николаевич — к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

Мирсков Рудольф Григорьевич — д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

А.Я. Никитин ¹, Т.В. Зверева ², Н.С. Гордейко ², Е.А. Борисенко ², Ю.А. Вержущая ¹,
Т.А. Каменева ¹

СТРУКТУРА СООБЩЕСТВ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В КОНТИНЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ ЮГА ПРИМОРСКОГО КРАЯ И НА ОСТРОВЕ РУССКИЙ

¹ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт (Иркутск)

² Приморская противочумная станция (Уссурийск, Находка)

В апреле — июне 2012 г. проведен сбор и анализ структуры сообществ иксодовых клещей в различных биотопах на территории Приморского края. Выявлено пять видов клещей: *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, *I. pavlovskyi* Pomerantzev, 1946, *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844, *H. japonica douglasi* Nuttall et Warburton, 1915, *Dermacentor silvarum* Olenov, 1932. Показано, что в континентальной части Приморского края *I. pavlovskyi* встречается редко, а на острове Русский он обычен. На материке суммарно по всем сборам *H. japonica douglasi* преобладает над *H. concinna*. На о. Русский соотношение этих видов обратное. Различия в структуре сообществ иксодовых клещей, сформировавшиеся в силу специфики экологических условий и достаточно длительной изоляции фауны паразитов острова, могли повлиять на соотношение и свойства возбудителей инфекционных болезней человека, для которых организм переносчиков служит средой первого порядка.

Ключевые слова: иксодовые клещи, структура сообщества

STRUCTURE OF IXODES TICK COMMUNITIES AT THE CONTINENTAL PART OF SOUTH PRIMORYE TERRITORY AND RUSSIAN ISLAND

A.Ya. Nikitin ¹, T.V. Zvereva ², N.S. Gordeiko ², E.A. Borisenko ², Yu.A. Verzhutskaya ¹,
T.A. Kameneva ¹

¹ Irkutsk Anti plague Research Institute, Irkutsk

² Primorye Anti plague Station, Ussuriysk, Nakhodka

In April-June 2012 a collection and analysis of structure of *Ixodes* tick communities was performed in various biotopes at the Primorye Territory. Five tick species (*Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, *I. pavlovskyi* Pomerantzev, 1946, *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844, *H. japonica douglasi* Nuttall et Warburton, 1915, *Dermacentor silvarum* Olenov, 1932) were revealed. It was shown that *I. pavlovskyi* was rare at the continental part of the Primorye Territory, but it often happened at the Russian island. On the Continent *H. japonica douglasi* prevailed over *H. concinna* in total collections. Correlation of these species at the Russian island was reversed. Distinctions in the structure of *Ixodes* tick communities, formed due to specificity of ecological conditions and long enough isolation of the parasites' fauna at the island, could affect the ratio and features of the causative agents of the human infectious diseases for which the carrier organism serves as the first environment.

Key words: ixodes tick, community structure

Представители семейства иксодовых клещей имеют важное эпидемиологическое значение, так как являются переносчиками возбудителей целого ряда природно-очаговых инфекционных болезней человека. На территории Приморского края зарегистрировано 17 видов семейства [2], из которых массовыми являются: *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844, *H. japonica douglasi* Nuttall et Warburton, 1915, *Dermacentor silvarum* Olenov, 1932. Некоторые виды клещей способны сосуществовать, образуя различные по структуре сообщества. **Цель работы** — провести сравнительный анализ видов в сообществах клещей, характерных для континентальной части юга Приморского края и населяющих остров Русский.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные о структуре сообществ и численности иксодовых клещей получены в ходе плановых эпизоотологических обследований территорий, прилегающих к городам Находка, Уссурийск, а также на о. Русский в апреле-июне 2012 г. Сбор имаго осуществляли по стандартной методике на флаг

с растений и одновременно на учетчика [6]. При определении видовой принадлежности клещей использованы определители Б.И. Померанцева [4] и Н.А. Филипповой [7].

На материке сборы иксодовых клещей проведены в четырех биотопах: кедрово-широколиственных, чернопихтово-широколиственных, широколиственно многопородных лесах и на осокково-разнотравном луге.

На о. Русский обследованные биотопы по характеру растительных комплексов и влиянию человека разделены на две группы. Первая — лугополевая зона (около 5 % площади острова) — находится на побережье, а также в непосредственной близости к населенным пунктам, базам отдыха, то есть включает территории наиболее освоенных земель. Для нее характерен обедненный травяно-кустарниковый состав растительности (доминируют злаковые, осоки, несколько видов полыни). Вторая группа представлена лесами: мелколиственными (тополь, ольха), многопородными широколиственными (липа, ясень, осина, береза маньчжурская и плосколистная, клены, граб) и в меньшей степени

вторичными дубняками (дуб монгольский). Ни одна из групп островных биотопов не является независимой от влияния человеческого фактора, но зона лесов в меньшей степени антропогенно трансформирована.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Материалы о фауне иксодовых клещей Приморского края, в том числе островов, представлены в большом числе публикаций [1 – 3, 5]. Однако о. Русский в силу наличия на нем военных объектов на протяжении XX века был малодоступной территорией, что привело к его недостаточной изученности. Остров площадью около 10000 га (длина – 18 км, ширина – 13 км) расположен в заливе Петра Великого Японского моря. Постоянного населения 5200 человек. Наименьшее расстояние между ним и континентальной частью (г. Владивосток) 800 м.

Результаты обследования отдельных биотопов на континенте и острове отражены в таблице. Полученные данные указывают на различия в структуре сообществ иксодовых клещей. Так, на острове обычно одновременно сосуществуют на один-два вида больше, чем на континенте. Неожиданным

было обнаружение на о. Русский значительного числа особей *I. pavelovskyi* Pomerantzev, 1946, который, по данным литературы [2, 3, 5], редок не только в континентальной части Приморского края (табл. 1), но и на других островах. Высокая численность этого вида на о. Русский не оставляет сомнений, что на нем существуют самостоятельные его популяции. В отношении других островов Японского моря обнаружение *I. pavelovskyi* часто объясняют заносом паразита с птицами. В качестве одной из причин благоприятствующих жизни этого вида на острове можно назвать обедненность видового состава мелких млекопитающих при сравнительно большом количестве птиц, населяющих приземный ярус, что дает *I. pavelovskyi* определенные преимущества по отношению к *I. persulcatus* (табл. 1).

Еще одна особенность островных сообществ иксодовых клещей – это преобладание *H. concinna* над *H. japonica douglasi*. Известно, что первый из этих видов достигает высокой численности в луговых биотопах при условии их высокой увлажненности. Моринистость климата, более низкие температуры воздуха на острове, по сравнению с материком, менее комфортны для теплолюбивого

Таблица 1
Видовой состав и численность самок и самцов иксодовых клещей в биотопах разного типа на континенте и о. Русский (Приморский край)

Обследуемая территория	Биотоп	Вид клещей	Количество		Доля вида в сообществе (%)
			самок	самцов /нимф	
Континенталь- ная часть	Широколиственный многопородный лес	<i>I. persulcatus</i>	50	31/0	57,4
		<i>H. japonica</i>	29	25/6	42,6
	Кедрово-широколиственный лес	<i>I. persulcatus</i>	25	25/0	64,9
		<i>I. pavlovskyi</i>	2	6/0	10,4
		<i>H. japonica</i>	10	9/0	24,7
	Осоково-разнотравный луг (выпас скота)	<i>H. concinna</i>	22	23/0	23,2
		<i>D. silvarum</i>	25	25/0	76,8
	Чернопихтово-широколиственный лес	<i>I. persulcatus</i>	34	23/0	68,7
		<i>I. pavlovskyi</i>	1	1/0	2,4
		<i>H. japonica</i>	14	10/0	28,9
Суммарно по континенту (396 особей)		<i>I. persulcatus</i>	109	79/0	47,5
		<i>H. japonica</i>	53	44/6	26,0
		<i>I. pavlovskyi</i>	3	7/0	2,5
		<i>H. concinna</i>	22	23/0	11,4
		<i>D. silvarum</i>	25	25/0	12,6
о. Русский	Луго-полевой (антропогенно трансформированный)	<i>I. persulcatus</i>	14	14/0	28,6
		<i>I. pavlovskyi</i>	5	1/0	6,1
		<i>H. concinna</i>	30	33/0	64,3
		<i>D. silvarum</i>	1	0/0	1,0
	Широколиственный многопородный лес	<i>I. persulcatus</i>	160	150/8	58,5
		<i>I. pavlovskyi</i>	95	54/0	27,4
		<i>H. concinna</i>	9	5/4	3,3
		<i>H. japonica</i>	36	21/2	10,8
Суммарно по о. Русский (642 особи)		<i>I. persulcatus</i>	174	164/8	53,9
		<i>H. japonica</i>	36	21/2	9,2
		<i>I. pavlovskyi</i>	100	55/0	24,1
		<i>H. concinna</i>	39	38/4	12,6
		<i>D. silvarum</i>	1	0/0	0,2

H. japonica douglasi. Именно поэтому все биотопы прибрежной части континента, где отлавливается *H. japonica douglasi* удалены от моря, тогда как в прибрежных дубняках вид также как на острове редок.

Кроме того, пока на о. Русский не выявлены участки с высокой численностью *D. silvarum*, хотя из литературных источников [8] и предшествующих наблюдений известно, что он постоянно на нем встречается. Вероятно, это следствие низкой численности сельскохозяйственных животных и истребления диких копытных — основных прокормителей для имаго этого вида.

Различия в структуре сообществ иксодовых клещей, сформировавшиеся в силу специфики экологических условий (прежде всего, моринистость климата, особенности растительных формаций, своеобразие фауны прокормителей), сильная антропогенная трансформация в конце XIX — начале XX веков, сменившаяся достаточно длительной относительной изоляцией фауны паразитов острова, могли повлиять на соотношение видов и свойства возбудителей инфекционных болезней человека, для которых организм переносчиков служит средой первого порядка. Этот вопрос требует специального изучения. Актуальность данной проблемы для здравоохранения России определяется, с одной стороны, проведением в сентябре 2012 г. на о. Русский Саммита АТЭС, вследствие чего ожидается прибытие на него многочисленных участников и гостей. С другой стороны, важно избежать ухудшения эпидемиологической обстановки на острове по инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами, после открытия в 2012 г. на его территории Федерального Дальневосточного университета и множества других культурно-развлекательных и туристических объектов, что приведет к резкому возрастанию плотности

населения, а следовательно, контактов людей с природными стадами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликова Н.П. Основные эколого-фаунистические комплексы иксодид, поддерживающие существование природных очагов инфекций в Приморском крае // Мед. паразитол. — 1969. — № 4. — С. 401 — 405.
2. Болотин Е.И. Зоогеографический анализ фауны иксодовых клещей (PARASITIFORMIS, IXODIDAE): Материалы науч. конф. «Чтения памяти А.И. Куренцова». Владивосток: Дальнаука, 2000. — Вып. 9. — С. 65 — 90.
3. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае: вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. — Владивосток: Дальнаука, 1997. — 190 с.
4. Померацев Б.И. Иксодовые клещи (Ixodidae). — Л.: Наука, 1950. — 224 с.
5. Сагдиева П.Д. Кровососущие клещи (Parasitiformes) млекопитающих заповедных территорий Приморского края : дисс. ... канд. биол. наук. — Тбилиси, 1984. — 296 с.
6. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих — переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций: Методические указания МУ 3.1.1027-01. — М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. — 55 с.
7. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. Ixodinae. — Л.: Наука, 1977. — 396 с.
8. Филиппова Н.А., Пласкина М.А. Некоторые аспекты внутривидовой изменчивости близкородственных видов группы *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) как показатель микроэволюционного процесса // Паразитология. — 2005. — Т. 39, № 5. — С. 337 — 364.

Сведения об авторах

Никитин Алексей Яковлевич — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (г. Иркутск, 664047, Иркутск, Трилисера, 78; e-mail: Nikitin_irk@mail.ru)

Зверева Татьяна Викторовна — зоолог, ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Находка

Гордейко Наталья Станиславовна — зоолог, ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Уссурийск

Борисенко Елена Александровна — зоолог, ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Уссурийск

Вержуцкая Юлия Алексеевна — к.б.н., научный сотрудник зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск

Каменева Татьяна Анатольевна — студентка Восточно-Сибирской государственной академии образования

А.К. Никифоров, М.Н. Киреев, О.В. Громова, А.В. Комиссаров, С.А. Еремин, О.А. Волох,
Ю.А. Алешина, А.В. Гаева, Т.Л. Захарова, В.И. Павлова

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ *VIBRIO CHOLERA* 569B ИНАБА, ПОЛУЧЕННЫХ НА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ И РАЗРАБОТАННОМ БИОРЕАКТОРАХ И ПО УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Изучены иммунохимические, физические и биохимические свойства протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569B Инаба, полученных на производственном и сконструированном биореакторах и с применением технологии их концентрирования тангенциальной ультрафильтрацией. Во всех препаратах было определено присутствие таких ферментов, как протеаза, твиназа и лизофосфолипаза. Проведенный дот-иммуноанализ показал на одинаковое содержание холерогена-анатоксина и О-антигена в исследуемых образцах. Изучение специфических фракций с помощью хроматографических и электрофоретических методов продемонстрировали подобие их свойств. Таким образом, доказана возможность использования сконструированного биореактора и технологии концентрирования протективных антигенов *V. cholerae* 569B Инаба тангенциальной ультрафильтрацией в производственном процессе получения вакцины холерной химической бивалентной таблетированной.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холероген-анатоксин, О-антиген, свойства

EVALUATION OF *VIBRIO CHOLERA* 569B INABA PROTECTIVE ANTIGENES, DERIVED ON INDUSTRIAL AND DEVELOPED BIOREACTORS AS WELL AS BY IMPROVED TECHNOLOGY

A.K. Nikiforov, M.N. Kireyev, O.V. Gromova, A.V. Komissarov, S.A. Yeriomin, O.A. Volokh,
Yu.A. Alechina, A.V. Gayeva, T.L. Zakharova, V.I. Pavlova

Scientific Research Anti-plague institute «Microbe», Saratov

We evaluated immunochemical, physical and biochemical properties of *Vibrio cholerae* 569B INABA protective antigens, derived on industrial and own-developed bioreactors as well as by technology of its concentration by tangential ultrafiltration. We detected protease, twnase and lysophospholipase in all samples. Also, dot-immunoanalysis showed equal concentration of cholero-gen-anatoxine and O-antigen in all samples too. Using chromatography and electrophoresis, we found their properties as similar. Thus, we suppose to be possible using developed bioreactor as well as technology of *Vibrio cholerae* 569B INABA protective antigens concentration by tangential concentration during a process of synthetic oral cholera vaccine production.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholero-gen-anatoxine, O-antigen, features

Нами было усовершенствовано производство вакцины холерной бивалентной химической таблетированной за счет внедрения в производственный процесс сконструированного биореактора и обоснована возможность использования процесса концентрирования протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569B Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации [1, 3, 4, 7].

Была изучена кинетика роста биомассы производственных штаммов холерных вибрионов и накопления О-антигенов (О-АГ) *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, а также холерогена *V. cholerae* 569В серовара Инаба [3]. Было показано, что кинетика роста биомассы и накопления О-АГ и холерного токсина значимо не отличается от аналогичных показателей в существующих производственных реакторах, при этом полученные полупродукты (О-АГ и холероген-анатоксин (ХА)) соответствуют нормируемым требованиям. В результате дальнейших исследований было установлено, что культивирование производственных штаммов холерных вибрионов на разработанном биореакторе обеспечивает по-

лучение кондиционных нативных протективных антигенов, при этом изучение физиологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах показало их идентичность. Кроме того, исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, показало, что она соответствует требованиям нормативной документации и не уступает по качеству препарату, производимому традиционным способом [1].

При этом свойства полученных компонентов вакцины изучались только в соответствии с показателями, установленными нормативными документами на производство холерной вакцины. Поэтому значимый научно-практический интерес представляло более детальное исследование иммунохимических, физических и биохимических свойств протективных антигенов *Vibrio cholerae* 569В Инаба, полученных на производственных и разработанном биореакторах и по усовершенство-

ванной технологии, что и являлось целью данной работы.

МЕТОДИКА

В качестве препарата сравнения использовали сухую специфическую фракцию, содержащую ХА и О-АГ холерного вибриона 569В серии 208, полученную в соответствии с производственным регламентом. Исследованиям подвергались две сухие специфические фракции, содержащую ХА и О-АГ холерного вибриона 569В: полученные на разработанном (препарат 1) и производственном (препарат 2) биореакторах. Другим отличием препаратов 1 и 2 от полученных по регламентному способу являлось то, что безмикробный детоксигированный центрифугат, содержащий ХА и О-АГ холерного вибриона 569В (препарат 2), был подвергнут концентрированию тангенциальной ультрафильтрацией.

В исследовании использовали коммерческую сыворотку диагностическую холерную О1 адсорбированную сухую для реакции агглютинации производства РосНИПЧИ «Микроб» (серия 78) и ОСО стандартной антихолерогенной сыворотки, полученную иммунизацией кроликов очищенным от О-антигена энтеротоксином (серия 8).

Хроматографическое фракционирование осуществляли на системе для хроматографии Biologic LP (Bio-Rad, США) с использованием колонки длиной 16 см с внутренним диаметром 2,0 см с TSK-гелем HW-65. Электрофоретический контроль выделенных фракций осуществляли на системе для электрофореза «Mini protean II» фирмы «Bio-Rad» (США).

Для определения протеазной активности использовали 10%-й молочный агар. Для нахождения фермента фосфолипазы А₂ использовали специальную среду с эмульсией яичного желтка. Для определения твиназной активности использовали следующую среду: 1,2 % агар Дифко, 0,01 М трис-буфер (рН-7,5-7,6) с 0,14 М натрия хлористого, твин 40 (0,4 % по объему), 0,05 мл 1М раствора магния сульфата на 100 мл, натрия азид 0,02 %. При исследовании активности лизофосфолипазы использовали среду с эмульсией яичного желтка, предварительно обработанной коммерческой фосфолипазой А₂ из пчелиного яда. Определение ферментов проводили путем использования специальных твердых агаровых сред по разработанным методам [2, 6]. Постановка всех реакций осуществлялась на агаровых пластинках и чашках Петри с рядом лунок. Чашки помещали в термостат при температуре 37 °С и учет результатов проводили через 1 сут, окончательный — через 2 сут. Наличие ферментов регистрировали в пробе, взятой в количестве 0,1 мл. Действие протеазы учитывали по ширине протеолиза вокруг лунки. О наличии фосфолипазы, лизофосфолипазы и твиназы судили по появлению зон помутнения вокруг лунки.

Определение концентрации белка проводили в соответствии с методиками, изложенными в

«Методических указаниях...» (МУК 4.1/4.2.588-96). Определение химического состава общепринятыми методиками: суммарные углеводы — по Дюбуа, альдогептозы — по Osborn. Количество нуклеиновых кислот измеряли по методу, описанному А.С. Спириным [5]. Для определения общих липидов использовали биотест «Lachema».

Для изучения специфической активности препаратов *in vitro* использовали метод дот-иммуноанализа с применением конъюгата специфических антител с коллоидным золотом. Для постановки дот-иммуноанализа исследуемые образцы (содержание белка 2 мг/мл) титровали в 96-луночном планшете с деионизованной водой. Затем на нитроцеллюлозную мембрану «Millipore» (0,45 мкм) наносили по 2 мкл образца в виде последовательного ряда точек, начиная с разведения 1:20. После впитывания материала и высыхания мембраны, ее два раза промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида по 3 мин. Затем мембрану погружали в 3%-й раствор бычьего сывороточного альбумина на 15 мин для блокировки свободных сайтов связывания. После чего мембрану промывали 0,9%-м раствором натрия хлорида два раза по 3 мин, а затем — два раза по 3 мин деионизованной водой. Заблокированную мембрану помещали в 400 мкл приготовленного конъюгата специфических антител. Мембрану выдерживали в течение 1,5–2 ч при температуре 20–25 °С, промывали проточной водой, после чего учитывали результат. За титр принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно красного либо оранжевого цвета.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение химического состава фракций, полученных двумя различными способами, результаты которого представлены в таблице 1, показало, что общее количество основных химических компонентов в препаратах было, в основном, подобным.

Таблица 1
Сравнительная характеристика препарата холерогена-анатоксина и О-антигена, полученных по регламентной и усовершенствованной технологиям

Наименование характеристики	Значение характеристики специфической фракции содержащей ХА и О-АГ		
	Серия 208	Получен по экспериментальной технологии	
		препарат 1	препарат 2
Белок, %	31,0	23,5	24,0
Углеводы, %	15,0	15,3	15,3
Липиды, %	8,61	8,3	8,3
Нуклеиновые кислоты, %	0,81	0,84	0,84
Альдогептоза, %	0,11	0,085	0,09

Как было показано ранее [2], в специфической фракции холероген-анатоксин из штамма холерного вибриона 569В преобладали два фермента — твиназа и лизофосфолипаза. Проведенные нами исследования показали следующие результаты: в

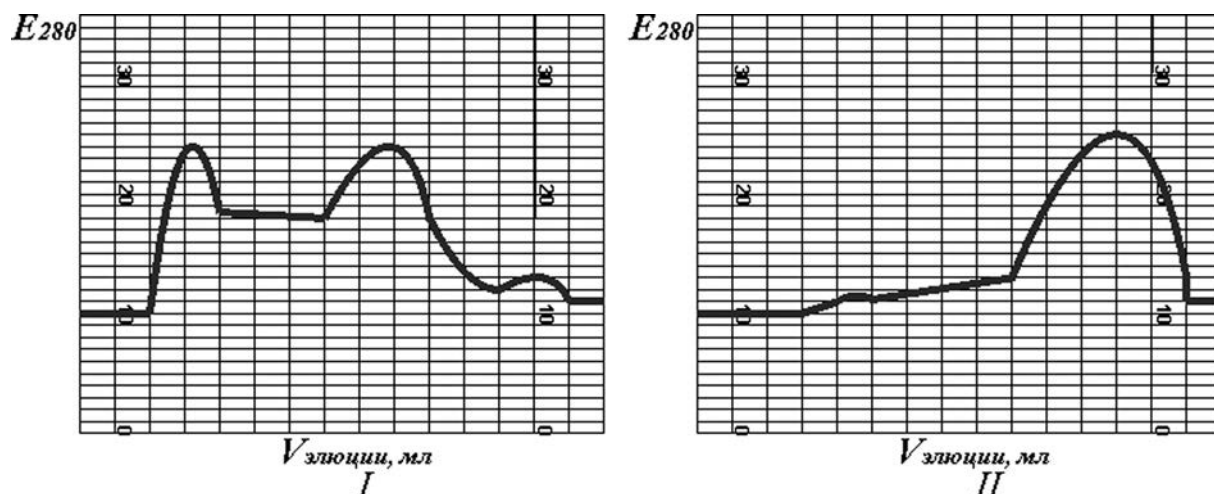


Рис. 1. Результаты хроматографического анализа препаратов: I – препараты 1 и 2 (хроматограммы для них одинаковы); II – серия 208.

серии 208 были определены протеаза (1:4), твиназа (1:4), лизофосфолипаза (1:4) и фосфолипаза A2 (1:8); в экспериментальных сериях (препараты 1 и 2) – протеаза (1:2), твиназа (1:2), лизофосфолипаза (1:4).

С использованием дот-иммуноанализа были проведены исследования содержания ХА и О-АГ в препаратах 1 и 2. Полученные данные свидетельствуют о том, что ХА и О-АГ в обоих препаратах обнаруживается в разведениях 1:380 и 1:1280 соответственно. Был проведен анализ полученных специфических фракций с помощью хроматографического разделения на колонке с TSK-гелем HW-65 по величине молекулярной массы (рис. 1). Полученные этим методом результаты исследования экспериментальных препаратов продемонстрировали их подобие, при этом с колонки элюировалось три пика.

Проведенный анализ электрофоретической подвижности экспериментальных препаратов, данные которого представлены на рисунке 2, свидетельствует о том, что их белково-углеводные комплексы практически идентичны и состоят из компонентов с молекулярной массой от 12 до 90 кДа.

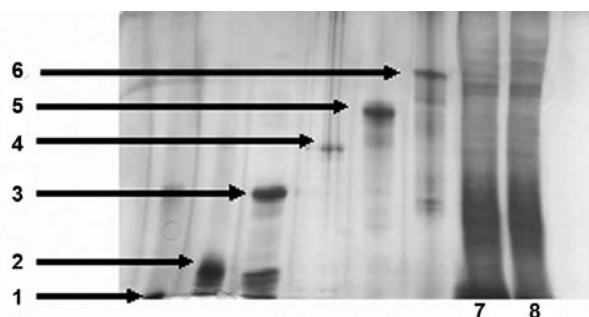


Рис. 2. Результаты анализа электрофоретической подвижности препаратов, проведенного с использованием диск-электрофореза с окраской серебром. 1–6 – маркеры молекулярной массы (1 – 12300 Да, 2 – 17800 Да, 3 – 25000 Да, 4 – 37000 Да, 5 – 45000 Да, 6 – 67000 Да); 7 и 8 – препараты 1 и 2 соответственно

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенный сравнительный анализ иммунохимических, физических и биохимических свойств протективных антигенов полученных по традиционной технологии и с помощью разработанного ферментационного оборудования и по экспериментальной технологии показал, в основном, их подобие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исследование процессов культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной в сконструированном биореакторе / А.К. Никифоров [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – (в печати).
2. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 2. – С. 87 – 92.
3. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины / А.Ю. Ульянов [и др.] // Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 1. – С. 39 – 44.
4. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации / А.В. Комиссаров [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – 2011. – Вып. 3(109). – С. 75 – 77.
5. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – Т. 23. – Вып. 5. – С. 656 – 662.
6. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах / И.А. Кузьмиченко [и др.] // Пробл. особо опасных инф. – 2002. – Вып. 1 (83). – С. 148 – 152.

7. Ферментационная установка для культивирования микроорганизмов / А.К. Никифоров [и др.] // Патент № 86184 РФ, МПК C12M1/02, C12R1/01; 27.08.09., Бюл. № 24.

Сведения об авторах

Никифоров Алексей Константинович – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора по научной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Киреев Михаил Николаевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Громова Ольга Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Комиссаров Александр Владимирович – кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (410040 Россия, город Саратов, улица Техническая, дом. 47/61, кв. 117; тел. 89172132402; e-mail: Komissarov-9@yandex.ru)

Еремин Сергей Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий отделом, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Волох Оксана Александровна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Алешина Юлия Александровна – младший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Гаева Анна Вячеславовна – младший научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Захарова Татьяна Львовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Павлова Варвара Игоревна – научный сотрудник, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

С.М. Попкова¹, Е.Б. Ракова¹, Е.Л. Кичигина^{1,2}, У.М. Немченко¹, Ю.П. Джиоев¹

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ У ДЕТЕЙ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН (Иркутск)

² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)

Изучены особенности кишечного, носоглоточного микробиоценозов и видового состава бифидобактерий у детей, проживающих в промышленных городах Иркутской области в условиях существующей техногенной нагрузки. Определены основные варианты микробиоценозов у детей в городах с разным уровнем загрязнения атмосферного воздуха.

Ключевые слова: микробиоценозы, ценоотипы, бифидобактерии, «индикаторные виды»

MICROECOLOGICAL LANDSCAPE OF DIFFERENT BIOTOPES IN CHILDREN LIVING IN IRKUTSK REGION

S.M. Popkova¹, E.B. Rakova¹, E.L. Kichigina^{1,2}, U.M. Nemtchenko¹, Yu.P. Dzhioev¹

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

Intestinal, nasopharyngeal microbiocenoses peculiarities and bifidobacteria species composition in children living in the Irkutsk region industrial cities under existing technogenic loading conditions have been studied. Major microbiocenosis variants in children living in the cities with the different levels of the atmospheric air pollution have been determined

Key words: microbiocenoses, cenotypes, bifidobacteria, «indicator forms»

ВВЕДЕНИЕ

Нормальная микрофлора человека находится в прямой зависимости от факторов окружающей среды и, если по своей интенсивности негативное влияние среды превышает компенсаторные возможности экологической системы «макроорганизм — его нормальная микрофлора», то возникают микроэкологические или, иначе — дисбиотические нарушения, которые нередко являются пусковым механизмом развития и поддержания патологических состояний [8]. Дисбиотические нарушения в пищеварительном тракте проявляются в изменении многих показателей, в том числе и в появлении атипичных штаммов микроорганизмов. Причиной широкого распространения дисбиозов являются как социальные факторы, так и ухудшение экологической обстановки, влияющей на состояние коллективной резистентности населения. В процессе постоянного взаимодействия макро- и микроорганизмов формируется уникальная система, находящаяся в состоянии динамического равновесия. При этом постоянство микрофлоры, микробиологический фенотип, присущий каждому человеку, является показателем иммунологической реактивности организма и одним из факторов естественного иммунитета. [1]. В условиях мощной техногенной нагрузки, которая имеет место в промышленных городах Иркутской области, изменения микробиоценозов в различных биотопах очевидны и имеют свои характерные, региональные особенности. От неблагоприятных факторов внешней среды, в первую очередь, страдают дети, поэтому оценка резистентности макроорганизма

детей имеет существенное значение в системе медико-биологического мониторинга.

Цель исследования: изучение архитектоники кишечного и носоглоточного микробиоценозов у детей Иркутской области с определением основных комбинаций микроэкологических ценоотипов и видового регионального рейтинга бифидофлоры в условиях техногенного прессинга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе обследовались дети, проживающие в промышленных городах Иркутской области, характеризующихся высоким уровнем техногенной нагрузки: гг. Иркутск, Ангарск, Шелехов, и в поселке Тиреть, имеющим значительно меньший уровень загрязнения атмосферного воздуха. Материалом для изучения служили образцы фекалий, мазки из носа и зева. Исследования проводились с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288). При исследовании микрофлоры слизистых оболочек носа и зева, бактериологическом исследовании качественного и количественного состава микроорганизмов толстого кишечника использовали стандартный комплекс микробиологических методов [6, 7]. Степень обсемененности образцов выражали в виде десятичного логарифма на 1 грамм фекальной массы (lg КОЕ/г).

Степень нарушения популяционного состава микроорганизмов кишечника (дисбактериоз) определялась по классификациям И.Б. Куваевой и

К.С. Ладодо (1991) [2]. В работе руководствовались рекомендациями, представленными в Отраслевом стандарте [6]. Видовая идентификация бифидобактерий была проведена с использованием метода гибридизации нуклеиновых кислот (МГНК) [4]. Гибридизацию со специфическими синтетическими олигонуклеотидными зондами провели на 50 образцах ДНК бифидобактерий, выделенных из 75 проб фекалий детей, проживающих в г. Иркутске и Ангарске. Был использован набор синтетических олигонуклеотидных зондов, специфически комплементарных видам: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, т.к. именно эти виды наиболее часто встречаются в биоценотической картине людей различных возрастных групп.

Всего состояние кишечного и носоглоточного биотопов проанализировано у 100 клинически здоровых детей 5–6 лет и 1492 детей от 1 месяца до 5 лет с манифестацией симптомов дисбиоза кишечника из Иркутска; у 64 здоровых детей из Ангарска и 35 — из Шелехова. В пос. Тынть у 30 дошкольников была исследована микрофлора носоглоточного биоценоза.

Оценка качества атмосферного воздуха (индекс загрязнения атмосферы — ИЗА) дана по материалам Иркутского межрегионального территориального управления по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды.

Статистическая обработка данных произведена при помощи прикладных программ «MS Excel for Windows» методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента при критическом значении уровня значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, 40–50 % заболеваний человека так или иначе связаны с изменением состояния окружающей среды и, в первую очередь, с загрязнением воздушного бассейна. Динамика валовых выбросов от стационарных источников за последние годы на изучаемых территориях характеризовалась достоверным снижением в 3,9 раза в г. Иркутске и в 1,14 раза в г. Ангарске. Однако в указанный период увеличилось количество выбросов от автотранспорта. В целом, средний уровень загрязнения атмосферного воздуха (ИЗА) в г. Ангарске и Иркутске оценивался как высокий и определялся значениями ИЗА = 15,9 и ИЗА = 15,7 условных единиц соответственно.

В поселке Тынть, муниципальном образовании Заларинского района Иркутской области, постоянного контроля за качеством воздушного бассейна не проводилось. В экспедиционных исследованиях установлено, что ИЗА = 0,7, и, следовательно, уровень загрязнения воздушного бассейна можно оценить как невысокий. Приоритетное воздействие выбросов вредных веществ во всех городах приходилось на органы дыхания. Индекс опасности (НИ дх.) в г. Ангарске составил 13,9, а в г. Иркутске — 7,4. Отмечены также высокие уровни риска нарушений иммунитета у детей в этих городах: 5,6 и 4,9, соответственно. Индексы опасности

в пос. Тынть не превышали допустимого значения ($НИ < 1$), что свидетельствует о низком риске развития экологически обусловленных нарушений показателей здоровья [5].

Сравнительный анализ региональных данных, характеризующих состав симбионтной микрофлоры в различных городах России, выявил тенденцию ее наибольшего угнетения в Иркутске и Ангарске по сравнению с другими промышленными городами России (Санкт-Петербург, Москва и Кемерово [3]). Полагаем, что оценка характерных особенностей микробиоценозов отдельных биотопов у детей Иркутской области позволит выделить сочетания микрoэкологических ценотипов, характерных для каждого конкретного города, и тем самым, определить региональные ориентиры, прикладное значение которых неоспоримо.

У обследованных «здоровых» детей из районов г. Иркутска с разным уровнем загрязнения атмосферного воздуха выявлены свои особенности архитектоники кишечного микробиоценоза. Прежде всего, следует отметить, что среднее содержание бифидобактерий у детей Кировского района $(7,76 \pm 1,10 \lg \text{КОЕ/г})$, тогда как у детей пос. Молодежный этот показатель соответствует нижней границе нормы $(8,64 \pm 0,14 \lg \text{КОЕ/г})$ [6]. Частота выявления эшерихий с атипичными свойствами выше в пос. Молодежный, чем у детей Кировского района. Это явление может свидетельствовать о том, что дети пос. Молодежный могли получить определенную ксенобиотическую нагрузку, стимулирующую диссоциацию нормальной кишечной палочки. Положительным фактором следует считать то, что у детей из этих районов не обнаружено гемолитических форм кишечной палочки и грибов рода *Candida*. Условно-патогенных микроорганизмов в диагностически значимых титрах так же не выявлено.

Несколько иные результаты получены при обследовании детей в г. Ангарске. Среднее содержание бифидобактерий в кишечном биоценозе дошкольников Ангарска составляло $8,8 \pm 0,4 \lg \text{КОЕ/г}$, что сопоставимо с нижним пределом показателей физиологической нормы. У детей школьного возраста среднее содержание бифидо- и лактобактерий было значительно ниже общefизиологических показателей. У всех детей в значительных концентрациях $(7,1 \pm 0,9 \lg \text{КОЕ/г})$, вытесняя нормальную кишечную палочку, выделялась *E. coli*, утратившая биохимическую активность (лактозонегативные и слабоферментативные варианты). Рейтинговая архитекtonика и возрастной анализ условно-патогенной микрофлоры, присутствующей в кишечной микробиоте показали, что, если у младших детей г. Ангарска преобладали энтеробактерии, то у школьников доминировали клостридии, и то же время в два раза увеличилось число носителей патогенных грибов рода *Candida*, выделяемых в диагностически значимых титрах $(5 \lg \text{КОЕ/г})$, что является отражением пониженной иммунорезистентности организма.

При исследовании материала из толстого кишечника у детей г. Шелехова были получены результаты, отличающиеся от аналогичных показателей у детей г.г. Иркутска и Ангарска. Доминирующее положение в кишечном биоценозе детей школьного возраста г. Шелехова занимали бифидо- и лактобактерии, резкого дефицита этих микроорганизмов не было выявлено ни у одного ребенка. Среднее содержание бифидобактерий в кишечнике определялось в $8,9 \pm 0,2 \lg \text{КОЕ/г}$, что по общезиологическим стандартам соответствовало нижней границе нормы. Содержание лактобацилл у школьников соответствовало норме и составляло $8,3 \pm 0,9 \lg \text{КОЕ/г}$. Обращает на себя внимание тот факт, что у каждого пятого ребенка в г. Шелехове выделенные эшерихии определялись как атипичные, с потерей некоторых биохимических свойств (либо лактозонегативная кишечная палочка, либо слабоферментативная). Но в целом, атипичные формы кишечной палочки выделялись в 3 раза реже, чем среди школьников г. Ангарска. В то же время в кишечном биоценозе детей г. Шелехова очень часто встречалась гемолитическая форма кишечной палочки ($36,8 \pm 8,8 \%$), тогда как в г. Ангарске этой формы не было выявлено. Таким образом, *E. coli* с гемолитическими свойствами в данном случае можно расценивать как индикаторный микроорганизм, выявление которого дает основание характеризовать микробный статус у значительного числа детей в данном городе как неблагоприятный. Другим значимым микроорганизмом в кишечном биоценозе школьников г. Шелехова можно считать энтерококки, которые были выявлены у половины детей ($52,6 \pm 9,1 \%$), что

значительно чаще, чем в г. Ангарске ($29,0 \pm 8,4 \%$) (рис. 1).

Характерной особенностью микробного пейзажа слизистой носоглотки детей из г. Шелехова было то, что выделенный эпидермальный стафилококк, во всех случаях обладал ярко выраженной гемолитической активностью. Наличие гемолитических свойств у эпидермального стафилококка свидетельствует о повышенной вирулентности циркулирующих среди детей штаммов этого вида. У обследованных нами школьников стафилококки высевались чаще со слизистых носа ($68,9 \pm 8,4$), чем из зева ($27,5 \pm 2,4$). Анализ микрофлоры носоглоточного биотопа дает основание констатировать, что для школьников г. Шелехова «микроорганизмом-индикатором», отражающим неблагоприятную ситуацию носоглоточного биоценоза, может быть назван эпидермальный стафилококк с гемолитическими свойствами.

В результате микробиологического анализа мазков со слизистых поверхностей носоглотки у детей г. Ангарска было установлено, что они в значительной степени обсеменены двумя видами стафилококков — *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Было установлено, что все выделенные аутоштаммы эпидермального стафилококка обладали ярко выраженной гемолитической активностью. Причем дошкольники имели 100%-ю суммарную обсемененность носоглотки этим условно-патогенным микроорганизмом, а у школьников высеваемость стафилококков со слизистых носоглотки по сравнению с дошкольниками снизилась до 66,6 %, при этом и индикация в-гемолитического стрептококка также уменьши-

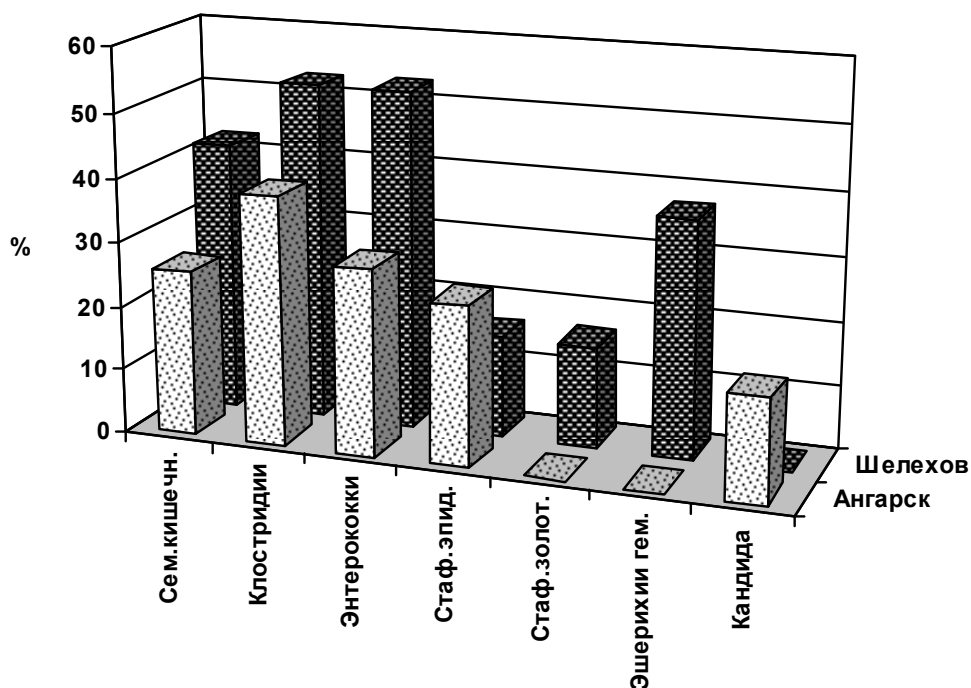


Рис. 1. Частота выделения условно-патогенных микроорганизмов из кишечного биоценоза школьников г.г. Ангарск, Шелехов.

лась вдвое. Следует отметить, что неблагоприятным моментом для детей г. Ангарска является то, что у школьников отмечается заметное повышение частоты носительства на слизистых зева дрожжеподобных грибов рода *Candida* (до 12,5 %) по сравнению с дошкольниками (6,9 %). Носительство патогенных грибов рода *Candida* во всех установленных случаях сочеталось с носительством золотистого стафилококка.

Лидирующим видом из выделенных культур УПМ на слизистых поверхностях носоглотки у всех детей дошкольного возраста п. Тыреть был *S. aureus* (66,6 %), следующим по выделяемости — гемолитический стрептококк (40 %), в равных долях высевались *S. epidermidis* и патогенные грибы рода *Candida*. Микроорганизмы родов Эшерихии, Цитробактер и Klebsiella высевались в единичных случаях. *S. aureus* чаще выделялся со слизистых носоглотки по сравнению с *S. epidermidis*. Золотистый стафилококк преимущественно поражал слизистые носа (50,0 %) по сравнению с зевом (13,3 %). Эпидермальный стафилококк с гемолитической активностью выделялся со слизистых зева у такого же числа лиц, что и золотистый стафилококк ($10,0 \pm 5,5$ % и $13,3 \pm 6,2$ % соответственно). Кроме того, важно, что среди обследованных детей дошкольного возраста в п. Тыреть был установлен высокий процент носительства патогенных грибов рода *Candida* ($33,3 \pm 8,6$), которые, как правило, выделялись в виде ассоциаций и преимущественно с эпидермальным стафилококком (в 90 %). Следует подчеркнуть, что подобные ассоциации проявляют большую патогенность по отношению к организму, чем те же микроорганизмы, заселяющие биотопы по отдельности.

В Иркутске среди детей с дисбиотическими нарушениями большой удельный вес составляли те, у

кого зарегистрирован дефицит «дружественной» микрофлоры (бифидобактерий и лактобактерий — $50,8 \pm 1,9$ %) и наличие условно-патогенной микрофлоры (УПМ) в диагностически значимых количествах. Так, нами было установлено, что при нормальном количественном (физиологичном) содержании в кишечнике бифидофлоры ($\lg \text{КОЕ/мл} > 9$) *S. aureus* регистрировался в 38 % случаев, а при дефиците бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/мл} < 9$) наличие *S. aureus* в диагностически значимых количествах возрастало до 62 %. В то же время в отечественной и зарубежной литературе все чаще признается возможность развития инфекционного процесса, спровоцированного оппортунистическими микроорганизмами, при их концентрации $10^2 - 10^3$ КОЕ/г. Это связывают со снижением общей резистентности организма человека в условиях неблагоприятной экологической обстановки.

Характеристика видового разнообразия бифидобактерий, их качественное и количественное соотношение в кишечнике человека являются важным индикатором влияния внешних дестабилизаторов. Из всех циркулирующих видов бифидобактерий у индивида преобладает, как правило, один вид, и для адекватной коррекции дисбиозов необходимо точно знать, какой. Поэтому, видовая идентификация бифидобактерий с определением видового районирования штаммов имеет особое значение. Молекулярно-генетический подход значительно ускоряет процесс идентификации, позволяет получить более точные результаты по сравнению с биохимическим тестированием. Следует отметить, что в пробах из г. Ангарска (в 57,14 % случаев) и г. Иркутска (в 35,1 % случаев) бифидобактерии персистировали в двух видовых композициях. Основу всех установленных композиций составлял доминирующий вид *B. longum*. Другие виды бифи-

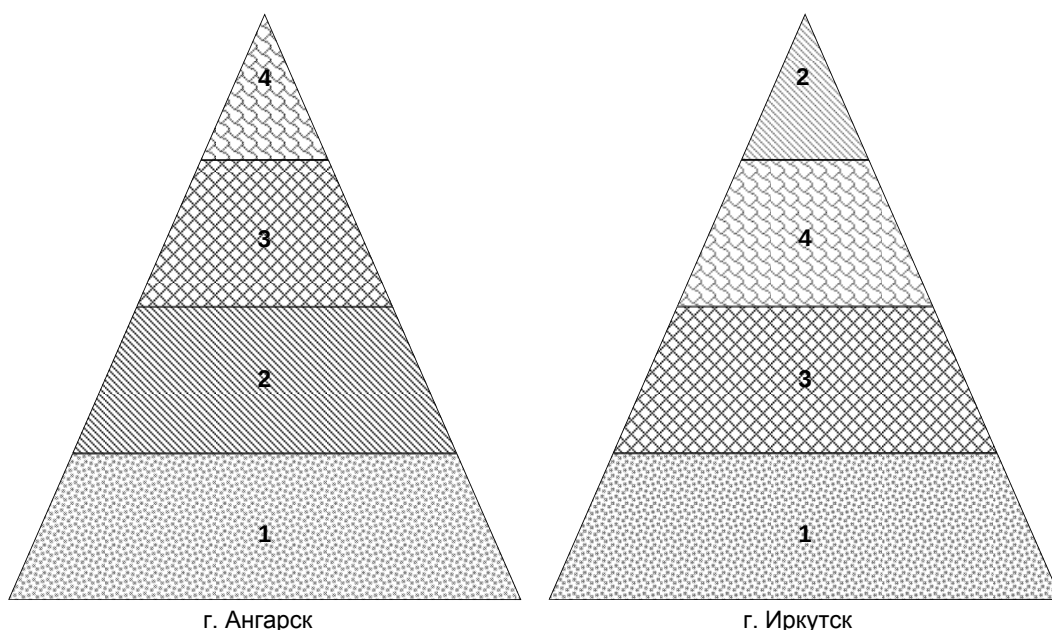


Рис. 2. Видовая архитектура бифидобактерий в кишечном биоценозе жителей городов Иркутской области. 1 – *Bifidobacterium longum*, 2 – *Bifidobacterium bifidum*, 3 – *Bifidobacterium catenulatum*, 4 – *Bifidobacterium adolescentis*.

добактерий представлены у жителей изучаемых городов следующим образом: в г. Ангарске вторым по численности видом был *B. bifidum*, а в Иркутске — *B. catenulatum*. В г. Иркутске наименьшее число встречаемости составили штаммы *B. bifidum*, а в г. Ангарске *B. adolescentis* соответственно (рис. 2). Факт индикации *B. adolescentis* среди «здоровых» детей обоих городов может свидетельствовать о микрoэкологических сдвигах в кишечном биотопе в сторону развития дисбиоза. Используемый подход МГНК, адаптированный к особенностям культивирования бифидобактерий, является достаточно информативным для изучения видового состава бифидобактерий в кишечнике, как при нормальном соотношении микроорганизмов в биотопе, так и при различных дисбиотических состояниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований показано, что наряду с существованием микрoэкологических особенностей кишечной микробиоты у детей в зависимости от места проживания, существуют и общие закономерности формирования микробиоценозов кишечника детей на территории Иркутской области. Прежде всего, региональные ориентиры основных групп резидентных микроорганизмов в кишечной микробиоте детей Иркутской области характеризуются снижением их титров относительно общезиологических показателей и данных по другим крупным промышленным городам России, а также сдвигом диапазона количественных показателей плотности популяций бифидобактерий в среднем до 5–7 lg КОЕ/г, лактобацилл — до 5 lg КОЕ/г, нормальных эшерихий — до 5–6 lg КОЕ/г.

Полученные данные свидетельствуют о том, что микрoэкологическая структура кишечных биоценозов здоровых детей Иркутской области характеризуется высокой частотой диссоциации нормальных эшерихий: появление кишечной палочки с измененной ферментативной активностью и обнаружение гемолитических форм.

Видовая архитектура бифидобактерий у жителей г.г. Иркутска и Ангарска имеет оригинальную структуру, характеризующуюся различным соотношением видов *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum* в каждом городе, но

с общим региональным признаком — доминирующим преобладанием *B. longum*. Показано разнообразие и степень представительства разных видов бифидобактерий в кишечном биоценозе, а выявляемость *B. adolescentis* среди «здоровых» детей обоих городов может свидетельствовать о микрoэкологических сдвигах в кишечном биотопе детей в сторону дисбиоза. В ходе проведенного исследования у детей, проживающих в разных городах, определен микрoэкологический фенотип с выявлением «индикаторных» видов условно — патогенных микроорганизмов. Дана характеристика видовой архитектуры бифидобактерий в кишечном биоценозе у лиц, проживающих в различных экологических условиях, что в практическом плане позволит подобрать оптимальные схемы коррекции микрoэкологического дисбаланса с учетом индивидуальных особенностей кишечного микробиоценоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барановский А.Ю., Кондрашина З.А. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника. — СПб: Питер, 2000. — 224 с.
2. Куваева И.Б., Ладодо К.С. Микрoэкологические и иммунные нарушения у детей. — М., 1991. — 240 с.
3. Леванова Л.А. Микрoэкология кишечника жителей Западной Сибири, коррекция дисбиотических состояний : автореф. дис. ... докт. мед. наук. — М., 2003. — 48 с.
4. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона и Дж. Макти — Издательство «Мир», 1999. — 527 с.
5. Особенности микрoэкологических цено-типов у детей, проживающих в условиях техно-генного прессинга / Е.Б. Ракова [и др.] // Гиг. и санит. — 2011. — № 4. — С. 22–26.
6. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» // ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003.
7. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника / Информационное письмо. — СПб., 2002. — 20 с.
8. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Функциональное питание и пробиотики: микрoэкологические аспекты. — М., 1997. — 180 с.

Сведения об авторах

Попкова София Марковна — д.б.н., с.н.с., зав. лабораторией микрoэкологии Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. 8(3952)33-34-41; факс 8(3952)-24-03-052 smpopkova@gmail.com)
Ракова Елена Борисовна — н.с. лаборатории микрoэкологии Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. 8(3952)33-34-41; факс 8(3952)-24-03-052)
Кичигина Елена Леонидовна — к.б.н., с.н.с., доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии ИГМАПО (664079, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100; тел./факс 8(3952)46-28-01)
Немченко Ульяна Михайловна — м.н.с. лаборатории микрoэкологии Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. 8(3952)33-34-41; факс -8(3952)-24-03-052)
Джигоев Юрий Павлович — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН (664025, г. Иркутск, тел. 8(3952)33-34-41)

Т.Д. Примаков, Е.А. Шевчук, С.Л. Мельникова

**ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННОГО
СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ АЭРОИОНОВ**

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия (Чита)

С целью изучения изменений биологических свойств стафилококков под влиянием чистого потока отрицательных аэроионов и лактобактерий была исследована чувствительность условно-патогенных стафилококков к антибактериальным средствам классическим диско-диффузионным методом и определением МПК с применением бактериологического анализатора. Воздействие чистого потока отрицательных аэроионов на культуру стафилококков выполнено изолированно и в смеси с лактобациллярными бактериями. Поток отрицательных аэроионов подавляет рост стафилококков, снижает показатели антибиотикочувствительности стафилококков *in vitro* изолированно и в присутствии лактобациллярных бактерий. Сочетанное применение пробиотических средств и аэроионов может быть оценено как новый подход в изменении антибиотикочувствительности микроорганизмов.

Ключевые слова: стафилококки, антибиотикочувствительность, аэроионы

**VARIANCE OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF OPPORTUNISTIC STAPHYLOCOCCUS
UNDER NEGATIVE AERO IONS INFLUENCE**

T.D. Primakov, E.A. Shevchuk, S.L. Melnikova

Chita State Medical Academy, Chita

The aim of this research was to study some changes of staphylococcus biological properties under negative aero ions influence and lactobacillus. We applied a disco-diffuse method for detection of bacterial sensitivity to antimicrobials and evaluated of the minimal inhibitory concentration by bacteriologic analyzer. Then we studied impact of negative aeroions flow on both isolated staphylococcus culture and mixed with lactobacilli. Aeroions flow inhibits staphylococcal growth, decrease its sensitivity to antibiotics *in vitro* both in isolated culture, and mixed with lactobacilli. Combined application of probiotics and negative aeroions could be a new approach for changes of antimicrobial sensitivity.

Key words: Staphylococci, antimicrobial sensitivity, aeroions

В условиях экологического и социального неблагополучия, изменившейся иммунологической резистентности организма человека, нерационального использования значительного арсенала антибактериальных препаратов и антисептических средств наблюдается изменение этиологической структуры возбудителей современных гнойно-септических инфекций (ГСИ) [7]. В этиологической структуре госпитальной инфекции новорожденных грамположительная флора составляет от 17 до 40 % и представлена стафилококками и стрептококками, преобладают коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) — *S. epidermidis*, *S. warneri* [6, 10]. Профилактика ГСИ включает комплекс дезинфекционных мероприятий, направленных на уничтожение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на объектах в окружении пациента, при этом недостаточно учитывается специфика, закономерности бактериальной контаминации и перманентного реинфицирования различных биотопов организма человека, включая новорожденных [8].

В свою очередь, представители нормальной микрофлоры составляют систему биологической защиты организма. Условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) и, главным образом, облигатная микрофлора в составе различных биотопов в форме нормобиоценоза являются основополагающими

компонентами саморегуляции, иммунологических реакций и неспецифической защиты организма [3].

В большинстве лечебных учреждений общее количество микроорганизмов в 1 м³ воздуха превышает существующие нормы. Воздух оздоравливается атмосферным электричеством, точнее его носителями — аэроионами [1, 5, 9, 11]. Метод аэроионификации может быть применен в операционных, перевязочных, палатах (инфекционных, родильных и др.), боксах микробиологических лабораторий [2, 4, 12].

Целью данного исследования явились оценка антибиотикочувствительности госпитальных условно-патогенных стафилококков и ее изменение под влиянием отрицательно заряженных аэроионов в присутствии лактобактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнялась в период с 2006 по 2010 гг. на базе лаборатории клинической микробиологии перинатального центра ГУЗ «Краевая клиническая больница» Забайкальского края (г. Чита). В условиях стационара проведено бактериологическое обследование 120 новорожденных (из них 70 находились в ОРИТ, 50 — в детском отделении — контрольная группа) и 124 женщин, в т.ч. 60 беременных и 64 родильницы. Посев биологического материала от пациентов проводили классическим

бактериологическим методом. Выделенные штаммы тестировали на чувствительность к антибиотикам на основании МУ 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS, США). Дополнительно идентификацию микроорганизмов и определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) проводили с применением автоматического микробиологического анализатора VITEC 2 Compact 30 (bio Merieux Inc., США). Использовали показатель МПК₉₀ — МПК антибиотика эффективного для 90 % исследуемых штаммов в единицах мг/л. 17 штаммов *S. warneri*, выделенных от новорожденных и женщин и обладающих антибиотикорезистентными свойствами, выращивали на питательной среде, приготовленной с добавлением бактерий рода *Lactobacillus*, а также эти культуры подвергали воздействию чистого потока отрицательно заряженных аэроионов.

Опыт 1: КОС + лактобактерии. В 100 мл свежеприготовленной среды Мюллера-Хинтона для определения антибиотикорезистентности добавляли 12 мл биологически активной добавки «Наринэ» (БАД ТУ-9224-004-45448778-02), содержащей живые ацидофильные бактерии *Lactobacillus acidophilus* штамма N.V.Ер. 317/402, и разливали в чашки Петри. Готовили взвеси суточных культур *S. warneri* в физиологическом растворе по стандарту мутности 5×10^8 . На питательную среду засеивали взвесь, затем на одну партию чашек накладывали диски с антибиотиками. Инкубировали при 37 °C 24 часа. Контролем служили две партии чашек: первая со средой Мюллера-Хинтона без добавок с нанесенной взвесью культуры *S. warneri* и дисками с антибиотиками, вторая — с этой же средой без добавок с нанесенной взвесью культуры *S. warneri*. Использовали следующий набор антибиотиков: оксациллин, амикацин, ванкомицин, цефтазидим, эритромицин и меропенем, как наиболее часто применяемый в условиях ОРИТ новорожденных.

Опыт 2: КОС + аэроионы. Готовили взвеси культур аналогично опыту № 1. Взвеси в количестве 1 мл засеивали на питательный агар. Одну часть взвеси засеивали по методу Голда (микробиологической петлей диаметром 2 мм на четыре сектора, после каждого сектора петлю прожигали) и помещали под поток отрицательно заряженных аэроионов (ОАИ) прибора «Сферион» (ООО «Сьютиби», г. Новосибирск), который производит не менее 5×10^3 отрицательных ионов в 1 см³ воздуха. Время воздействия составило 60, 90 и 120 минут. Затем чашки инкубировали при 37 °C 24 часа, после чего определяли антибиотикорезистентность культур. Контролем служили чашки с посевом штаммов *S. warneri* без воздействия аэроионов. Другую часть взвеси разливали в стерильные чашки Петри по 1,0 мл и растирали шпателем, затем также помещали под поток отрицательно заряженных аэроионов на то же время. Контрольная чашка со взвесью воздей-

ствием аэроионов не подвергалась и выдерживалась с такой же экспозицией и температурой.

Опыт 3: КОС + лактобактерии + аэроионы. Готовили питательную среду и взвеси аналогично опыту № 1. Одну партию чашек с культурой и дисками и вторую партию с культурой без дисков помещали под чистый поток ОАИ. Время воздействия составило 90, 120 и 180 минут. Контролем служили чашки со средой Мюллера — Хинтона без добавок с нанесенной взвесью культур *S. warneri* и дисками с антибиотиками, вторая — без добавок с нанесенной взвесью культуры *S. warneri*, не подвергавшихся воздействию аэроионов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы «Statistica-5» и «Exel». Использовались следующие методы статистического анализа: проверка нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, основанная на регрессии порядковых статистик. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали t-критерий Стьюдента, двусторонние доверительные интервалы; при ненормальном распределении количественных признаков использовали непараметрический критерий W-Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено сравнение антибиотикограмм микроорганизмов, выделенных от новорожденных и от женщин. В структуре КОС, выделенных из различных биотопов, чаще резистентностью отличались штаммы родильниц (73,4 %). В микробиоценозах биотопов новорожденных и женщин преобладали грамположительные кокки — *S. warneri* и *E. faecalis*. Во всех группах высевались штаммы *S. warneri*, обладавшие полирезистентностью, 17 из которых были применены в серии экспериментов.

Опыт 1. Зоны подавления роста с использованием ДДМ к ванкомицину увеличились с $18,3 \pm 2,6$ мм на контрольных чашках до $19,0 \pm 1,6$ мм на чашках с добавкой. К меропенему чувствительность выросла с $14,5 \pm 7,5$ мм до $20,8 \pm 3,6$ мм ($p < 0,05$), к амикацину — с $21,9 \pm 8,7$ мм до $27,6 \pm 4,4$ мм ($p < 0,01$). Зоны подавления роста для оксациллина, эритромицина и цефтазидима остались без особых изменений. Обнаружены изменения МПК₉₀ ванкомицина с 2 мг/л до 1 мг/л, меропенема с 16 до 8 мг/л, амикацина с 2 до 0,5 мг/л. МПК оксациллина, эритромицина и цефтазидима составили 8, 16 и 16 мг/л соответственно и в этой серии экспериментов не изменялись.

Опыт 2. В результате данного эксперимента через 60 и 90 минут воздействия аэроионами на засеянные культуры *S. warneri* изменений антибиотикорезистентности не выявлено. Микробное число на экспериментальных и на контрольных чашках при этих экспозициях было одинаково и составляло 9 lg (10⁹) КОЕ. Через 120 минут воздействия аэроионами микробное число снизилось до 6 lg (10⁶) КОЕ в 89 % случаев. В течение эксперимента

чувствительность к одним и тем же препаратам не отличалась в контроле и в результате воздействия потоком аэроионов.

Опыт 3. Добавление в среду Мюллера-Хинтона взвеси лактобактерий с воздействием потока ОАИ в течение 90 и 120 минут вызывало незначительное снижение антибиотикорезистентности *S. warneri*. Однако наиболее существенные изменения антибиотикочувствительности штаммов *S. warneri* были получены при обработке потоком аэроионов в течение 180 мин. При данных условиях штаммы изменяли свою чувствительность к ряду антибиотиков: зона подавления роста вокруг диска с ванкомицином увеличилась с $18,3 \pm 2,6$ мм до $22,7 \pm 3,0$ мм ($p < 0,01$), к меропенему с $14,5 \pm 7,5$ мм до $27,0 \pm 3,3$ мм ($p < 0,01$), к амикацину с $21,9 \pm 8,7$ до $27,1 \pm 6,4$ мм ($p < 0,01$), к оксацилину с $16,5 \pm 2,5$ до $19,5 \pm 5,1$ мм ($p < 0,05$). Обнаружены изменения МПК₉₀ ванкомицина с 2 мг/л до 0,5 мг/л; меропенема с 16 до 4 мг/л; амикацина — с 2 до 0,5 мг/л; оксацилина — с 8 до 4 мг/л; МПК₉₀ эритромицина и цефтазида осталась без изменений. Вероятно, свойство антибиотикорезистентности, связанное большей частью с внехромосомными генами бактерий, снижается вследствие возникновения изменений в структурных единицах бактериальных плазмид или кодируемых ими ферментативных групп. Поэтому увеличение зон подавления роста выделенных штаммов *S. warneri* антибактериальными средствами под влиянием потока аэроионов отрицательной полярности при участии лактобактерий, возможно, происходит по механизму квантовой реакции на фоне воздействия продуктов жизнедеятельности молочнокислых бактерий, обладающих природным антагонизмом в отношении стафилококков.

ВЫВОДЫ

1. В различных биотопах новорожденных, беременных, родильниц преобладают грамположительные кокки — *S. warneri*, *E. faecalis*, устойчивые к большинству применяемых в ОРИТ антибактериальных средств, наибольшее количество которых выделено из биотопов родильниц (73,4 %).

2. Антибиотикорезистентность штаммов *S. warneri* в присутствии лактобактерий *Lactobacillus acidophilus* N.V.Ep. 317/402 к ряду антибиотиков (ванкомицин, меропенем, амикацин) снижается в среднем в два раза, чувствительность *S. warneri* к оксацилину, эритромицину, цефотаксиму остается без изменений.

3. Воздействие потока отрицательных аэроионов при экспозиции 120 минут приводит к снижению плотности популяции *S. warneri* с $8 \lg$ (5×10^8) КОЕ до $6 \lg$ (5×10^6) в 89 % проб. Антибиотикорезистентность штаммов *S. warneri* при обработке потоком аэроионов с течение 180 минут в смеси с лактобактериями *Lactobacillus acidophilus* N.V.Ep. 317/402 снижается в среднем в четыре раза в 92,2 % проб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Air ions: physiological aspects / H. Nakane [et al.] // Int. J. Psychophysiol. — 2002. — Vol. 46. — P. 85.
2. Bactericidal action of positive and negative ions in air / L.A. Fletcher [et al.] // BMC Microbiology. — 2007. — Vol. 7, N1. — P. 32.
3. Community-acquired methicillin-resistance *S. aureus* / M.H. Kaibni [et al.] // J. Med. Microbiol. — 2009. — Vol. 58. — P. 644–647.
4. Dudley C.A., Moss R.L. Stress and physiological, behavioral and performance pattern under varied air ion levels // Neuroscience. — 1999. — Vol. 91. — P. 1549–1556.
5. Ryushi T. The effect of exposure to negative air ions on the recovery of physiological responses after moderate endurance exercise // Int. J. Biometeorol. — 1998. — Vol. 41. — P. 1332–1336.
6. Внутрибольничные инфекции в родовспомогательных учреждениях: этиология, эпидемиология и профилактика / С.Д. Егоричева [и др.] // Эфферентная терапия. — 2005. — № 1. — С. 63–69.
7. Володин Н.Н., Касихина С.А. Актуальность проблемы нозокомиальных инфекций в неонатологии // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. — 2004. — Т. 3, № 1. — С. 74–79.
8. Донских Е.Е. Молекулярный и микробиологический мониторинг становления микрофлоры кишечника новорожденных: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е.Е. Донских; РГМУ. — М., 2010. — 29 с.
9. Норман Г.Э. Активные формы кислорода и люстра Чижевского // Биохимия. — 2001. — Т. 66, № 1. — С. 123–126.
10. Основные компоненты контроля в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных / А.В. Любимова [и др.] // Эфферентная терапия. — 2010. — Т. 16, № 3. — С. 91–97.
11. Санитарно-гигиенические нормы допустимых уровней ионизации производственных и общественных помещений / СанПин 2.2.4.1294-03. — М., 2004. — 10 с.
12. Скипетров В.П. Аэроионы и жизнь. — Саранск: Красный Октябрь, 2005. — 136 с.

Сведения об авторах

Примак Татьяна Дмитриевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии ГБОУ ВПО ЧГМА (Чита-90, ул. Горького, 39 а; тел. (302) 235-28-60)

Шевчук Евгения Александровна — зав. лабораторией клинической микробиологии ГУЗ ККБ (Чита-38, ул. Гаюсана, 2/54; тел. (302) 231-42-78)

Мельникова Светлана Леонидовна — д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной анатомии ГБОУ ВПО ЧГМА (Чита-90, ул. Горького, 39 а; тел. (302) 235-43-24).

Н.М. Пронин ¹, С.В. Пронина ², Г.С. Амагзаева ³, А.А. Бужгеева ³, Т.Б. Базарова ³,
А.В. Молчанов ⁴

**ДИНАМИКА ЗАРАЖЕННОСТИ СЕЛЕНГИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОМУЛЯ
COREGONUS MIGRATORIUS (COREGONIDAE) ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ
DIPHYLLOBOOTHRIUM DENDRITICUM И ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ДИФИЛЛОБОТРИОЗОМ
НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ**

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)

² Бурятский государственный университет (Улан-Удэ)

³ Управление Роспотребнадзора Республики Бурятия (Улан-Удэ)

⁴ Управление ветеринарии Республики Бурятия (Улан-Удэ)

Приведены данные по многолетней динамике зараженности байкальского омуля плероцеркоидами *Diphyllbothrium dendriticum* в период нерестовой миграции в р. Селенгу, с пиками инвазии в 2005 и 2011 годах. Материалы по динамике заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия за 2000–2011 годы показали наличие тренда увеличения частоты гельминтоза с пятилетней периодичностью.

Ключевые слова: омуль, плероцеркоид, лентец чаечный, дифиллоботриоз

**DYNAMICS OF COREGONUS MIGRATORIUS (COREGONIDAE) SELENGA POPULATION
CONTAMINATION WITH DIPHYLLOBOOTHRIUM DENDRITICUM
AND DIPHYLLOBOOTHRIOSIS MORBIDITY IN BURYATIA REPUBLIC**

N.M. Pronin ¹, S.V. Pronina ², G.S. Amagzayeva ³, A.A. Buzgheyeva ³, T.B. Bazarova ³,
A.D. Molchanov ⁴

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

² Buryat State University, Ulan-Ude

³ Department of Sanitary Medicine of Buryat Republic, Ulan-Ude

⁴ Department of Veterinarian Medicine of Buryat Republic, Ulan-Ude

The paper is devoted to the long-term dynamics of Baikalian omul contamination with plerocercoids of *Diphyllbothrium dendriticum* during the spawning migration into the Selenga River. Contamination peaks were in 2005 and 2011. Dynamic of diphyllbothriosis morbidity in Buryatia Republic in 2000–2011 have shown increasing trend of helminthosis with 5-year cycle.

Key words: omul, plerocercoid, *Diphyllbothrium dendriticum*, diphyllbothriosis

Из трех видов лентецов (*Diphyllbothrium latum*, *D. dendriticum*, *D. ditremum*) зарегистрированных в Восточной Сибири эпидемиологическое (медицинское) значение имеют лентец широкий *D. latum* и лентец чаечный *D. dendriticum* [4, 5, 7]. На основании комплексных исследований взаимоотношений в системе «плероцеркоид *D. dendriticum* — рыбы» было предложено рассматривать дифиллоботриоз лососевидных рыб в качестве самостоятельного гельминтозного заболевания [6]. Поскольку байкальский омуль является доминантным вторым промежуточным хозяином *D. dendriticum* [5, 7], то уровень его зараженности может играть существенную роль в эпидемиологии дифиллоботриоза населения Прибайкалья, поэтому в данном сообщении представлены материалы по многолетней динамике зараженности селенгинской популяции байкальского омуля *Coregonus migratorius* — самого многочисленного стада и динамики заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия с акцентом на прилегающие районы Прибайкалья и Селенгинской Даурии (Кабанский, Селенгинский, Прибайкальский и Северобайкальский районы).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Данные по динамике зараженности байкальского омуля плероцеркоидом *D. dendriticum* приводятся по результатам полных паразитологических и специальных гельминтологических вскрытий сотрудниками лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН из уловов «ВостсибНИИпроекта», «Востсибрыбцентра», Байкальского филиала «Госрыбцентра» на контрольных тонях: Мурзино (25 км от устья р. Селенги), перенесенного в 1999 г. в Колесово (30 км), Кабанск (45 км), Татаурово (101 км), Улан-Удэ (155 км) для определения членности омуля заходящего в реку на нерест. Авторы благодарят сотрудников этих учреждений, особенно А.В. Базова и В.А. Петерфельда (БО «Госрыбцентра»), за предоставление проб для исследования и сотрудников лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН, особенно О.Б. Жепхолову, за участие в паразитологических вскрытиях рыб в последние годы. При паразитологическом вскрытии регистрировались биологические показатели рыб (размер, масса, пол, возраст). Уровень зараженности омуля приводится по показателям экстенсивности

инвазии — Э.И. (% зараженных особей в пробе), интенсивности инвазии — И.И. (среднее число паразитов в одной зараженной рыбе) и индексу обилия И.О. — число паразитов на одну исследованную рыбу в пробе.

Динамика заболеваемости населения дифиллоботриозом приведена по расчетному показателю случаев заболевания на 100 тысяч населения по данным Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зараженность омуля. Экстенсивность заражения омуля плероцеркоидами *D. dendriticum* в реке Селенга в последние годы колебалась от 62,3 до 100 % (табл. 1). Дополнительно приведены опубликованные авторские данные [3] по индексу обилия паразита за 1972–1976 гг. (табл. 2).

По этим данным можно проследить изменения относительной численности гостальной гемипопуляции плероцеркоидов у селенгинского омуля по индексу обилия за более длительный период. За это время индекс обилия паразита изменялся от 4,84 экз. (1976 г.) до 9,79 экз. (2005 г.) (табл. 1, 2). Однако здесь необходимо учитывать различия по пунктам и датам исследования в разные годы. Во-первых, в нерестовом стаде омуля, заходящего на нерест в р. Селенгу, различают две субпопуляционные группировки по срокам нерестовой

миграции — сентябрьская и октябрьская, которые отличаются по протяженности миграции: сентябрьская доходит по реке Селенга до Монголии и далее, а октябрьская — нерестится ниже г. Улан-Удэ. По данным наблюдений на станции Колесово в 2009 г. зараженность омуля октябрьской популяции была значительно выше по экстенсивности инвазии и более чем в 2 раза по индексу обилия (4,06 и 9,2 экз.) по сравнению с сентябрьской. Кроме того, сравнительными исследованиями уровня зараженности омуля, заходящего на нерест в сравнении с «покатным» после нереста, установлено значительное снижение индекса обилия лентеца у последнего [3].

Предварительный анализ возможной зависимости зараженности селенгинского омуля от численности его нерестового стада в реке по данным «ВостсибНИИпроекта», «Востсибрыбцентра» и Байкальского филиала «Госрыбцентра» не выявил определенной зависимости. В целом, индекс обилия паразита начиная с 1930 г. чаще всего колеблется в пределах от 5,6 до 7,0 экз. в пределах недостоверных различий.

Среди факторов, определяющих численность паразита, численность хозяев может играть важную роль для моноксенных видов (с прямым циклом развития). Для поликсенных гельминтов, в том числе *D. dendriticum*, при анализе влияния этого фактора необходимы данные по численности всех промежуточных, дополнительных и дефинитивных

Таблица 1
Многолетняя динамика зараженности плероцеркоидами *D. dendriticum* нерестового стада омуля р. Селенги

Дата и место	п, экз.	Зараженность			Характеристики пробы рыбы	
		Э.И., %	И.И., экз. средняя лимиты	И.О., экз.	длина тела, см., средняя лимиты	масса тела, г средняя лимиты
10.09.73 Мурзино	15	86,6	$7,84 \pm 1,63$ 1–18	$6,80 \pm 1,57$	$31,9 \pm 2,59$ 30,0–33,5	$354 \pm 10,19$ 283–442
19.10.78 Улан-Удэ	25	68,0	$11,23 \pm 2,15$ 1–36	$7,64 \pm 1,80$	$31,4 \pm 2,02$ 29,0–33,5	$275,6 \pm 5,36$ 231–350
26.09.97 Кабанск	25	92,0	$7,09 \pm 1,34$ 1–26	$6,52 \pm 1,29$	$31,3 \pm 2,49$ 29,3–34,2	$354,2 \pm 7,11$ 305–445
13.10.99 Кабанск	24	75,0	$7,05 \pm 1,55$ 1–23	$5,29 \pm 1,32$	$30,1 \pm 3,68$ 25,5–32,5	$321,8 \pm 10,40$ 225–410
13–14.10.03 Татаурово	22	95,4	$5,95 \pm 1,03$ 1–20	$5,68 \pm 1,02$	$32,1 \pm 3,33$ 29,0–34,3	$346,9 \pm 13,22$ 249–462
20.09.04 Улан-Удэ	25	72,0	$5,83 \pm 1,36$ 2–25	$4,20 \pm 1,11$	$33,2 \pm 1,98$ 31,0–35,5	$339 \pm 6,84$ 280–400
20.10.05 Татаурово	25	96,0	$9,40 \pm 1,95$ 1–35	$9,79 \pm 1,99$	$33,9 \pm 3,27$ 30,2–36,3	$33,5 \pm 10,14$ 225–460
12.10.07 Колесово	25	100	$7,84 \pm 1,14$ 2–27	$7,84 \pm 1,14$	$31,8 \pm 5,40$ 21,4–35,1	$388,4 \pm 13,64$ 285–530
30.09.08 Колесово	19	63,2	$12,92 \pm 3,01$ 1–33	$8,16 \pm 2,38$	$31,6 \pm 4,20$ 28,0–34,1	$319,4 \pm 21,6$ 224–387
27–29.09. Колесово	53	62,3	$6,51 \pm 1,03$ 1–22	$4,06 \pm 0,78$	$333,3 \pm 1,75$ 302–357	$408,4 \pm 7,89$ 310–571
10.10.11 Колесово	20	95	$9,68 \pm 1,68$ 1–24	$9,2 \pm 1,66$	$330,6 \pm 2,20$ 308–348	$383,8 \pm 11,35$ 302–501

Таблица 2
Изменение индекса обилия плероцеркоида *D. dendriticum* у омуля р. Селенги (1972–1976: по Пронин, 1981)

Год	1930	1972	1974	1975	1976
И.О., экз.	5,61	$6,33 \pm 0,58$	$5,79 \pm 0,46$	$5,42 \pm 0,48$	$4,84 \pm 0,50$
Кол-во исслед-х рыб, экз.	73	90	96	50	65

хозяев и, естественно, по численности паразита на всех фазах развития.

Заболеемость населения. Динамика заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия за последние 12 лет (2000 – 2011 гг.) показывает наличие определенной периодичности повышения относительной численности заболевания (рис. 1). Наблюдается рост числа заболеваемости от минимума в 2001 г. до максимума в 2005 г. Тренд снижения заболеваний наблюдался на протяжении последних 2006 – 2010 гг., а затем вновь значительный рост в 2011 г. При этом пик заболеваемости населения в 2005 г. совпадает с максимальным индексом обилия плероцеркоидов *D. dendriticum* у омуля в этом году.

Ранее менее значительные колебания заболеваемости дифиллоботриозом наблюдались в 1990 – 1997 гг. с минимумом в 1991 г. (21,7 на 100 тыс.) и максимумом в 1998 г. (37,4 на 100 тыс.) [1]. Следует отметить, что пики заболеваемости в 2005 – 2006 гг. и 2011 г. более чем в 2 раза превышают минимум в 1991 г. Пик заболеваемости населения дифиллоботриозом по республике Бурятия (2005 – 2006 гг.) следует за пиками заболеваемости населения в Селенгинском (2005 г.), Кабанском (2006 г.) и Прибайкальском (2005 г.) районах (рис. 1). Это вполне закономерно, поскольку Селенгинский и Кабанский районы вме-

сте в разные годы (2000 – 2011 гг.) дают от 36,1 до 54,4 % (в среднем 44,75 %) случаев заболеваемости населения Республики Бурятия в целом (табл. 3).

Поскольку в этих районах расположены рыбные промыслы на оз. Байкал, р. Селенге и оз. Гусином и в этих же районах больше всего потребляется необеззараженной свежей рыбы, добытой легально и нелегально, особенно омуля в период нерестовой миграции. В связи с этим, дифиллоботриоз регистрируется, главным образом, среди жителей прибрежных населенных пунктов [1].

Для корректного анализа зависимости заболевания населения дифиллоботриозом, вызываемого *D. dendriticum*, от уровня зараженности плероцеркоидами сиговых рыб необходима дифференциальная диагностика видовой принадлежности возбудителей гельминтоза (*D. latum* или *D. dendriticum*), которые не различаются по форме и размерам яиц при копрооваскопии, но хорошо отличаются по морфологии стробил [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кабанский и Селенгинский районы Бурятии дают около половины случаев заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия. Полученные данные по многолетней динамике зараженности самой многочисленной популяции

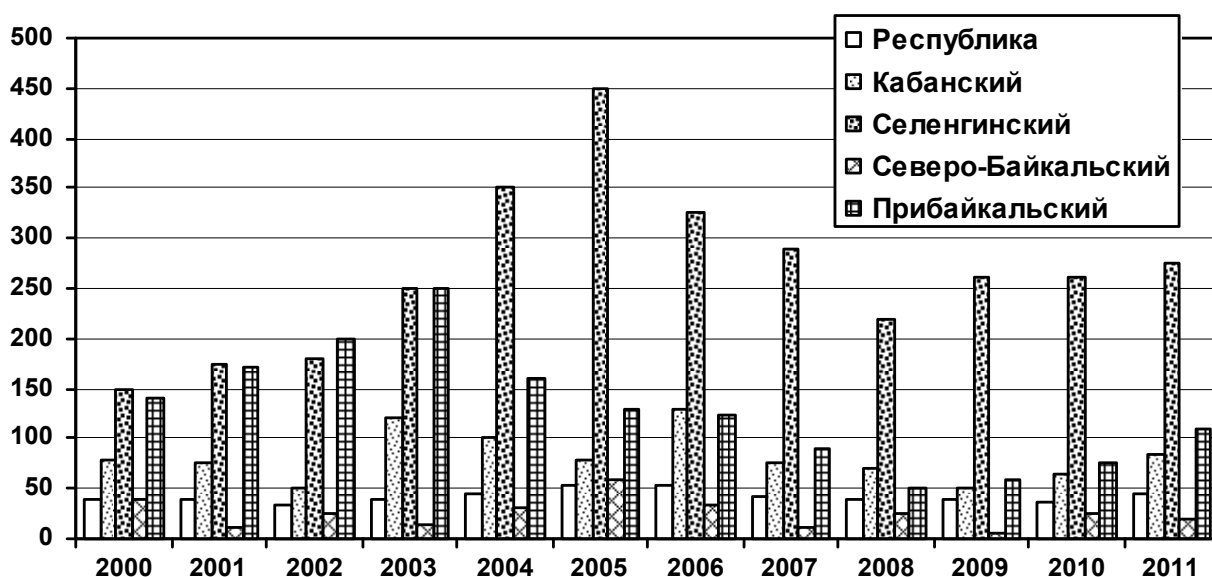


Рис. 1. Динамика заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия и в ее районах в бассейне р. Селенги (Кабанский, Селенгинский) и Прибайкалья (Прибайкальский и Северобайкальский).

Таблица 3
Удельное значение Кабанского и Селенгинского районов в заболеваемости дифиллоботриозом населения Республики Бурятия, в % от общего числа зарегистрированных заболевших в Республике

Районы	Годы												За 12 мес.
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	
Кабанский	15,0	13,4	9,5	18,1	14,7	11,1	18,0	13,1	11,8	9,2	12,8	13,9	13,4
Селенгинский	21,1	25,1	27,9	31,9	38,1	30,1	30,1	34,4	24,4	34,1	33,8	34,6	31,3
Два региона	36,1	38,5	37,4	49,0	52,8	54,4	48,1	47,5	36,2	43,3	46,6	47,5	44,7

селенгинского омуля и материалы по уровню заболеваемости населения дифиллоботриозом показали наличие годовых флуктуаций этих показателей. Установлено наличие устойчивого тренда увеличения напряженности эпизоотической ситуации в популяции омуля — промежуточного хозяина *D. dendriticum* и эпидемической ситуации по дифиллоботриозу среди населения Прибайкалья в начале XXI века.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апанова В.И., Болошинов А.Б., Номноева Л.К. Распространение и вопросы профилактики паразитарных болезней населения Республики Бурятия // Проблемы общей и региональной паразитологии. — Улан-Удэ: Изд-во Бурятской сельскохозяйственной академии, 2000. — С. 121 — 133.
2. Базов А.В., Базова Н.В. Численность и сроки захода нерестового стада байкальского омуля в реку Селенга // Рыбное хозяйство. — 2007. — № 1. — С. 90 — 91.
3. Пронин Н.М. Экологический анализ паразитофауны омуля // Экология, болезни и разведение байкальского омуля (Отв. ред. А.Г. Егоров). — Новосибирск: Наука, 1981. — С. 124 — 140.
4. Пронин Н.М. Паразиты рыб и других гидробионтов, опасные для человека // Проблемы общей и региональной паразитологии. — Улан-Удэ: Изд-во Бурятской сельскохозяйственной академии, 2000. — С. 134 — 141.
5. Пронин Н.М., Пронина С.В., Кутырев И.А. Структура Байкальского природного очага дифиллоботриоза и взаимоотношения *Diphyllbothrium dendriticum* с дефинитивными хозяевами // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология, Экология», 2009. — Т. 2, № 1. — С. 53 — 56.
6. Пронина С.В., Пронин Н.М. Взаимоотношения в системах гельминты-рыбы (на тканевом, органном и организменном уровнях) / Отв. ред. С.С. Шульман. — М.: Наука, 1988. — 176 с.
7. Пронина С.В., Пронин Н.М. Байкальский природный очаг дифиллоботриоза (структура, эпизоотология и эпидемиология). — Улан-Удэ: Изд-во Бурятского гос. университета, 2010. — 44 с.
8. Санжиева С.Д. Морфологическая характеристика цестод рода *Diphyllbothrium* Cobbold, 1858 от чайковых птиц оз. Байкал // Проблемы общей и региональной паразитологии. — Улан-Удэ: Изд-во Бурятской сельскохозяйственной академии, 2000. — С. 149 — 155.

Сведения об авторах

Пронин Николай Мартемьянович — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией паразитологии и экологии гидробионтов ИОЭБ СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел. (3012) 43-42-18; факс (3012) 43-30-34, proninnm@yandex.ru)
Пронина Светлана Васильевна — д.б.н., профессор БГУ
Амагзаева Галина Сергеевна — начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по РБ
Бужгеева Альбина Александровна — главный специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по РБ
Базарова Татьяна Барлуковна — ведущий специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по РБ;
Молчанов Александр Васильевич — главный специалист-эксперт Управления ветеринарии РБ.

Е.Б. Ракова, С.М. Попкова, У.М. Немченко, Н.М. Шабанова, Е.В. Бухарова

РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИФИДОБАКТЕРИЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ СИБИРИ

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

Были изучены антагонистические свойства бифидобактерий по отношению к оппортунистическим микроорганизмам *in vitro* и проанализирован механизм снижения их антагонистической активности. Зарегистрирован высокий удельный вес аутоштаммов региональной популяции бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к представителям транзитных оппортунистических микроорганизмов, что способствует снижению колонизационной резистентности и требует разработки методов профилактической корригирующей пробиотической терапии.

Ключевые слова: антагонистическая активность, бифидобактерии

REGIONAL FEATURES OF BIFIDOBACTERIA ANTAGONISTIC ACTIVITY IN INTESTINAL MICROBIOTA OF CHILDREN LIVING IN SIBERIA

E.B. Rakova, S.M. Popkova, U.M. Nemchenko, N.M. Shabanova, E.V. Bukharova

Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Antagonistic properties of bifidobacteria to opportunistic microorganisms *in vitro* and mechanism of antagonistic activity decreasing were studied and analyzed. Great percentage of bifidobacteria regional population strains with low antagonistic activity to transitional opportunistic microorganisms is registered. It results to colonization resistance decreasing and requires development of the preventive probiotics therapy methods to correct.

Key words: antagonistic activity, bifidobacteria

Ни один метаболический процесс, ни одна физиологическая функция в организме не протекает без прямого или опосредованного участия симбиотной микробиоты, и начальной точкой дисбиотических состояний кишечника является подавление индигенного анаэробного микробного компонента, прежде всего, бифидобактерий и лактобацилл, которые в норме оказывают сдерживающее влияние на размер популяций эндогенных условно-патогенных микроорганизмов, и в значительной степени ответственны за поддержание резистентности кишечника к колонизации экзогенными патогенными микроорганизмами, т.н. «колонизационной резистентности» (КР) [7]. Формирование и поддержание (КР) — одна из ключевых функций индигенных микроорганизмов ЖКТ. А основной характеристикой микроорганизмов в системе КР является антагонистическая активность. Механизм антагонистической активности основан на продукции бактериями ингибиторных факторов (короткоцепочечные жирные кислоты, бактериоцины, дефенсины и др.), нарушающих метаболизм патогенных и условно-патогенных бактерий, конкурентной борьбе за питательные субстраты, места адгезии, прямой деградации токсинов, антиэндотоксическом действии, препятствии транслокации и другие участки организма [11, 13]. Исследования антагонистической активности бифидобактерий и лактобацилл *in vivo* и *in vitro* позволяют проанализировать отдельные звенья формирования колонизационной резистентности [12], что особенно актуально для оценки функционального состояния интестинальной микробиоты.

Целью данного исследования явилось изучение антагонистической активности региональной популяции бифидобактерий.

МЕТОДИКА

В работе были использованы:

1. Микроорганизмы

• Эталонные штаммы бифидобактерий следующих видов: *Bifidobacterium bifidum* DSM 20239, *Bifidobacterium longum* DSM 20219^T, полученные из Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры человека ГКНМ ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, аутоштаммы бифидобактерий, выделенные из фекалий детей, проживающих в г.г. Иркутске и Ангарске — 192 штамма, музейный штамм *Escherichia coli* (ЭПК-028/57), эталонный штамм *Staphylococcus aureus* 209 и аутоштаммы *S. aureus*, изолированные из кишечника детей раннего возраста.

2. Образцы фекалий и отделяемое из носоглотки детей, проживающих в г.г. Ангарске, Шелехове, Иркутске в количестве 169 образцов. Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288).

Бактериологическое исследование качественного и количественного состава содержимого кишечника проводили по стандартной методике с использованием актуальных справочных материалов [3, 4, 10]. Идентификацию выделенных культур проводили по общепринятым схемам идентификации.

ции с применением коммерческих тест-систем для биохимической идентификации: СИБ, НИИЭМ, г. Н. Новгород; PLIVA Lachema, Чехия. Инкубация посевов на плотных средах для выделения лакто- и бифидобактерий осуществлялась в микроанэростате с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз». Плотность популяции микроорганизмов в образцах определялась в lg колониеобразующих единиц на грамм (lg КОЕ/г).

Антагонистическая активность аутоштаммов бифидобактерий определялась методом отсроченного антагонизма (метод штрихов) [1, 9].

Для определения и оценки антагонистической активности использовались аутоштаммы и эталонные штаммы бифидобактерий. В качестве антагонистической «мишени» использовались эталонные штаммы условно-патогенных микроорганизмов: *S. aureus* 209 и энтеропатогенная кишечная палочка (ЭПК-028/57), аутоштаммы *S. aureus*, выделенные от детей.

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ «MS Excel for Windows» и «Statgrafics». Вычислялись основные показатели параметрических методов вариационной статистики (средняя арифметическая, мода, медиана, дисперсия, критерий Стьюдента-Фишера, достоверность полученных результатов), а также непараметрические критерии оценки достоверности (критерий Вилкоксона) при критическом значении уровня значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование микробиоты толстого кишечника детей показало, что при дефиците аутохтонных анаэробов (бифидобактерий и лактобацилл), который был выявлен в $50,8 \pm 1,9$ % обследованных детей, условно-патогенные микроорганизмы выделялись в диагностически значимых количе-

ствах. Так, было установлено, что при нормальном количественном (физиологическом) содержании в кишечнике бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} > 9$) *S. aureus* регистрировался в 32 % случаев, при дефиците бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} < 9$) наличие *S. aureus* в диагностически значимых количествах регистрировалось в 68 % (рис. 1).

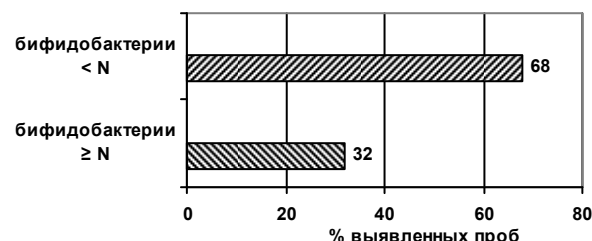


Рис. 1. Выявление *S. aureus* в зависимости от содержания бифидобактерий. Примечание: $\geq N$ – нормативное содержание бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} > 9$); $< N$ – дефицит бифидобактерий ($\lg \text{КОЕ/г} < 9$).

Следует подчеркнуть, что понятие «диагностически значимые количества» трактуется неоднозначно. Многие исследователи по-прежнему считают диагностически значимой концентрацией условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) величину $\lg \text{КОЕ/г} > 5$. В то же время в отечественной и зарубежной литературе все чаще признается возможность развития инфекционного процесса, спровоцированного оппортунистическими микроорганизмами, при их концентрации $10^2 - 10^3 \text{ КОЕ/г}$. Это связывают со снижением общей резистентности организма человека в условиях неблагоприятной экологической обстановки [8].

Полученные данные о взаимосвязи количественного содержания в кишечнике бифидобактерий с индикацией УПМ (*S. aureus*), хотя и подтверждали положение о нормализующем влиянии бифидобактерий на микробиоценоз кишечника,

Таблица 1
Антагонистические свойства контрольных штаммов бифидобактерий к эталонным штаммам УПМ

	<i>Bifidum bifidum</i> DSM 20239		<i>Bifidum longum</i> DSM 20219 ^T	
Эталонные штаммы	ЗЗР в мм*			
	МРС-5**	Блаурокка**	МРС-5	Блаурокка
<i>S. aureus</i> 209	9	4	9	10
ЭПК 028***	10	4	9	15

Примечание: * ЗЗР – зона задержки роста в мм; ** – МРС-5 и Блаурокка – среды для культивирования бифидобактерий, согласно инструкции по определению антагонистических свойств; ***ЭПК 028 – энтеропатогенная *E. coli*.

Таблица 2
Характеристика антагонистических свойств аутоштаммов бифидобактерий к УПМ (%)

Тест-культура УПМ	Зона задержки роста (мм)			
	0	0–5	5–10	10 и >
<i>S. aureus</i> 209	$8,8 \pm 2,0$	$62,6 \pm 3,4$	$20,0 \pm 3,0$	$8,6 \pm 2,1$
ЭПК 028	$6,5 \pm 1,7$	$49,4 \pm 3,6$	$43,4 \pm 3,5$	$0,5 \pm 0,05$
Аутоштамм <i>S. aureus</i>	$9,8 \pm 0,3$	$74,7 \pm 3,1$	$14,2 \pm 2,5$	$1,0 \pm 0,07$

также свидетельствовали о низкой антагонистической активности индигенных микроорганизмов. И кроме зафиксированной нами тенденции выделения из кишечного биоценоза детей представителей условно-патогенных микроорганизмов на фоне низкого содержания естественных антагонистов УПМ, бифидобактерий и лактобацилл, что вполне логично, обращали на себя внимание частые случаи выделения УПМ у детей на фоне оптимальной концентрации бифидобактерий и лактобацилл.

Нами был проведен эксперимент по оценке антагонистической активности аутоштаммов бифидобактерий, выделенных от детей, проживающих в г. Иркутске, по отношению к транзитному представителю кишечной микробиоты — *S. aureus*. В качестве «антагонистической мишени» были использованы эталонные штаммы *S. aureus* 209 и ЭПКП 028 и три аутоштамма *S. aureus*, выделенные из кишечника детей 5 лет. Для сравнения в таблице 1 приведены показатели антагонистической активности бифидобактерий двух музейных штаммов (*Bifidobacterium bifidum* DSM 20239, *Bifidobacterium longum* DSM 20219^Г) с одновременным определением антагонистической активности аутоштаммов. Показатели антагонистической активности контрольных штаммов бифидобактерий значительно превышали таковые у штаммов, выделенных от детей Иркутска (табл. 1, 2).

В проведенном нами эксперименте *in vitro* было показано, что из 192 аутоштаммов бифидобактерий 71,4 ± 3,2 % обладали низкой антагонистической активностью по отношению к эталонному штамму *S. aureus* 209 (зона задержки роста < 5 мм.) (рис. 2). Показательно, что удельный вес бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к аутоштаммам *S. aureus* был еще выше и суммарно составил 84,5 ± 2,5 % (табл. 2).

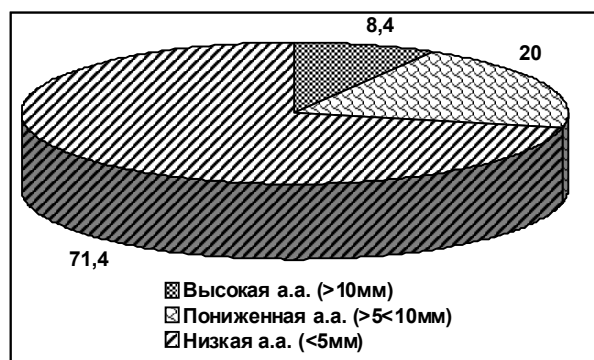


Рис. 2. Антагонистическая активность аутоштаммов бифидобактерий (192 шт.) к *S. aureus*. а.а. – антагонистическая активность.

Изучение плотности УПМ одновременно в двух биотопах (носоглотке и кишечнике) у обследованных детей позволило проанализировать динамику снижения антагонистической активности бифидобактерий на фоне оптимального либо дефицитного содержания лактобацилл (рис. 3).

При одновременном физиологическом содержании как бифидобактерий, так и лактобацилл (верхний левый квадрат рис. 3) УПМ у детей или не обнаруживается (кишечник) или выделяется в малом проценте случаев (6 % случаев – носоглотка).

При дефиците бифидобактерий и норме лактобацилл (верхний правый квадрат, рис. 3) обнаружение УПМ минимально – 6 % случаев, но уже в двух биотопах. Незначительная частота индикации УПМ определяется компенсаторными функциями лактобацилл, принимающими на себя основную нагрузку по обеспечению колонизационной резистентности. Но в то же время процесс выходит за рамки одного биотопа, что подтверждает существование механизма дистантных межмикробных коммуникаций посредством сигнальных молекул и опосредованное

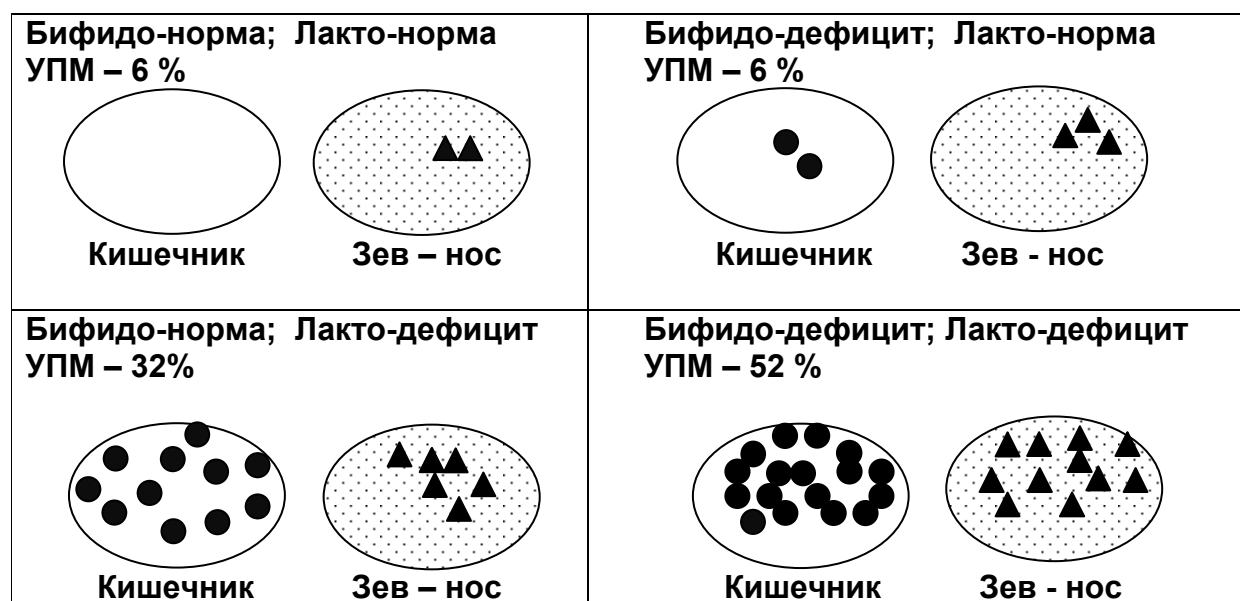


Рис. 3. Оценка антагонистической активности бифидобактерий (*in vivo*). ● – УПМ, выделенная из кишечного биоценоза, ▲ – УПМ, выделенная из носоглотки.

влияние кишечных антагонистов на микроархитектуру других биотопов организма человека [2, 5].

При нормальном содержании бифидобактерий и дефиците лактобацилл (нижний левый квадрат) происходит рост индикации УПМ (32 %), по-видимому, за счет снижения антагонистической активности обоих видов (количественной для лактобацилл, либо качественной для бифидобактерий).

При сочетанном дефиците бифидобактерий и лактобацилл происходит пик индикации УПМ: более 50 % случаев выделения УПМ. Здесь проявляется описанный многими исследователями феномен плотностно зависимого кворум эффекта [5]. Весьма характерно, что по мере снижения суммарной антагонистической активности исследуемых видов бактерий прослеживается общая тенденция роста выделения УПМ одновременно из двух биотопов (носоглотка, кишечник).

Хотя, по мнению некоторых исследователей, результаты взаимодействия микроорганизмов в условиях *in vitro* и *in vivo* могут различаться, полученные данные полностью согласуются. Поэтому есть основания полагать, что низкая антагонистическая активность индигенных микроорганизмов кишечника является особенностью микробной экологии детей, проживающих в экологически неблагоприятных условиях Восточной Сибири.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, зарегистрирован высокий удельный вес аутоштаммов региональной популяции бифидобактерий с низкой антагонистической активностью к представителям транзитных оппортунистических микроорганизмов, что способствует снижению общей колонизационной резистентности, и, следовательно, приводит к нарушению уровня защиты от экспансии различных патогенов, что требует дальнейшего мониторинга состояния интестинального микробиоценоза у детей и разработки методов профилактической корригирующей пробиотической терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. — 2-изд. — СПб.: ИнформМед, 2009. — 276 с.
2. Домарадский И.В., Хохоев Т.Х., Кондракова О.А. Противоречивая микрoэкология // Рос-

сийский химический журнал. — 2002. — № 46 (3). — С. 80—89.

3. Йоргенсен Дж.Х. Микробиологический справочник для клиницистов. — М: Мир, 2006. — 242 с.

4. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Т. 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний. / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Лабора, 2009. — С. 71—141.

5. Микробная эндокринология и биополитика / А.В. Олескин [и др.] // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. Биология. — 1998. — № 4. — С. 3—10.

6. Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» / ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ №231 от 09.06.2003. — 70 с.

7. Пинегин Б.В., Мальцев В.Н., Коршунов В.М. Дисбактериозы кишечника. — М., 1984. — 144 с.

8. Подволоцкая А.Б. Функциональная характеристика аутомикрофлоры кожи детей младшего школьного возраста в условиях техногенного загрязнения среды : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 2000. — 31 с.

9. Постникова Е.А. Изучение биологических свойств бифидо- и лактобактерий, выделенных из кишечника здоровых детей раннего возраста, с целью создания на их основе препарата для лечения дисбиотических нарушений нормальной микрофлоры : автореф. дисс. ... канд. мед. наук. — М, 2003. — 24 с.

10. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника // Информационное письмо. СПб. — 2002. — 15 с.

11. Human Microbiota-Secreted Factors Inhibit Shiga Toxin Synthesis by Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 / T. de Sablet [et al.] // Infect. Immun. — 2009. — Vol. 77. — P. 783—790.

12. Servin A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens // FEMS Microbiol. Rev. — 2004. — Vol. 28, N 4. — P. 405—440.

13. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota // Gut. — 2008. — N 57. — P. 1605—1615.

Сведения об авторах

Ракова Елена Борисовна — к.б.н., научный сотрудник лаборатории микрoэкологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: lenova_@mail.ru)

Попкова София Марковна — д.б.н., руководитель лаборатории микрoэкологии, ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел. 8(3952) 33-34-41; e-mail: smpopkova@gmail.com)

Немченко Ульяна Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории микрoэкологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Шабанова Наталья Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории микрoэкологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

Бухарова Екатерина Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории микрoэкологии ФБГУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН. (664025, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16)

А.П. Савченко, Н.В. Карпова, П.А. Савченко, С.О. Андреев

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСОВ ГРИППА А СУБТИПОВ H5 И H7 НА ЮГЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ СИБИРИ

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (Красноярск)

Впервые на территории юга Центральной Сибири проведено масштабное исследование диких и синантропных птиц на наличие вирусов гриппа А (ВГА). Наряду с использованием традиционных методов лабораторного изучения патогенов в РТГА и ПЦР выполнены орнитологические исследования в местах повышенной концентрации птиц и на пролетных путях. Изучена также многолетняя динамика выделения положительных проб, содержащих специфичные антитела к ВГА субтипов H5 и H7 и РНК-гена этих субтипов. Установлено, что заражение и перезаражение птиц ВГА происходит не только на зимовках, но и в период размножения на водоемах юга Центральной Сибири. Сеголетки активно вовлекаются в эпизоотический процесс в июле, когда передаваемые трансовариальным путем материнские антитела исчезают. Учитывая, что временной интервал между пиками выделения положительных проб в РТГА и ПЦР составляет 3 года, иммунологический мониторинг позволяет проводить комплекс профилактических мероприятий до начала массового падежа птиц.

Ключевые слова: вирусы гриппа А (ВГА), диагностика вирусов гриппа, пролетные пути, миграция птиц, особо опасные патогены, экологическая безопасность

IMMUNOLOGICAL MONITORING OF THE INFLUENZA VIRUS A SUBTYPE H5 AND H7 DISTRIBUTION IN SOUTH OF CENTRAL SIBERIA

A.P. Savchenko, N.V. Karpova, P.A. Savchenko, S.O. Andreyev

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

For the first time in the south of the Central Siberia carried out large-scale study of wild and synanthropic birds for the presence of influenza A viruses. Along with the traditional methods of laboratory study of pathogens in Merskey's reaction and PCR carried out ornithological research in areas of high concentrations of birds and flyways. Also studied the long-term dynamics of isolation of positive samples containing specific antibody to influenza virus A subtypes H5 and H7 and genomic RNA of these subtypes. It was found that infection and reinfection of birds by avian influenza doesn't take place only during the wintering grounds, but also the breeding season in the water keepings of the south of the Central Siberia. Chicks are actively involved in the epizootic process in July, when transovarially transmitted maternal antibodies disappear. Because of the peak interval of positive samples selection in Merskey's reaction and PCR is 3 years, it is possible to organize an immunological monitoring followed by preventive programs development of birds deaths.

Key words: virus influenza A, diagnosis of influenza virus, flyways, migration of birds, the most dangerous pathogens, environmental safety

Водоплавающим и околотовдным птицам принадлежит основная роль в поддержании циркуляции ВГА в диких биоценозах, среди которых инфекция передается фекально-оральным/назальным способом, вызывая обычно мягкую или субклинически протекающую болезнь. Обширный ареал обитания этих птиц и слабовирулентная природа инфекции у них обеспечивает циркуляцию ВГА птиц в природных условиях. Некоторые виды диких уток могут быть носителями вируса гриппа H5 подтипа до трех недель [7]. Кроме того, вирус гриппа птиц успешно выделяли из свежих фекальных масс птиц, а также из неконцентрированной озерной воды [8]. Это указывает на то, что водоплавающие птицы могут с высокой эффективностью инфицироваться через фекальные массы и зараженную воду водоемов [5, 7]. Таким образом, судя по всему, наиболее обычный путь распространения вируса гриппа среди птиц — фекально-оральная или фекально-назальная трансмиссия.

Очевидно, что профилактика вероятностных осложнений должна быть основана на разработке и широком применении всего комплекса мер,

препятствующих реассортации вирусов гриппа, в процессе которой могут появляться его варианты, передающиеся от человека к человеку [3]. Иммунологический мониторинг, включающий серологическую диагностику, полезен не только для слежения за участием в эпизоотическом процессе птиц различных видов и экологических групп, определения роли «промежуточных видов», тесно контактирующих с хозяйствами по разведению домашней птицы, он важен также для разработки эффективного прогноза возникновения и вероятного сценария развития эпизоотии, основанных на знаниях о факторах и механизмах ее инициации.

Использование современных технических средств позволяет вести пассивный надзор с целью раннего выявления больных или ослабленных птиц, который должен быть сосредоточен в местах концентрации синантропных и птиц водно-болотного комплекса, особенно, когда такие территории находятся вблизи хозяйств по разведению домашней птицы.

Целью исследования являлось изучение динамики выделения положительных проб на наличие

специфичных антител и РНК вирусов гриппа А (ВГА) у диких и синантропных птиц на территории юга Центральной Сибири.

Лабораторные работы проведены в вирусологическом отделе специализированного ветеринарного учреждения КГУ «Краевая ветеринарная лаборатория». Авторы выражают признательность и благодарность директору лаборатории П.М. Демчину и заведующей вирусологическим отделом Л.В. Шматовой за помощь, оказанную в лабораторном исследовании проб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись дикие перелетные птицы, в основном экологически связанные с водоемами, и синантропные — врановые, голубообразные и некоторые представители отряда воробьинообразных. Всего обследовано 165 видов птиц. Миграции целого ряда видов в условиях юга Центральной Сибири неразрывно связаны с поймами рек и озерами. В зарослях тростника ночуют трясогузки *M. flava* и *M. citreola*, скворцы *S. vulgaris*, бледные ласточки *R. diluta*, над водой кормятся деревенские ласточки *H. rustica*, а в прибрежной зоне — коньки *Anthus* и подорожники *Calcarius lapponicus*. Фактически эти виды воробьиных с утками, чайками и куликами образуют один биотический комплекс. Синантропные птицы, активно посещающие прибрежные зоны водоемов и выступающие в роли переносчика ВГА, безусловно, представляют серьезную угрозу возможного заноса возбудителя на домашних птиц. Поэтому в настоящей работе этой группе птиц было уделено особо пристальное внимание.

Для оптимизации поисковых работ на начальном этапе был проведен многофакторный анализ компонентов, имеющих индикационное значение, для выявления экологических параметров, обуславливающих высокую степень вероятности участия птиц в эпизоотическом процессе. Тестовая система, позволяющая ранжировать птиц по степени вероятного участия в эпизоотическом процессе на основе суммы мест (по биологическому индексу, вероятности контагиоза, встречаемости, стайности и др., всего 25 параметров), выступала в качестве эвристической модели, отвечая принципу оптимальности в отборе видов-индикаторов [2].

Забор проб на анализ инфицированности вирусом гриппа у наиболее массовых и потенциально опасных птиц проводили в течение 2006–2011 гг. Сделан лабораторный анализ 12 234 проб сывороток крови на наличие антител к ВГА на тест-системах РТГА. Из них, 4 288 проб было взято у представителей семейства врановых, что составило 35,1 % от их общего числа птиц. Для выявления заражения и идентификации РНК-генома исследованы 3 334 проб биоматериала и клоакальных смывов в ПЦР, из которых врановые составили 355 проб или 10,6 %.

Отбор биологического материала проводили в 5 группах районов Красноярского края (Южной, Ачинской, Центральной, Канской и Енисейской),

на территории Республики Хакасия и в небольшом объеме — в Республике Тыва. Материал отбирался с соблюдением действующих правил и инструкций Минсельхоз РФ [1, 4]. Для взятия биологического материала применяли метод избирательного отлова и отстрела диких и синантропных видов птиц, имеющих высокий индекс эпизоотической опасности. У птиц средних размеров кровь отбирали из подкрыльцовой вены в стерильные пробирки, увлажненные физиологическим раствором.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Иммунологический мониторинг птиц на территории Красноярского края в зависимости от орнитологической обстановки, времени и частоты поступления положительных проб позволил выделить шесть основных периодов.

Нулевой период (с 15 марта по 20 апреля, 15–22-я пентады) выделяется отсутствием положительных проб, несмотря на начало миграции водоплавающих птиц.

Первый (с 21 апреля по 15 мая, 23–27-я пентады) совпадает с массовой миграцией водоплавающих на юге Центральной Сибири и началом гнездования таких раннеприлетных видов, как кряква и чирок-свистунок, от которых и были выделены положительно реагирующие пробы.

Второй период (с 16 мая по 14 июня, 28–33-я пентады) характеризуется отсутствием или небольшим числом проб в начале, хотя именно в это время на Ачинском и Красноярском миграционных участках идет массовый пролет ряда видов водоплавающих. Резкое увеличение доли положительных проб отмечено во второй половине периода. На ключевых водоемах гусеобразные составляли до 30,0 % суммарного обилия учитываемых видов. Доминировали из них широконоска (18,5 %), чирок-трескунок (18,2 %) и красноголовая чернеть (12,8 %). Период отличался максимальным значением индекса видового разнообразия, рассчитанным среди инфицированных птиц. Наряду с гусеобразными среди реагирующих положительно отмечены представители поганкообразных (*Podiceps auritus*), ржанкообразных (*Vanellus vanellus*) и воробьиных (*Riparia riparia*). Из гусеобразных абсолютно доминировал чирок-трескунок (47,4 %), на втором месте была широконоска (12,5 %). Именно в этот период отмечено максимальное среднее значение титров $107,0 \pm 12,4$, при сравнительно небольшом варьировании отдельных значений ($C_v = 59,1$).

В третий период (с 15 июня по 14 июля, 34–39-я пентады) выделяемые антитела к ВГА-субтипа Н5 были с более низким ($P < 0,01$), в сравнении с предыдущим периодом, средним значением титров — $58,1 \pm 13,5$ при $C_v = 101,0$. Произошло также заметное снижение индекса видового разнообразия среди инфицированных птиц. Период характеризовался разнообразными биологическими явлениями: гнездованием, линькой водоплавающих, вылулпением птенцов у уток, гусей, появлением слетков у ряда воробьиных птиц, гнездящихся

видов куликов и, наконец, началом обратной миграции взрослых северных куликов.

В четвертый период (с 15 июля по 28 августа, 40 – 48-я пентады) получено наибольшее число положительных проб с антителами, специфичными к ВГА-субтипа H5; в долевого отношении на этот период пришлось более 49 % от их общего числа. Среди реагирующих положительно отмечены представители гусеобразных (*Anas platyrhynchos*, *A. crecca* (pull, subad), *A. clypeata*, *A. querquedula*), поганкообразных (*Podiceps nigricollis*), ржанкообразных (*Larus ridibundus* (pull, subad), *L. canus* (pull, subad) и журавлеобразных (*Fulica atra* (pull, subad). Распределение долей среди гусеобразных от третьего периода отличалось возрастанием участия кряквы (36,8 %) и чирка-свистунка (26,3 %) при снижении роли широконоски (10,5 %).

Суммарно гусеобразные равнялись 50,0 % от общего числа положительных проб в этот период, которые были представлены 4 видами. Другую долю хотя и составляли 3 отряда, но среди них абсолютно доминировала лысуха (36,8 %). Среднее значение титров статистически не различалось от предыдущего периода ($P > 0,05$) и составило $64,1 \pm 6,6$ при $C_v = 86,5$. Близким был и индекс видового разнообразия. Во второй половине июля взрослые утиные заканчивали линьку, но птенцы в своей массе еще оставались нелетными, что ограничивало их пространственное перемещение. Произошло заметное увеличение обилия скворцов по берегам водоемов Ширинского и Бейского районов Хакасии. За счет вылета части молодых (около 50 % колоний) возросла численность и бледных ласточек.

Пятый период (с 29 августа по 1 ноября, 49-61-я пентады). Несмотря на продолжительность (65 дней) в этот период выделялось незначительное число положительно реагирующих проб: у гусеобразных (*Anas penelope*, *A. crecca*), журавлеобразных – у *Fulica atra* (pull.) и воробьинообразных (*Corvus corone orientalis*). Третья декада августа для перелетных водоплавающих птиц характеризовалась окончательным становлением на крыло молодняка текущего года и птиц, закончивших линьку. В полной мере происходили миграционные процессы, шло формирование предотлетных скоплений, а в поведении птиц отчетливо проявлялись элементы миграционного состояния. В пределах Енисейского миграционного участка, за исключением миграций гусеобразных и ржанкообразных, формировался типичный зимний состав авифауны, но по долине Енисея наблюдали пролет сизой чайки, белохвостого песочника, турухтана и некоторых видов уток. В лесостепной и подтаежной частях Минусинской котловины разнообразие птиц и их количество было высоким. Фоновыми являлись врановые, представленные грачем и черной вороной, довольно много держалось клинтухов (стаи до 50 особей). По окраинам увлажненных участков встречались желтые трясогузки, в лесополье – черноголовые чеканы, полевые жаворонки, славки, степные коньки, в местах выпаса скота крупными стаями перелетали скворцы.

Во второй половине сентября после снижения миграционной активности, которая отчетливо проявилась в четвертой пентаде сентября, был вновь отмечен интенсивный пролет уток. Заметное увеличение обилия нырков под Красноярском произошло 22 – 25 сентября, когда на протоках Енисея сформировались их скопления из 200 – 300 особей. На прудах и очистных сооружениях 26 – 28 сентября были отмечены шилохвосты, а через несколько дней стали доминировать связи. Из воробьиных были многочисленны чернозобые дрозды, рябинники, синехвостки, клесты-еловики, обыкновенные овсянки, овсянки-ремезы, черные вороны, грачи, сороки и полевые воробьи. В мелколиственных подтаежных лесах дрозды нередко образовывали смешанные стаи до 100 – 150 особей.

В Ачинской лесостепи уток, летящих транзитом в западном и юго-западном направлениях ($A = 200 - 270^\circ$), отмечали как в ночные, так и дневные часы. В районе оз. Интиколь 29 – 30.09.2006 г. на высоте 200 – 500 м было учтено 19 стай по 25 – 150 особей, а на водоеме сосредоточилось около 5,0 тыс. уток, преимущественно шилохвосты, связи, хохлатой чернети. Там же держались крупные стаи чирка-трескунка, серой утки, кряквы, широконоски, весьма обычными были гоголь и красноглазая чернеть. Сравнительно высокая доля таких «южных» уток, как *Anas querquedula*, *A. clypeata*, *A. strepera*, *A. platyrhynchos*, вероятно, связана с поздними сроками размножения их в Приангарье.

В 2008 г. резко возросло число выделяемых проб, содержащих РНК вирусов гриппа А субтипов H5 и H7, что отразилось на общей динамике положительных проб. Наибольшее число проб (более 80,0 %), содержащих РНК вирусов гриппа субтипов H5 и H7, выделено с 25 июня (36 pt) по 28 августа (48 pt): 25 или 42,4 % от общего числа – у представителей отряда Anseriformes (*Anas crecca*, *A. platyrhynchos*, *Aythya ferina*, *A. clypeata*, *Aythya fuligula*, *A. querquedula*, *A. acuta*, *Mergus merganser*); 20 проб (33,9 %) – у Passeriformes (*Riparia diluta*, *Corvus frugilegus*, *Sturnus vulgaris*, *Corvus corone*, *Passer montanus*, *Acrocephalus agricola*, *Motacilla flava*); 8 (13,6 %) – у Charadriiformes (*Larus canus*, *Philomachus pugnax*, *Larus ridibundus*); 4 (6,8 %) – Gruiformes (*Fulica atra*); 1 (1,7 %) – Podicipediformes (*Podiceps cristatus*); 1 (1,7 %) – Ciconiiformes (*Ardea cinerea*).

Весенний пролет птиц завершается в июне (35-я pt) в степной зоне перемещениями стрижей (*A. apus*, *A. pacificus*), а в южной тайге – прилетом *Sylvia communis rubicola* и *Locustella certhiola sparsimstriata*. Однако интенсивность перемещений на водоемах региона и во время массового появления пуховичков у водоплавающих птиц сохраняется довольно высокой за счет как подлета и формирования ночевоч скворцов, так и подвижек ряда видов улитов.

Очевидно, что дифференциация положительных проб по наличию антител и РНК вирусов

гриппа А-субтипов Н5 и Н7 в 2006–2011 гг. характеризует два различных процесса: в первом случае, инфицированность птиц, во втором – вирусоносительство (рис. 1). В целом, на фоне снижения напряженности иммунитета и значительного сокращения численности ряда видов птиц (*A. platyrhynchos*, *A. crecca*, *A. clypeata*, *Aythya ferina*, *Fulica atra* и др.) произошло резкое возрастание вирусоносительства с 1,1 % в 2007 г. до 11,4 % – в 2008 г. Его снижение отмечено нами в 2009–2011 гг. до 1,6; 5,7 и 4,2 % соответственно (рис. 1).

Различается также и динамика доли положительных проб у диких и синантропных птиц (рис. 2). У синантропных видов антитела появились позднее, но рост иммунитета птиц характеризовался большей напряженностью. Следует заметить, что до недавнего времени вирусы со всеми известными сочетаниями поверхностных белков выделяли только от диких птиц водного и околородного комплексов. В 2007 г. в регионе иммунная прослойка

среди воробьиных возросла, при этом заметно увеличилось участие в эпизоотическом процессе таких представителей семейства врановых, как *Corvus frugilegus*, *C. monedula* и *C. corone*. В 2008–2011 гг. ВГА субтипа Н5 и Н7 были найдены у нескольких видов мелких воробьиных, а в 2010 г. – и у курообразных (рябчик *Tetrastes bonasia* L.). Это также подтверждает тезис о том, что ВГА субтипов Н5 и Н7 находят новые экологические ниши.

В процессе выполнения работ на основе разработанной тест-системы и последующего лабораторного исследования проб нами уточнен перечень видов и групп птиц – основных переносчиков ВГА. В настоящее время он включает 53 вида, относящихся к 8 отрядам: поганкообразные, веслоногие, голенастые, гусеобразные, журавлеобразные, курообразные, ржанкообразные и воробьиные. Из доминантной группы можно выделить 12 видов, заслуживающих, на наш взгляд, особого внимания (табл. 1).

Завершая анализ выделения положительных проб, необходимо отметить, что в ряде мест, на-

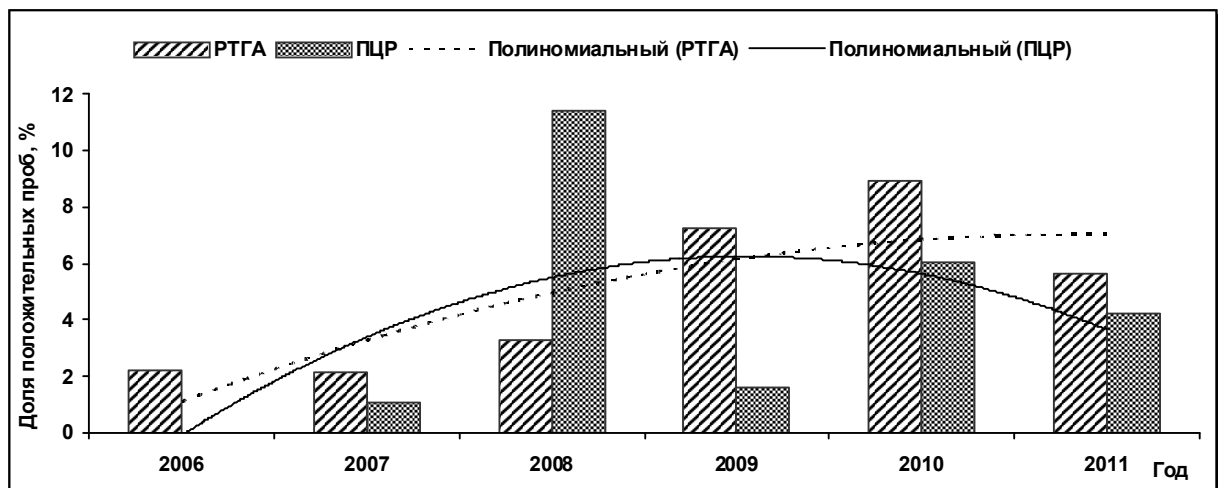


Рис. 1. Динамика доли положительных проб птиц от их общего числа за период 2006–2011 гг. на территории юга Центральной Сибири.

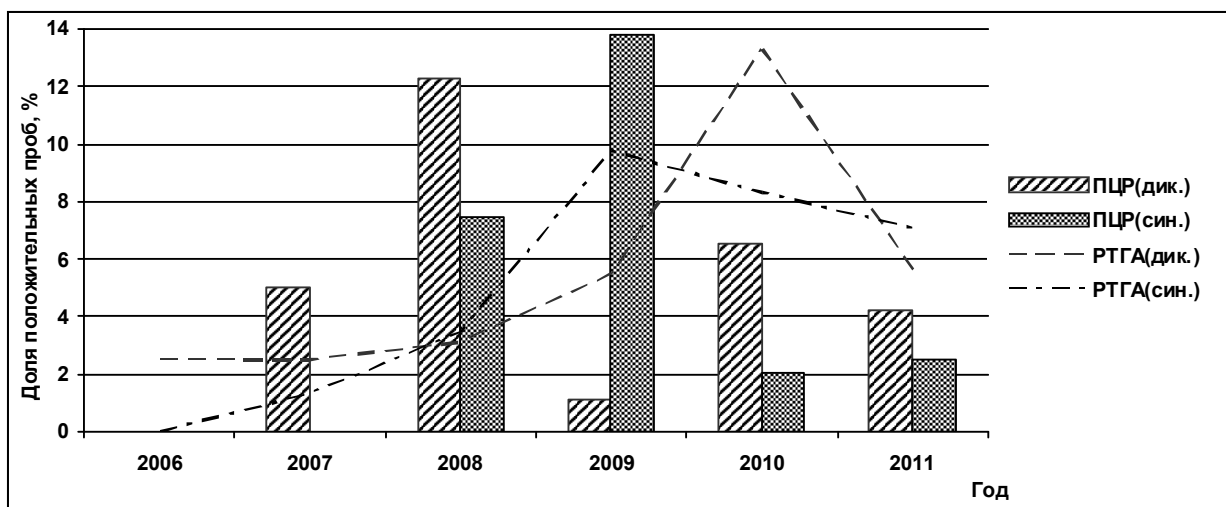


Рис. 2. Динамики доли положительных проб диких и синантропных видов птиц в 2006–2011 гг. на территории юга Центральной Сибири.

Таблица 1

Доминантная группа диких и синантропных птиц, участвующих в эпизоотическом процессе ВГА субтипов Н5 и Н7 на юге Центральной Сибири

Вид	Положительных проб, +(абс.)							Доля, %
	годы						всего	
	2006	2007	2008	2009	2010	2011		
Грач – <i>Corvus frugilegus</i> L.	0	10	21*	6	33	2	72	16,1
Ворона черная – <i>Corvus corone</i> L.	0	3	16*	10	34	2	65	14,8
Лысуха – <i>Fulica atra</i> L.	16	7	3*	0	17	4	47	10,5
Широконоска – <i>Anas clypeata</i> L.	5	9	1*	7	9	3	34	7,6
Чирок-трескунок – <i>Anas querquedula</i> L.	14	10	1*	0	2	4	31	6,9
Кряква – <i>Anas platyrhynchos</i> L.	12	4*	1	0	9	3	29	6,5
Сизая чайка – <i>Larus canus</i> L.	3	0	16*	0	6	0	25	5,6
Чирок-свиистунок – <i>Anas crecca</i> L.	9	4*	4	0	5	4	26	5,8
Шилохвость – <i>Anas acuta</i> L.	0	3	2*	1	7	4	17	3,8
Рябчик – <i>Tetrastes bonasia</i> L.	0	0	0	0	12*	0	12	2,7
Красноголовая чернеть – <i>Aythya ferina</i> L.	3	1*	5	2	0	0	11	2,4
Хохлатая чернеть – <i>Aythya fuligula</i> L.	0	9*	0	0	1	0	10	2,2

Примечание: доля от общего числа положительных проб в РТГА; * – год выделения РНК в ПЦР.

пример, на оз. Интиколь (Новоселовский район) пробы с положительными значениями титров выделялись на протяжении всего весенне-летне-осеннего периода в течение 6 лет. Инфицированными оказались как взрослые (ad), так и молодые (pull, subad) птицы, вылупившиеся и поднявшиеся на крыло на данном водоеме. Всего за период 2006 – 2011 гг. антитела к гемагглютиниnam под-типа Н5, Н7 обнаружены в 484 пробах, из которых 179 – от синантропных птиц, что составило 36,9 % от общего числа положительных проб. При обследовании в полимеразно-цепной реакции РНК ВГА субтипов Н5 и Н7 на территории Красноярского края выделена 167 пробах, из которых 17 (10,2 %) – от синантропных видов.

Корреляционный анализ выявил высокую степень сопряженности ($r_s = 0,8$ при $p < 0,01$) выделения антител и РНК ВГА-субтипов Н5 и Н7 как по отдельным районам, так и по миграционным участкам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Динамика выделения положительных проб, а также инфицирование и вирусоносительство, отмечаемое как у взрослых, так и молодых птиц (сеголетков), позволяет говорить о заражении и перезаражении птиц ВГА не только на зимовках, но и в период размножения на водоемах юга Центральной Сибири. Сеголетки активно вовлекаются в эпизоотический процесс в июле, когда передаваемые трансвариальным путем материнские антитела исчезают.

По результатам проведения ПЦР-диагностики установлено, что резкое увеличение числа выделяемых положительных проб, содержащих РНК ВГА субтипов Н5 и Н7, произошло в 2008 г. и достигало

11,4 % от их общего числа. В 2009 – 2011 гг. наблюдалось снижение вирусоносительства у диких водоплавающих птиц на фоне вовлечения в эпизоотический процесс синантропных птиц.

Выявление реагирующих среди синантропных птиц указывает на процесс адаптации ВГА субтипов Н5 и Н7 к новым видам, что, безусловно, может способствовать активной и широко распространенной циркуляции вирусов гриппа с различной антигенной формулой и возможностью вовлечения ВГА в эпидемический и эпизоотический процессы.

Антитела, выделенные из сывороток крови диких птиц на территории Красноярского края, и, особенно, в районах и урочищах с повторным выделением на протяжении всего периода работ, безусловно, не связаны с вакцинацией, на основании чего следует заключить, что вероятность возникновения эпизоотии на территории Красноярского края сохраняется высокой. Если учесть, что временной интервал между пиками выделения положительных проб в РТГА и ПЦР составил 3 года, то именно иммунологический мониторинг позволяет проводить комплекс профилактических мероприятий со значительным опережением, а не во время или начале массового падежа птиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Об утверждении правил по борьбе с гриппом птиц // Приказ Минсельхоза РФ № 90 от 27.03.2006 г. — <http://www.mcsc.ru/documents/document/show/17439.156.htm>.
2. Савченко А.П. Миграции наземных позвоночных Центральной Сибири и проблемы экологической безопасности : автореф. дис. ... докт. биол. наук / А.П. Савченко. — Улан-Удэ, 2009. — 49 с.

3. Самуйленко А.Я., Соловьева Б.В., Непоклонова Е.А. Инфекционная патология животных, в 2 т., т. 1. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. — С. 655—681.
4. Хлыстунов А.Г., Шматова Л.В. Правила отбора патматериала для исследования на грипп птиц. — Красноярск, 2006. — С. 1—3.
5. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005—2009 гг.) : автореф. дис. ... докт. биол. наук / М.Ю. Щелканов. — М., 2010. — 53 с.
6. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl / H. Chen [et al.] // Nature. — 2005. — Vol. 293, N 7048. — P. 191—192.
7. Influenza A virus surveillance in wild birds in northern Europe in 1999 and 2000 / R.A. Fouchier [et al.] // Avian Dis. — 2003. — Vol. 47. — P. 60—857.
8. Persistence of avian influenza viruses in water / D.E. Stallknecht [et al.] // Avian Dis. — 1990. — Vol. 34. — P. 11—406.

Сведения об авторах

Савченко Александр Петрович — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, д. 81 «Г», кв. 60; сот. тел. 89131922566)

Карпова Наталья Валерьевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 50 «А», кв. 8)

Савченко Петр Александрович — аспирант кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ)

Андреев Сергей Олегович — ассистент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ)

А.П. Савченко, В.И. Емельянов, П.А. Савченко, С.О. Андреев, И.А. Савченко, Н.В. Карпова,
В.Л. Темерова

О ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА А И ПАДЕЖЕ ПТИЦ НА ЮГЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ СИБИРИ

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (Красноярск)

Изучена многолетняя динамика циркуляции вирусов гриппа А на юге Центральной Сибири. Исследована динамика численности птиц — основных переносчиков вирусной инфекции, а также пространственно-временное распределение положительных проб, содержащих специфичные антитела к ВГА субтипов H5 и H7 и РНК-гена этих субтипов. Рассмотрены случаи падежа диких и синантропных птиц в регионе. Показана четкая корреляция между выявленными очагами ВГА, падежом птиц и заболеванием людей со значительным превышением сезонного эпидемиологического порога, в том числе и с субтипом H1N_{sw}.

Ключевые слова: вирусы гриппа А (ВГА), диагностика вирусов гриппа, пролетные пути, миграция птиц, особо опасные патогены, экологическая безопасность

ABOUT THE CIRCULATION OF INFLUENZA VIRUS A AND THE DEATHS OF BIRDS IN SOUTH OF CENTRAL SIBERIA

A.P. Savchenko, V.I. Emelyanov, P.A. Savchenko, S.O. Andreyev, I.A. Savchenko,
N.V. Karpova, V.L. Temerova

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

It was studied the long-term dynamics of influenza A viruses circulation in the Southern Central Siberia. Also, we studied of birds population dynamic as the main carriers of viral infection, as well as spatial and temporal distribution of positive samples containing specific antibody to influenza viruses subtypes H5 and H7 and genomic RNA of these subtypes. It was considered the cases of mortality wild and synanthropic birds in the region. It was shown a correlation between the identified centers of the virus influenza, the deaths of birds and human disease with significant excess seasonal epidemic threshold, including a subtype H1N_{sw}.

Key words: virus influenza A, diagnosis of influenza virus, flyways, migration of birds, especially dangerous pathogens, environmental safety

Вирусы гриппа А (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), обладающие высокой степенью изменчивости генома, занимают важное место в структуре заболеваемости людей острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), составляющими до 90 % от всех других инфекционных болезней. Ежегодно заболеваемость сезонным гриппом в РФ составляет 25–35 млн. человек, из них 45–60 % — дети. Экономический ущерб РФ от эпидемического гриппа составляет в среднем 80 млрд. руб / год или порядка 85 % экономических потерь от инфекционных болезней в целом. Природным резервуаром вирусов гриппа А (ВГА) являются птицы водно-околоводного комплекса. Они с легкостью переносят его в кишечнике и выделяют в окружающую среду посредством фекально-оральной трансмиссии. Основными факторами, обеспечивающими высокую устойчивость паразитарных систем, являются их иерархическая организация, гибкость, гетерогенность популяций паразита и хозяина, резервация паразита, многочисленность хозяев и полигостальность паразита [5, 6, 13]. Вирусы гриппа А, преодолевая межвидовые барьеры, способны проникать в популяции новых потенциальных хозяев, адаптироваться и циркулировать среди них достаточно продолжительное время. Особую опасность как для человека, так и сельскохозяйственных животных представляют высокопатогенные субтипы ВГА H5 и H7.

Целью исследования являлось изучение интродукции и распространения вирусов гриппа А на территории юга Центральной Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Забор проб на анализ инфицированности вирусом гриппа у наиболее массовых и потенциально опасных птиц проводили в течение 2006–2011 гг. Сделан лабораторный анализ 12 234 проб сывороток крови на наличие антител к ВГА на тест-системах РТГА, из которых 4 288 проб было взято у представителей семейства врановых, что составило 35,1 % от их общего числа птиц. Для изучения на предмет заражения и идентификации РНК-гена исследовано 3 334 проб биоматериала и клоакальных смывов в ПЦР. Отбор биологического материала проводили на территории Красноярского края Республики Хакасия и в Республике Тыва. Материал отбирался с соблюдением действующих правил и инструкций Минсельхоза РФ [7]. Для взятия биологического материала применяли метод избирательного отлова и отстрела диких и синантропных видов птиц, имеющих высокий индекс эпизоотической опасности.

Лабораторные работы выполнены в вирусологическом отделе специализированного ветеринарного учреждения КГБУ «Краевая ветеринарная лаборатория», часть проб передавали для дальнейшего субтипирования по подтипам гемагглютинаина и нейраминидазы в научно-методический Центр по референс-диагностике и изучению высокопатогенных штаммов вируса гриппа на базе ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Новосибирск) и ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (г. Владимир).

Авторы выражают признательность и благодарность директору КГБУ «Краевая ветеринарная лаборатория» П.М. Демчину и заведующей вирусологическим отделом этой лаборатории Л.В. Шматовой, заведующему отделом ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» А.М. Шестопалову и заведующему национальной референтной лабораторией по гриппу птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» В.Н. Ирзе за помощь, оказанную в лабораторном исследовании проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Работы по экологии вирусов гриппа на территории Восточной Сибири, в том числе и в ряде районов Красноярского края, Республики Хакасия, были начаты с 1973 г. До этого времени не имелось каких-либо сведений о циркуляции ВГА в природных биоценозах региона. При обследовании мест массового пролета и гнездования птиц среди изолятов, выделенных в 1986 — 1990 гг., встречались лишь штаммы вируса гриппа, содержащие гемагглютинин 3-го типа. Положительные пробы были получены от водно-болотных — *Anas platyrhynchos*, *A. querquedula*, *Aythya ferina*, *Fulica atra* и некоторых лесных воробьиных птиц — *A. hodgsoni*, *Turdus obscurus*, *Muscicapa latirostris* [2]. Все перечисленные виды либо их пространственные группировки зимуют в Юго-Восточной Азии, что подтверждается встречами их на зимовках, а по утиным — и находками окольцованных птиц.

В результате этих исследований было установлено, что для Восточной Сибири резервуарами гриппа А-субтипа Н3 и Н3N8 могут быть птицы 31 вида, в том числе 18 — водно-болотного комплекса, 9 — экологически связанных с лесом и 4 синантропных вида птиц. Абсолютное большинство штаммов орто- и парамиксовирусов изолировано от водоплавающих и околоводных птиц, главным образом, от утиных. Среди синантропных видов штаммы ВГА и болезни Ньюкасла в тот период были выделены у *Columba rupestris*, *Corvus corone*, *Passer domesticus*, *P. montanus*.

О.З. Горин [2] отмечал, что в регионе каждые 2 — 3 года происходят значительные качественные и количественные изменения в эпизоотологическом процессе. Наблюдается смена не только основного возбудителя ВГА по антигенной формуле, но и его исчезновение или появление отдельных видов вирусов, циркулирующих среди птиц. На основании чего еще в 1990 г. было высказано предположение о возможности существенного изменения «вирусологического пейзажа» штаммов ВГА, циркулирующих среди птиц.

Это предположение нашло подтверждение уже в 1991 г., когда впервые для Восточно-Сибирского региона от водоплавающих птиц из Тункинской долины были изолированы штаммы с новой антигенной формулой, содержащей гемагглютинины 13-го типа. ВГА-субтипы Н5 и Н7 в тот период в Восточно-Центральнoсибирском регионе не встречались, что дает основание говорить о их недавнем появлении и, скорее всего, заносе перелетными птицами.

В результате наших исследований, а также работ, выполненных сотрудниками Института

эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАН [3, 8, 9, 11], на территории юга Центральной Сибири и в прилегающих к ней районах в настоящее время установлена циркуляция 17 штаммов вирусов гриппа А (Н1N1, Н5N1, НswN1, Н0N1, Н1N4, Н1N1sw, Н2N2, Н3N2, Н3N5, Н3N6, Н3N8, Н4N6, Н7N1, Н7N8, Н10N7, Н13N6, Н13N8), в том числе высокопатогенных как для человека, так сельскохозяйственных животных. В миграционном коридоре, соединяющем Кежемское многоостровье с районами Красноярского края и Хакасии, места и динамика выделения положительных проб имеют явно выраженную сегрегированность, в большинстве случаев соответствующую основному направлению пролета водоплавающих птиц.

Первая и наиболее значительная вспышка ВГА, сопровождаемая большим падежом диких птиц, произошла в приграничной зоне Монголии и Республики Тыва. У диких птиц, которые погибли 10 июня на оз. Убсу-Нур, специалистами ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» был выделен высокопатогенный вирус Н5N1. По имеющимся в нашем распоряжении данным, дополненным А.А. Барановым и М.Ю. Щелкановым, с учетом уточнения видовой принадлежности и численности фоновых видов птиц, динамика падежа на оз. Убсу-Нур развивалась следующим образом. Появление первых птиц с характерными клиническими признаками и незначительный падеж отмечены в конце мая; увеличение доли павших птиц — в первой и второй декадах июня; резкое (пиковое) возрастание числа погибших птиц — 21 — 25 июня и «затухание» процесса началось с 26 июня (рис. 1). По состоянию на 2.07.2006 г. на российской части озера было собрано и сожжено 3460 тушек павших птиц, а всего, по оценке Д.К. Львова и др. [6, 13], на акватории и прибрежной полосе водоема (включая его монгольскую часть) погибло около 100 тыс. птиц.

С 10 июля 2006 г. режим ограничительных мероприятий, введенный в акватории озера, сменил карантин. Кроме того, противоэпизоотические мероприятия по недопущению распространения заболевания диких птиц гриппом в тот год проводились и в с. Сарыг-Холь. Падеж диких птиц на оз. Убсу-Нур, но в значительно меньшем объеме, продолжался в летние месяцы 2007 — 2009 гг. Лабораторный анализ в РТГА и ПЦР, взятых нами проб (более 168 образцов) от птиц с соседних водоемов (р. Тейсин-Гол, озера Торе-Холь, Шара-Нур и др.) в основном дал отрицательный результат, выделена лишь одна проба от огаря с оз. Шара-Нур, содержащая РНК ВГА субтипа Н5.

Анализ развития ситуации на оз. Убсу-Нур позволяет говорить о том, что контакты птиц разных экологических групп на водоемах, возможно, приводят к пассированию вируса, хотя не исключено, что вспышки вызываются одним или несколькими видами, образующими наиболее плотные концентрации. Так, летом 2006 г. на рассматриваемом водоеме в падеже доминировала *Podiceps cristatus*, плотность гнездования которой на отдельных участках достигала до 2,0 тыс. пар на 1 км². Массовый падеж и распространение инфекции на другие

виды совпали со временем достижения большей частью птенцов чомги 12–14-дневного возраста.

В Красноярском крае первый незначительный падеж водоплавающих (*Anas platyrhynchos*, *A. querquedula*, *Aythya ferina* и *A. fuligula*) и околоводных (*Larus canus*) птиц был зарегистрирован в конце июля 2007 г. на оз. Большое Шарыповского района. Всего, по нашей оценке, там погибло 150–200 птиц.

Более массовый падеж (от 500 до 1 тыс. особей) в основном синантропных птиц (*Columba livia*, *Corvus corone*, *C. monedula*, *Passer domesticus*, *P. montanus*) был отмечен весной и в начале лета 2009 г. в г. Козинске (Кежемский р-н) и селах Прихольме, Новотроицкое, Быстрая, Суходол (Минусинский р-н) и с. Межово (Большемуртинский р-н). Пробы, полученные из мест падежа, преимущественно содержали вирусы болезни Ньюкасла, хотя в предыдущие годы и позднее от водоплавающих и врановых из близлежащих территорий выделяли и ВГА субтипов H5.

Географически места падежа и регулярного выделения проб к ВГА-субтипа H5, начиная с 2006 г., укладываются в главный миграционный коридор и совпадают с генеральным курсом пролета основной массы водоплавающих птиц. С учетом территориальных связей птиц и пространственно-временной динамики выделения положительных проб вполне ожидаем был падеж птиц, прошедший весной 2009 г. в г. Козинске и 4-х населенных пунктах Минусинского района, а в 2010 г. и на оз. Тагарское этого же района [4, 10].

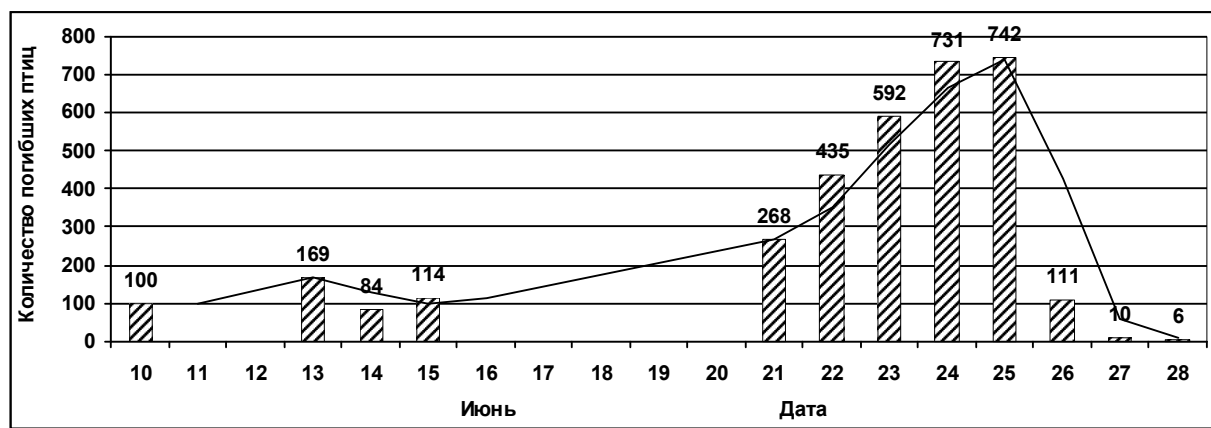
К началу сентября (начальный этап падежа птиц) на озере держалось более 2,5 тыс. птиц, представленных преимущественно речными утками (до 70 %). К моменту обнаружения павших птиц (18.09.2010) на водоеме и в прибрежной зоне погибло около 1000 особей. В последующие дни процесс

гибели птиц продолжался, но более низкими темпами. Окончательно он прекратился только в конце октября. Состав птиц, собранных и утилизированных на оз. Тагарское в период с 18 по 30 сентября 2010 г., по спектру питания довольно разнообразен, но представлен, за исключением вороны черной, видами водно-болотного комплекса (табл. 1).

На соседних водоемах погибших птиц нами не обнаружено. На фоне массовой гибели на оз. Тагарское сохранялась высокая численность водоплавающих. По учетам 18 сентября там было до 1800 речных уток, около 1000 нырков, 220 лысух, 25 огарей. В прибрежной части водоема учтено 12 круглоносых плавунчиков и 7 тулесов. В двадцатых числах (22–25) сентября там отметили 7 малых лебедей. В конце третьей декады сентября видовой состав уток на озере изменился, в скоплениях стали преобладать нырки. Так, доля гоголя в конце сентября превышала 60 % от общего числа утиных.

Всего для лабораторного исследования нами было взято 99 проб от погибших и ослабленных диких птиц: 49 проб для РТГА и 50 – для ПЦР-диагностики. В результате лабораторного исследования было установлено наличие ВГА нескольких низкопатогенных субтипов H3. Сотрудниками ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Роспотребнадзора РФ по Красноярскому краю высказывались разные версии гибели птиц: от бактериальной инфекции до химического отравления уток зерном. Исходя из состава погибших птиц, имеющих различные кормовые объекты, мы все же склонны считать, что причиной падежа птиц на оз. Тагарское явилась вирусная инфекция, а не «отравление их зерном или водорослями».

Субтипирование по подтипам гемагглютинаина и нейраминидазы с выделением H5N1 в рассматриваемом регионе сделано по пробам, полученным от



Июнь, дата	10–12	13–14	15–17	18	19	20–21	22	23–24	25–27	28
Пентады	33		34			35			36	
Доминирующий вид падежа	<i>Ay. rufina</i>	<i>Ay. rufina</i>	<i>Ay. rufina</i>	<i>Ay. rufina</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>
Минорные виды падежа	–	–	<i>P. cristatus</i>	<i>P. cristatus</i>	<i>Ay. rufina</i>	–	–	–	–	–
Единичные особи в падеже	–	<i>P. cristatus</i>	–	<i>C. cygnus</i>	–	<i>Ay. rufina</i> <i>F. atra</i>	<i>F. atra</i>	<i>F. atra</i> <i>Ph. carbo</i>	<i>F. atra</i>	–

Рис. 1. Динамика падежа птиц на российской части оз. Убсу-Нур (июль, 2006 г.)

Таблица 1

Видовой состав и число птиц, собранных и утилизированных на оз. Тагарское осенью 2010 г.

Вид	Число птиц по датам, особей				Суммарное значение	Доля, %
	18–19.09	22–23.09	26–27.09	29–30.09		
Утиные (отряд гусеобразные)						
Кряква	106	120	77	20	323	15,6
Чирок-свиистунок	64	400	260	70	794	38,3
Серая утка	14	5	0	0	19	0,91
Свиязь	59	76	40	12	187	9,0
Шилохвость	68	240	125	20	453	21,9
Чирок-трескунок	5	12	0	0	17	0,82
Широконоска	8	80	40	35	163	7,9
Красноголовый нырок	4	10	0	0	14	0,68
Гоголь	2	2	3	1	8	0,39
Пастушковые (отряд журавлеобразные)						
Лысуха	6	45	21	6	78	3,8
Коростель	0	1	0	0	1	0,05
Бекасовые (отряд ржанкообразные)						
Чибис	2	0	0	0	2	0,10
Турухтан	3	0	0	0	3	0,14
Бекас	0	5	0	0	5	0,21
Врановые (отряд воробьинообразные)						
Ворона черная	2	0	0	0	2	0,10
Трясогузковые (отряд воробьинообразные)						
Трясогузка желтая	2	0	0	0	2	0,10
Всего	348	996	563	158	2071	100,0

птиц с оз. Убсу-Нур (Тува) и р. Ангары (Кежемское многоостровье, Красноярский край). В последнем случае результаты исследований, полученные сотрудниками Института эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН ГУ [3], подтверждают выводы о циркуляции высокопатогенных ВГА не только среди птиц Байкальского региона, но и на территории юга Центральной Сибири. Кроме того, было доказано «свежее» (до формирования антител) инфицирование 2 видов птиц субтипом H5N1.

Важно отметить, что распространение ВГА субтипов H5 и H7 в регионе, уже сегодня имеет ощутимые экологические последствия. Так, среди доминантной группы инфицированных водоплавающих видов птиц, отнесенных к объектам охоты, в 2008 – 2009 гг. произошло резкое и значительное (от 3,5 до 10 крат) сокращение их обилия. На большинстве водоемов юга Центральной Сибири практически исчезла лысуха, малочисленными стали красноголовые чернети, почти в 10 раз произошло снижение чирка-трескунка. Важно отметить, что число выделенных положительных проб коррелирует с динамикой численности доминантной группы птиц при $P < 0,05$.

По вполне понятным причинам крайне сложной представляется задача по установлению и

оценке масштабов падежа наземных лесных птиц и птиц открытых ландшафтов, рассредоточенных на обширных пространствах Сибири. В этом случае совершенно очевидной становится необходимость объединения иммунологических исследований и результатов многолетнего орнитологического мониторинга динамики численности видов-потенциальных участников эпизоотического процесса. Так, на основании лабораторного исследования проб с выделением специфических антител к ВГА субтипов H5 и РНК-генома этого вируса с высокой степенью вероятности мы можем, например, предположить, что резкое и значительное сокращение (в 3 и более раз) ворон, произошедшее в 2008 и 2009 гг., в выделенных очагах, также является следствием эпизоотии. В эти годы, напряжение эпизоотической обстановки по времени совпадало с вылетом молодняка, когда процент реагирующих достигал максимальных значений.

За период 2006 – 2011 гг. антитела к гемагглютиниnam подтипа H5, H7 обнаружены в 484 пробах, а РНК ВГА выделена в 167 положительных пробах на территории 18 районов Красноярского края, двух районов республик Хакасии и Тывы (рис. 2). На основе данных о пространственно-временном распределении положительных проб, межгодовой

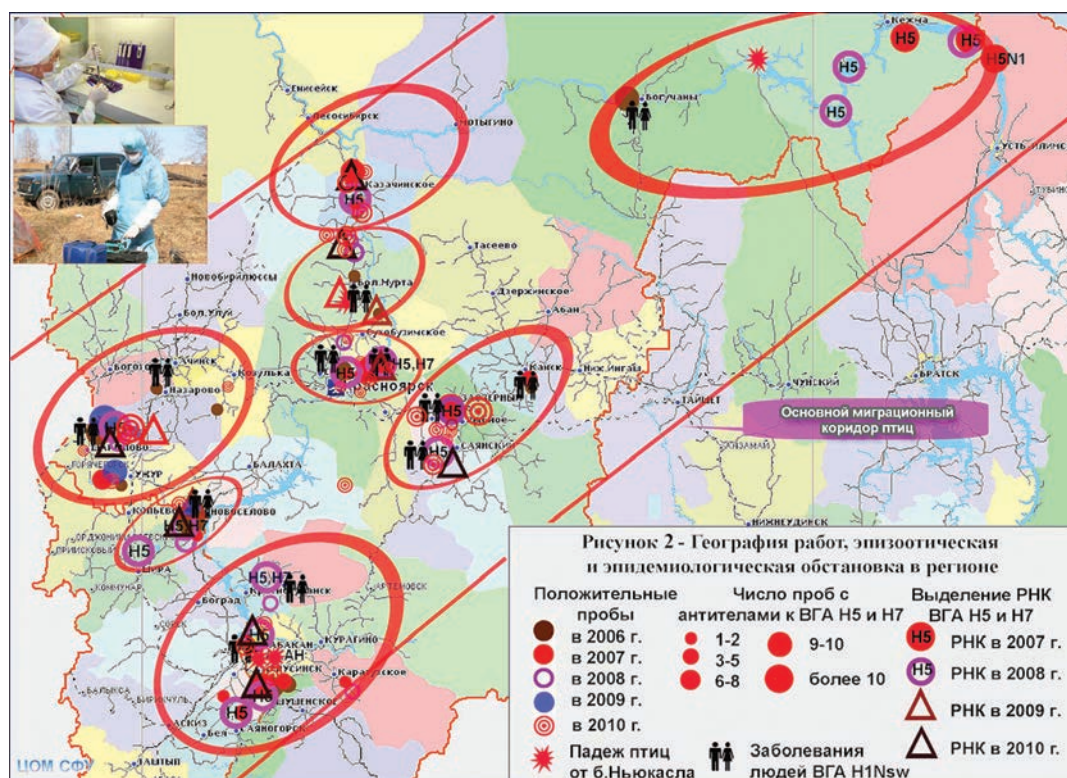


Рис. 2. Основной миграционный коридор птиц и очаги гриппа А на территории Красноярского края.

повторяемости их выделения, в том числе на одних и тех же участках в гнездовой период, учетным материалам, отражающим реальную временную ситуацию в местах концентраций птиц, нами было выделено 8 предполагаемых природных очагов ВГА (рис. 2).

Места выделения положительных проб к ВГА-субтипов H5 и H7, как и болезни Ньюкасла четко укладываются в миграционный коридор и совпадают с генеральным курсом пролета основной массы водоплавающих птиц: ЮЗ-СВ — весной и обратно осенью. Расчетный фронт пролета инфицированных птиц на территории Красноярского края, по нашей оценке, составляет не менее 515 км.

Следует отметить, что превышение эпидемиологического порога при заболевании людей гриппом субтипа H1N_{sw} в Красноярском крае в 2010 г. наблюдалось в 7 из 8 ранее выделенных нами очагах (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирусы гриппа А широко распространены и в биоценозах юга Центральной Сибири, что свидетельствует о возможности появления в любой момент высокопатогенных вариантов вирусов гриппа и опасности их вовлечения в эпизоотический и эпидемический процессы. Рассредоточение птиц по обширной территории и отсутствие домашней птицы на северных территориях сдерживает развитие эпизоотии, но не исключает ее. Полученные данные еще раз подтверждают высказываемые ранее опасения о высокой вероятности развития эпизоотии в регионе и необходимости систематического выполнения всего комплекса профилактических мер, включая иммунологический анализ

проб, позволяющий на ранней стадии диагностики оказывать превентивные воздействия, контролировать развитие ситуации.

Можно согласиться с тем, что напряжение по гриппу птиц в мире ослабевает, но прогноз ситуации требует постоянного присутствия специалистов в зонах предполагаемого риска и слежения за ее развитием. Как сказал в интервью РИА Новости старший координатор системы ООН по вопросам птичьего и человеческого гриппа Дэвид Набарро: «Новая пандемия гриппа, подобная той, что в начале XX века унесла жизни десятков миллионов людей, обязательно однажды разразится, но никто не знает, когда и где это случится».

Территориальные связи птиц, обитающих на юге Центральной Сибири и Байкальского региона, формирующиеся в процессе миграций, весьма обширны, проведение исследований на этих территориях имеет большое научно-практическое значение и, бесспорно, является актуальным. Здесь сходятся миграционные потоки птиц, зимующих в различных регионах мира — в Европе и Африке, на Ближнем Востоке и в Средней Азии, в Юго-Восточной Азии и Японии. Очевидно, что именно этим определяются значительные качественные и количественные изменения в эпизоотологическом процессе, когда происходит смена не только основного возбудителя ВГА по антигенной формуле, но и его исчезновение или появление отдельных новых видов вирусов, циркулирующих среди птиц.

Имеются все предпосылки для заноса возбудителей в Красноярский край из Иркутской области, так и в обратном направлении. Более того,

анализ путей миграции перелетных птиц показал, что сезонные перемещения птиц могут привести к распространению патогенных вирусов гриппа по всей территории России, поскольку птицы, мигрирующие в европейскую часть России, и птицы, населяющие районы Сибири, имеют общие зоны зимовки. Эти обстоятельства являются основной причиной необходимости и актуальности мониторинговых исследований по проблеме экологии этих вирусов.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 09-04-98039) и Правительства Красноярского края (грант № 1/2010-10097 от 16.04.2010 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирус гриппа А и его циркуляция среди птиц юга Восточно-Сибирского региона / Е.А. Чапоргина [и др.] // Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии: материалы II междунар. научн. конф. — Улан-Удэ: Изд-во Бурятского научн. Центра СО РАН, 2011. — Т. 2. — С. 110–112.
2. Горин О.З. Современные особенности эпидемиологии арбовирусных инфекций, экологии арбовирусов и вирусов гриппа в природных биоценозах юга Восточной Сибири: дис. ... д-ра мед. наук / О.З. Горин. — М., 1994. — 67 с.
3. Данчинова Г.А., Пыжьянов С.В. Оценка орнитологической обстановки в зоне формирования водохранилища Богучанской ГЭС (в приграничной зоне Красноярского края и Иркутской области) для снижения ущерба и потерь от вероятного заноса гриппа птиц: отчет по НИР. — Красноярск, 2007. — 31 с.
4. Данчинова Г.А., Пыжьянов С.В. Оценка орнитологической обстановки в зоне формирования водохранилища Богучанской ГЭС (в приграничной зоне Красноярского края и Иркутской области) для снижения ущерба и потерь от вероятного заноса гриппа птиц: отчет по НИР. — Красноярск, 2008. — 29 с.
5. Изучение высокопатогенного H5N1 вируса гриппа, выделенного от больных и погибших птиц в Западной Сибири / Г.Г. Онищенко [и др.] // Журнал общей микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2006. — № 5. — С. 47–54.
6. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Распространение высоковирулентного вируса гриппа А субтипа H5N1 на территории Северной Евразии: данные 2008 г. // Проблемы совершенствования межгосударственного взаимодействия в подготовке к пандемии гриппа: материалы междунар. научно-практической конф. — Новосибирск: ЦЭРИС. 2008. — С. 39–41.
7. Об утверждении правил по борьбе с гриппом птиц // Приказ Минсельхоза РФ № 90 от 27.03.2006 г. — <http://www.mcx.ru/documents/document/show/17439.156.htm>.
8. Разнообразие вирусов гриппа у диких птиц Прибайкалья / Е.А. Чапоргина [и др.] // Биоразнообразие экосистем внутренней Азии: тезисы Всерос. конф. с междунар. участ., 5–10 сентября 2006 г., г. Улан-Удэ. — Улан-Удэ, 2006. — Т. 1. — С. 193–194.
9. Результаты изучения циркуляции вируса гриппа А среди птиц на юге Восточной Сибири / Чапоргина Е.А. [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2007. — № 3 (55). — С. 184–187.
10. Савченко А.П. Миграции наземных позвоночных Центральной Сибири и проблемы экологической безопасности: автореф. дис. ... докт. биол. наук / А.П. Савченко. — Улан-Удэ, 2009. — 49 с.
11. Савченко А.П. Орнитологический мониторинг как система раннего предупреждения распространения гриппа птиц (H5N1) на территории Красноярского края // Вестн. Краснояр. гос. ун-та. Экология. — 2006. — № 5/1. — С. 55–66.
12. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии (2005–2009 гг.): автореф. дис. ... докт. биол. наук / М.Ю. Щелканов. — Москва, 2010. — 53 с.
13. Эволюция вируса гриппа H5N1 в природных биоценозах Северной Евразии: глобальные последствия / Д.К. Львов [и др.] // IV междунар. конгресс по птицеводству, Москва 8–11 апреля 2008 г. — М., 2008. — С. 87–92.

Сведения об авторах

Савченко Александр Петрович — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041 г. Красноярск, проспект Свободный, д. 81 «Г», кв. 60)

Емельянов Владимир Иванович — кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ)

Савченко Петр Александрович — аспирант кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ)

Андреев Сергей Олегович — ассистент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ)

Савченко Игорь Александрович — кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660062, г. Красноярск, ул. Тютмина, д. 8 «Г», кв. 16)

Карпова Наталья Валерьевна — кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», (660041, г. Красноярск, проспект Свободный 50 «А», кв. 8)

Темерова Виктория Леонидовна — аспирант кафедры прикладной экологии и ресурсосведения Института экономики, управления и природопользования ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» (660041, г. Красноярск, проспект Свободный, 79, ИЭУиП СФУ).

С.Г. Сайфутдинова^{1,2}, К.А. Шаршов¹, Ю.Н. Герасимов³, А.М. Шестопалов¹

ЭКОЛОГИЯ ВИРУСА ГРИППА У ЧАЕК ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область)

² Новосибирский государственный университет (Новосибирск)

³ Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН (Петропавловск-Камчатский)

Было проведено исследование, направленное на изучение роли птиц сем. Чайковые в распространении вируса гриппа типа А. В ходе выполненной работы был проведен сбор полевого материала от диких птиц на территории Дальнего Востока. Было выделено 14 изолятов вируса гриппа типа А четырех различных субтипов. Что подтверждает роль чаек как природного резервуара для вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус гриппа, чайки, Дальний Восток России

ECOLOGY OF INFLUENZA A VIRUSES, ISOLATED FROM GULLS OF THE RUSSIAN FAR EAST

S.G. Sayfutdinova^{1,2}, K.A. Sharshov¹, Yu. N. Gerasimov³, A.M. Shestopalov¹

¹ Federal State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk

² Novosibirsk State University, Novosibirsk

³ Kamchatka Branch of Pacific Institute of Geography, Far Eastern Branch of RAS, Petropavlovsk-Kamchatskiy

During this research huge surveillance study, the role of Gulls as the nature host of influenza A viruses was established. Oral and cloacal samples from Gulls were collected on the territory of the Russian Far East. Fourteen influenza A viruses were isolated.

Key words: Influenza viruses, gulls, Russian Far East

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа типа А относят к одним из самых значимых возбудителей инфекционных болезней. Появление высоко патогенных субтипов вируса в популяции домашних птиц и возрастающее количество зарегистрированных случаев прямой передачи возбудителей птичьего гриппа человеку ставят проблему новой пандемии [7]. Основные эпидемии гриппа прошлого столетия были вызваны вирусами, произошедшими непосредственно от птичьих путем реассортации между вирусами гриппа птиц и людей или точечных мутаций.

Вирус птичьего гриппа, как правило, не вызывает болезни у диких птиц, однако среди домашних может стать причиной тяжелых заболеваний и гибели [2].

Отсутствие вирулентности у вирусов гриппа, выделенных у околотоводных и водоплавающих птиц, может являться результатом адаптации к данному хозяину на протяжении длительного времени [4], поэтому в природе имеется резервуар, обеспечивающий постоянное существование вируса гриппа. Основным первичным резервуаром вирусов гриппа являются перелетные птицы, относящиеся к отрядам *Anseriformes* (гусеобразные) и *Charadriiformes* (ржанкообразные) [2].

Крупномасштабные работы по мониторингу за ВГП (вирус гриппа птиц) на территории России начались после регистрации первой вспышки высокопатогенного H5N1 в Новосибирской области [5].

Несмотря на то, что вирус гриппа H5N1 был выявлен у целого ряда свободноживущих диких птиц (более 75 видов, принадлежащих к 10 различным отрядам) чаще всего он выявляется именно у водоплавающих и околотоводных видов. Около 60 % диких видов, инфицированных вирусом H5N1, экологически связаны с водно-болотными угодьями. К тому же именно среди представителей этой экологической группы диких птиц зафиксирована большая часть случаев смертности.

Семейство, в состав которого входят чайки (семейство Чайковые, Laridae), — одно из многих, на которые подразделяется отряд Ржанкообразных. В отдельные сезоны вирусы низкопатогенного варианта гриппа нередко обнаруживают среди многих представителей этого отряда, включая и, собственно, чаек. Вирус H5N1 был изолирован от шести видов чаек, два из которых, буроголовая чайка и черноголовый хохотун, в 2006 г. стали жертвами первой вспышки этого заболевания среди диких птиц в Китае.

Поэтому получение новой информации по мониторингу за вирусами гриппа у птиц сем. Чайковых позволяет объяснить уже имеющиеся научные данные и также сопоставить их с экологией этого семейства для получения более четкой картины о распространении и циркуляции ВГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала производился в рамках ежегодного мониторинга за вирусами гриппа на территории Дальнего Востока с 2007 года.

Материал собирался в виде клоакальных смывов или фекальных масс, согласно (рекомендация ВОЗ). Собранные образцы до начала использования хранили в жидком азоте или в низкотемпературных холодильниках. Изоляцию вирусов производили инфицированием 10-дневных куриных эмбрионов, путем трех последовательных пассажей.

Выделение вируса производили описанными методиками [5]. Идентификация и типирование вируса гриппа осуществлялись серологическими методами: постановка реакции гемагглютинации и торможения гемагглютинации. Полученные пробы в дальнейшем исследовались молекулярно-биологическими методами (полимеразно-цепная реакция и расшифровка первичной нуклеотидной последовательности генов гемагглютинина и нейраминидазы) [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Большую часть территории Дальнего Востока занимают прибрежные районы, которые являются излюбленным местом для гнездовья и паломничества различных видов птиц семейства Чайковые. В целом, видовое разнообразие птиц на территории полуострова Камчатка, острова Сахалин и Курильских островов является очень схожим. По многолетним данным орнитологов [3] здесь обитают 25 видов чаек и крачек, наиболее характерными и многочисленными являются виды Бургомистрн, Тихоокеанская чайка, Сизая чайка, Моевка, Речная и Камчатские крачки.

В ходе данного исследования в 2007 – 2010 гг. было собрано 6 534 пробы от девяти видов чаек, которые представляют основную орнитофауну исследуемого региона. Сбор материала производился в четырех различных регионах (Амурский

регион, о. Сахалин, п-ов Камчатка, Курильские о-ва). Результаты представлены в таблице 1.

Из собранного первичного материала нами было выделено 14 изолятов вируса гриппа типа А, при их дальнейшем субтипировании были выявлены следующие субтипы H6N1, H11N8, H13N2, H13N6.

Наибольшее количество вирусов было выделено от Тихоокеанских чаек, это объясняется тем, что от этого вида птиц было собрано больше всего материала.

По информации, которая содержится в базах данных GIAID и IFR от чаек было выделено 50 различных субтипов вируса гриппа типа А. При этом базы данных содержат генетические последовательности всего 259 изолятов, выделенных от чаек, информация о субтипе H11N8 отсутствует, на территории России этот субтип был выделен в 2008 году в рамках мониторинга за ВГП [1].

Общий процент выделения за все годы исследования составил 0,21 %, что в сравнении с литературными данными является очень низким. Возможной причиной может служить недостаточно совершенные методы культивирования и идентификации ВГА из первичного материала от диких чаек.

Проведенные нами исследования подтвердили важность птиц сем. Чайковые как основных носителей вируса гриппа типа А, а также показали важность дальнейшего изучения этой экологической группы птиц в рамках программы мониторинга за вирусами гриппа.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке веду-

Таблица 1
Количество проб, собранных от разных видов чаек на территории Дальнего Востока в 2007–2010 гг.

Вид	2007			2008			2009					2010			
	Камчатка	Курильские о-ва	Амурский регион	Камчатка	Курильские о-ва	Сахалин	Камчатка	Курильские о-ва	Амурский регион	Сахалин	Приморский край	Камчатка	Сахалин	Амурский регион	
<i>Larus canus</i>	83	–	–	81	2	51	617	3	1	–	1	10	–	72	921
<i>Larus hyperboreus</i>	2	–	–	–	–	–	–	–	11	–	–	–	–	–	13
<i>Larus ridibundus</i>	83	–	–	28	–	10	250	–	27	–	430	130	–	59	1017
<i>Larus schistisagus</i>	276	2	–	363	316	85	274	396	16	849	1	338	255	–	3171
<i>Larus argentatus</i>	–	–	1	–	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3
<i>Larus crassirostris</i>	–	–	–	–	87	–	–	347	–	11	323	–	9	5	782
<i>Larus glaucescens</i>	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
<i>Rissa tridactyla</i>	–	–	–	–	14	193	24	45	–	102	–	10	–	–	388
<i>Laridae sv</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	224	–	–	–	–	14	238
Всего	444	2	1	472	422	339	1165	791	279	962	755	488	264	150	6534

Таблица 2

Субтипы выделенных вирусов гриппа типа А не территории Дальнего Востока

Название вируса	Субтип	Место выделения	Вид птицы
A/slaty-backed gull/Kamchatka/121/2007(H6N1)	H6N1	2007 Камчатская обл., Усть-Большерецкий р-н, устье р. Большой	Тихоокеанская чайка
A/mew gull/Kamchatka/131/2008(H11N8)	H11N8	2008 Камчатская обл., Усть-Большерецкий р-н, устье р. Большой	Сизая чайка
A/slaty-backed gull/Russia/521/2008(H13N6)	H13N6	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gull/Russia/523/2008(H10N6)	H10N6	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gull/Russia/522/2008(H11N8)	H11N8	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gull/Russia/528/2008(H11N8)	H11N8	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gull/Russia/530/2008(H11N8)	H11N8	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gull/Russia/596/2008(H11N8)	H11N8	2008 Камчатская обл, Петропавловск-Камчатский, берег Авачинской бухты	Тихоокеанская чайка
A/ Laridae /Khabarovsk/874/2009(H13N6)	H13N2	2009 Хабаровский край, Хинганский заповедник, Бухта Счастья,	Сем. Чайковые
A/slaty-backed gul/ Sakhalin/144/2010/H13N6	H13N6	2010 Сахалин, оз. Надежда	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gul/ Sakhalin/136/2010	H13N6	2010 Сахалин, оз. Надежда	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gul/ Sakhalin/158/2010/H6	H6N1	2010 Сахалин, оз. Надежда	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gul/ Sakhalin/112/2010/H13N6	H13N6	2010 Сахалин, Стародубское	Тихоокеанская чайка
A/slaty-backed gul/ Sakhalin/159/2010/H13N6	H13N6	2010 Сахалин, Стародубское	Тихоокеанская чайка

щих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Генотипирование вируса гриппа типа А у диких птиц на территории Дальнего Востока / С.Г. Сайфутдинова [и др.] // Вестник НГУ (Серия: Биология, Клиническая медицина). — 2010. — Т. 8. — Вып. 2. — С. 25—29.
2. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // Microbiol Rev. — 1992. — N 56. — P.152—179.
3. Gerasimov Yu.N. Materials on waterfowl migration along southwest Kamchatka // The biology and

conservation of the birds of Kamchatka. — 2001. — Vol. 3. — P. 86—95.

4. Global patterns of Influenza A virus in wild birds / B. Olsen [et al.] // Science. — 2006. — N 312. — P. 384—388.
5. H5N1 influenza virus, domestic birds, Western Siberia, Russia / A.M. Shestopalov [et al.] // Emerg. Inf. Dis. — 2006. — Vol. 12, N 7. — P. 1167—1169.
6. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann [et al.] // Arch Virol. — 2001. — Vol. 146 (12). — P. 2275—2289.
7. World Health Organization. Manual on fnimal influenza diagnosis and surveillance. — Harbin, 2002.

Сведения об авторах

Сайфутдинова Софья Гумаровна — аспирант, младший научный сотрудник (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», e-mail: sayfutdinovas@hotmail.com)
Шаршов Кирилл Александрович — к.б.н., заведующий лабораторией
Герасимов Юрий Николаевич — к.б.н.
Шестопалов Александр Михайлович — д.б.н., заведующий отделом

М.В. Сивай^{1, 2}, А.К. Юрлов³, А.В. Друзяка³, К.А. Шаршов², А.М. Шестопапов²

УНИКАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА ГРИППА У ПТИЦ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово)² Новосибирский государственный университет (Новосибирск)³ Институт систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск)

В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории России в 2008 году был выделен уникальный штамм вируса A/teal/Chany/7119/2008 H15N4 субтипа. Ранее все вирусы субтипа H15 были выделены только на территории Австралии в 1979 и 1983 гг. Был проведен генетический и антигенный анализ данного штамма, в ходе которого были показаны антигенные отличия исследуемого вируса и референс-штамма A/shearwater/ Australia/2376/1979. Результаты проведенного исследования указывают на необходимость проведения дальнейших мониторинговых работ за вирусом гриппа птиц с целью изучения вновь возникающих вариантов вируса, генетического разнообразия патогена, его эволюции и экологии.

Ключевые слова: вирус гриппа, птицы, Сибирь

RARE INFLUENZA VIRUS SUBTYPES ISOLATED FROM BIRDS OF THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA

M.V. Sivay^{1, 2}, A.K. Yurlov³, A.V. Druzyaka³, K.A. Sharshov¹, A.M. Shestopalov¹¹ FBRI State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo² Novosibirsk State University, Novosibirsk³ Institute of Animals' systematic and ecology SB RAS, Novosibirsk

During avian influenza virus (AIV) surveillance in Russia, 2008, H15N4 subtype of the virus was isolated. All the H15 viruses had been previously isolated in Australia in 1979 and 1983. This is the first report about isolation of AIV H15 subtype elsewhere. Genetic and antigenic analyses were made. The significant antigenic differences between A/teal/Chany/7119/2008 strain and reference strain A/shearwater/ Australia/2376/1979 were revealed. The results of this study show the necessity of monitoring for avian influenza viruses, study of pathogen genetic variability, evolution and ecology.

Key words: Avian Influenza, Russia, rare subtypes

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae*. Геном вируса представлен одноцепочечной молекулой РНК и сегментирован. Вирусы подразделяются на субтипы на основании двух поверхностных гликопротеидов — гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА) [9]. Всего в настоящий момент выделяют 17 субтипов НА и 10 субтипов НА [4, 13]. Природным резервуаром вируса являются дикие водоплавающие птицы отрядов Гусеобразные и Ржанкообразные, однако вирус был обнаружен у людей и других млекопитающих [9].

Существует несколько классификаций вируса гриппа, которые основаны на генетических особенностях вирусов, а также территории и времени выделения вируса. Однако все вирусы гриппа разделяются на две генетически линии — Американскую и Евроазиатскую, исходя из района выделения вируса (Западного или Восточного полушария соответственно) [13]. Новые НА — НА комбинации вируса гриппа А возникают путем реассортации между различными штаммами вируса, выделенными от птиц, людей и свиней [8]. Большинство низкопатогенных вирусов гриппа птиц (НПГП) циркулируют среди водоплавающих птиц. Однако непосредственный контакт диких и домашних птиц в некоторых районах создает благоприятные условия для трансмиссии данных патогенов и вызывает риск образования высоко-

патогенных вариантов вируса (ВППП), способных вызывать новые пандемии и эпизоотии [10].

Территории Западной Сибири играют важную роль в циркуляции вирусов гриппа птиц. Существуют данные о выделении в регионе различных субтипов вируса [1, 14], в том числе и вирусов ВППП H5N1 субтипа [6]. Территорию юга Западной Сибири пересекает три миграционных пути перелетных птиц — Центрально-азиатский, Восточноафриканский — Западно-азиатский и Восточно-азиатский — Австралийский. Пересечение миграционных путей способствует «перемешиванию» на одной территории популяций птиц Европы, Африки, Азии и Океании. Таким образом, изучение генетического разнообразия вируса гриппа птиц на территории юга Западной Сибири позволит получить уникальную информацию о разнообразии патогенна, его эволюции.

В мае — сентябре 2008 года в ходе мониторинговых исследований вируса гриппа А у диких птиц юга Западной Сибири был выделен вирус НПГП H15N4 субтипа (A/teal/Chany/7119/2008). Вирус был выделен от птицы вида чирок-свистунок (*Anas crecca*), семейство Утиные. ВПП H15 субтипа относятся к редким субтипам [8]. Всего в международных базах данных GenBank, GISAID и Flu Database имеется информация о шести штаммах

данного субтипа гена НА, все из которых были выделены на территории Австралии в 1979 и 1983 годах. Данные о выделении вируса гриппа с субтипом H15 где-либо еще отсутствуют. Первое упоминание о ВГП H15 субтипа было сделано коллективом авторов во главе с С. Роухм. В работе авторов было показано что аминокислотная последовательность субъединицы белка НА-H15 НА1 имеет наибольшую гомологию с аналогичной субъединицей белка НА-H7 и составляет 67,5 – 71,3 %. Филогенетический анализ данных субтипов гена НА показал, что субтип H15 является отдельной генетической линией субтипа H7 [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Чирок-свиистунок был убит охотниками во время осеннего сезона охоты на водно-болотную дичь на территории Чановской озерной системы (Новосибирская область) в августе 2008 года. Клоакальный смыв от птицы был собран с помощью стерильного ватного тампона и помещен в стерильную пробирку, содержащую транспортную среду [16]. Изоляция вируса производилась путем введения первичного биологического материала в аллантоисную полость 10-дневных SPF (specific pathogen free) развивающихся куриных эмбрионов. Наличие вируса в аллантоисной жидкости определялось реакцией гемагглютинации (РГА) и полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени, с использованием технологии Taqman [14]. Выделение вирусной РНК осуществлялось с использованием коммерческого набора SV Total RNA Isolation Kit (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Субтипирование вируса осуществлялось с использованием универсальных праймеров на гены НА и NA [10]. Для индикации результатов амплификации проводили электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР в 1,5 % агарозном геле в 1хТАЕ буфере. ДНК визуализировали после окраски бромистым этидием (Sigma, США) при освещении УФ-светом. Длина фрагментов продуктов реакции определялась в сравнении с используемым ДНК- маркером (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas, Литва). Элюция фрагментов ДНК из агарозного геля производилась коммерческим набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Постановка секвенирующей реакции осуществлялась коммерческим набором BigDye Terminator 3.1v Cycler (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя в трех независимых повторностях. В дальнейшем производилась очистка секвенирующей реакции коммерческим набором BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystem, США) согласно протоколу производителя.

Определение первичных последовательностей осуществлялось на автоматическом анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, США) согласно инструкции производителя.

Патогенность исследуемого штамма определялась на четырех недельных SPF цыплятах

породы Леггорн путем внутривенного введения вирусосодержащей аллантоисной жидкости в объеме 0.2 мл ($10^{6.3}$ ЭИД₅₀). Зараженные цыплята наблюдались в течение 14 дней на проявление клинических признаков заболевания или смертность. Внутривенный индекс патогенности определялся согласно методике, опубликованной ранее [16].

Получение сыворотки против исследуемого штамма вируса осуществлялось на 4-недельных SPF цыплятах породы Леггорн путем внутривенного введения вирусосодержащей аллантоисной жидкости в объеме 2.5 мл ($10^{6.3}$ ЭИД₅₀). По истечению 21 дня у зараженных птиц тотально производился забор крови.

Антигенные свойства вируса были исследованы реакцией торможения гемагглютинации (РТГА) как было опубликовано ранее [16]. Постановка реакции осуществлялась с использованием антигенов и сывороток штаммов A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) и A/shearwater/Australia/2376/1979.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе мониторинга вируса гриппа у диких птиц юга Западной Сибири в 2008 году нами был выделен штамм вируса A/teal/Chany/7119/2008 от птицы вида чирок-свиистунок. Вирус был выделен на развивающихся куриных эмбрионах. Наличие вируса в аллантоисной жидкости было подтверждено методами РГА (титр вируса составил $10^{6.3}$ ЭИД₅₀) и ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Субтип вируса был определен как H15N4, а полученная первичная последовательности гена НА подтвердила низкую патогенность вируса. Полученные первичные последовательности всех генов вируса были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами CY098537-CY098544.

Определение патогенности выделенного штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) производилось путем заражения 6-ти 4-недельных SPF цыплят породы Леггорн. Зараженные цыплята наблюдались в течение 14 дней на проявление клинических признаков заболевания или смертность. По истечению данного времени все зараженные птицы были клинически здоровы. Внутривенный индекс патогенности исследуемого штамма составил 0. Данные результат указывает на низкую патогенность штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4).

Нами были получены антигенные характеристики исследуемого штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4). Мы сравнили кросс-реактивность штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) и референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6) методом РТГА. Как показано в таблице 1, сыворотка против референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6) показывает высокую реактогенность с антигеном A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4). С другой стороны, сыворотка против штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) не указывает на кросс-реактивность с референс-штаммом. Тем не менее, сыворотка про-

Таблица 1

Результаты РТГА вирусов субтипа H15

Вирус	Сыворотка (ГАЕ/мл)	
	A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6)	A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4)
A/shearwater/Australia/2376/1979 (H15N6)	1280	≤10
A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4)	640	1280

тив исследуемого штамма A/teal/Chany/7119/2008 (H15N4) может быть использована для диагностики вновь выделяемых вирусов субтипа H15 методом РТГА. Также, результаты данного эксперимента указывают на антигенные отличия между вирусами.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе представлены результаты изучения генетических и антигенных свойств вновь выделенного штамма ПНГП A/teal/Chany/7119/2008 субтипа H15N4. Это первое сообщение о выделении вируса данного субтипа. Ранее вирусы субтипа H15 выделялись только не территории Австралии в 1979 и 1983 гг.

В ходе проведенного антигенного анализа были показаны отличия исследуемого вируса и референс-штамма A/shearwater/Australia/2376/1979. Это может свидетельствовать о том, что вновь выделенные вирус значительно генетически отличны от своих предшественников и могут быть использованы в методах субтипирования вирусов гриппа.

Отсутствие данных о выделении вирусов гриппа субтипа H15 может быть связано с недостаточными мониторинговыми исследованиями за вирусом или с несовершенством методов, используемых для субтипирования патогена. В некоторых научных работах существуют упоминания о вирусах, чей субтип так и не был определен [12]. Это и может свидетельствовать о том, что методы типирования вирусов гриппа нуждаются в доработке.

Чирок-свиистунок является одним из наиболее распространенных видов птиц отряда Гусеобразные на территории юга Западной Сибири. Местами зимовки является территория Западной Европы, Средиземноморья и Каспия. В ходе мониторинга вируса гриппа на территории России от птицы вида чирок-свиистунок были выделены различные штаммы патогенна [1, 2, 14].

Территория юга Западной Сибири располагается в центре Евразийского континента и пересекается тремя основными перелетными путями диких птиц, объединяя миграционные потоки птиц Европы, Африки, Азии и Океании. Особенности климата данной региона создают благоприятные условия для длительного сохранения вируса в почве и воде. Таким образом, территория юга Западной Сибири играет важную роль в персистенции вирусов гриппа птиц, их эволюции и географическом распространении [5, 14].

Результаты данного исследования указывают на необходимость дальнейшего мониторинга вирусов гриппа среди диких птиц, что позволит и в дальнейшем получать ценные данные о разнообразии вирусных субтипов, их эволюции и географическом распространении. Также необходимо усовершенствование методов идентификации и типирования патогена, которое должно быть построено на постоянно изменяющихся данных о генетике вируса гриппа.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и гранта по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анализ циркуляции вирусов гриппа типа А, выделенных на территории Чановской озерной системы / М.В. Сивай [и др.] // Вестник НГУ. — Серия: Биология, клиническая медицина. — 2010. — Т. 8., Вып. 2. — С. 25 — 28.
2. Комплексный эпизоотологический мониторинг вируса гриппа А на территории Сибири и Дальнего Востока: Методические рекомендации / В.Ю. Марченко [и др.]. — 2011.
3. A complete analysis of HA and NA genes of influenza A viruses / W. Shi [et al.] // PLoS One — 2010. — Vol. 5. — P. 14454.
4. A distinct lineage of influenza A virus from bats / S. Tong [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. — 2012. — Vol. 109. — P. 4269 — 4274.
5. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds / J. Veen [et al.] // Wetlands International. — 2005.
6. Characteristic of high pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 isolated from common gull (Larus canus) / K.A. Sharshov [et al.] // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. — 2010. — P. 29 — 32.
7. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes / C. Rohm [et al.] // Virology — 1996. — Vol. 217. — P. 508 — 516.
8. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001 / V. Gregory [et al.] // Virology. — 2002. — Vol. 300. — P. 1 — 7.
9. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster [et al.] // Microbiol. Rev. — 1992. — Vol. 56. — P. 152 — 179.

10. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico / M. Garcia [et al.] // J. Gen. Virol. — 1996. — 77 (Pt 7). — P. 1493–1504.

11. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange / S. Krauss [et al.] // PLoS Pathog. — 2007. — Vol. 3. — P. 67.

12. Influenza-a viruses in ducks in northwestern Minnesota: fine scale spatial and temporal variation in prevalence and subtype diversity / B.R. Wilcox [et al.] // PLoS One — 2011. — Vol. 6. — P. 24010.

13. Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus / S. Liu [et al.] // PLoS One — 2009. — Vol. 4 — P. 5022.

14. Surveillance of Influenza A Virus in Wild Birds in the Asian Part of Russia in 2008 / M.V. Sivay [et al.] // Avian Diseases. — 2012 (in press).

15. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses / E. Hoffmann [et al.] // Arch Virol. — 2001. — Vol. 146. — P. 2275–2289.

16. WHO. Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. World Health Organization. — China, Harbin, 2002.

Сведения об авторах

Сивай Мария Владимировна – аспирант, младший научный сотрудник (630559, Новосибирская область, р. п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», e-mail: sivaym@hotmail.ru)

Юрлов Александр Константинович – к.б.н., ведущий научный сотрудник

Друзяка Алексей Валерьевич – к.б.н., младший научный сотрудник

Шаршов Кирилл Александрович – к.б.н., заведующий лабораторией

Шестопалов Александр Михайлович – д.б.н., заведующий отделом

Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БИОПОЛИМЕРЫ И НАНОБИОКОМПОЗИТЫ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)*

Обсуждается новый оригинальный подход к самоорганизации гибридных нанобиоструктур, обладающих комплексом уникальных физико-химических и биологических свойств, крайне востребованных для неинвазивной диагностики и лечения в биомедицине.

Ключевые слова: гибридные нанобиокомпозиаты, диагностика, терапия

THE NANOSTRUCTURED MULTIPURPOSE BIOPOLYMERS AND NANOBIOCOMPOSITES ON THEIR BASIS FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY

B.G. Sukhov, B.A. Trofimov

Institute of chemistry of A.E. Favorskii SB RAS, Irkutsk

A novel original approach to self-organization of hybrid nanobioststructures possessing unique complex of physicochemical and biological properties (extremely demanded for noninvasive diagnosis and therapy) is discussed.

Key words: hybrid nanobiocomposites, diagnosis, therapy

В Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН реализован и в течение последнего десятилетия успешно развивается оригинальный подход к самоорганизации гибридных неорганог-органических наноструктур, обладающих комплексом уникальных физико-химических и биологических свойств [1 – 29]. Этот подход к направленному синтезу нанокомпозиатов многоцелевого биомедицинского назначения (для диагностики и терапии) основан на специфической адсорбции оригинальных природных и синтетических полимеров на поверхности растущих из раствора наноядер различных неорганических и органических материалов. Полученные таким образом агрегативно высокоустойчивые нанобиокомпозиаты представляют собой инкапсулированные в трехмерный полимерный экран наноразмерные ядра металлов, других химических элементов и их соединений, а также нанокристаллы органических фармаконов, и проявляют уникальный синергизм свойств оригинальных полимеров (водорастворимость, биосовместимость, оптическая активность, мембранотропность по отношению к живой клетке, иммуномодулирующие, гепатопротекторные и пролонгированные биологически активные свойства и др.) со специфическими физико-химическими, биологическими и фармакологическими свойствами наноразмерных ядер. Перечисленные свойства получаемых нанокомпозиатов можно закономерно комбинировать в широких пределах, получая материалы с необычным комплексом заданных физико-химических и разнообразных биологических свойств, необходимых для нового качественного уровня неинвазивной диагностики и лечения в биомедицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президентской Программой РФ для поддержки ведущих научных школ (грант НШ-1550.2012.3), Сибирским отделением РАН (партнерский ин-

тергационный проект СО РАН, УрО РАН и ДВО РАН № 1, междисциплинарные интеграционные проекты СО РАН №№ 85, 134, интеграционный проект СО РАН и Монгольской академии наук № 14), Президиумом РАН (проект Программы «Фундаментальные науки – медицине» № 5.42), РФФИ (грант 12-03-90433-Укр_а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Арабиногалактан – перспективная наноструктурированная трансмембранная матрица для иммобилизации лекарственных средств / Б.Г. Сухов [и др.] // Химический Журнал Казахстана. – 2007. – Вып. 7. – С. 125.
2. Влияние наночастиц серебра на термические характеристики нанокомпозиатов галактозосодержащих полисахаридов / Г.П. Александрова [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 439, № 2. – С. 198.
3. Кинетика формирования наночастиц золота в полисахаридной матрице галактоманнана / М.В. Лесничая [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 440, № 5. – С. 639.
4. Магнитная активность наноструктурированных биополимерных наноманетиков / Г.П. Александрова [и др.] // Известия РАН. Серия химическая. – 2010. – № 12. – С. 2261.
5. Механизм бактерицидного действия Ag(0)-нанобиокомпозиата: эволюция исходного композита и живой микробной клетки в новый нанокомпозит / И.А. Шурыгина [и др.] // Известия ВУЗов. Физика. – 2011. – Т. 54, № 2/2. – С. 285.
6. Нанодисперсное состояние металлов и их миграция в углеродистых природных средах / В.К. Немеров [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2009. – Т. 425, № 2. – С. 233.
7. Нанокомпозиаты Pd(0)-арабиногалактан как катализаторы димеризации ацетиленовых соедине-

ний / Б.А. Трофимов [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2007. — Т. 417, № 1. — С. 62.

8. Наноконпозиты благородных металлов на основе арабиногалактана: получение и строение / Б.Г. Сухов [и др.] // Журнал Структурной Химии. — 2007. — № 5. — С. 979.

9. Наноконпозиты с магнитными, оптически-ми, каталитическими и биологически активными свойствами на основе арабиногалактана / Б.А. Трофимов [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2003. — Т. 393, № 5. — С. 634.

10. Наноконпозиты серебра и поли-1-винил-1,2,4-триаэола / Мячина Г.Ф. [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2008. — Т. 420, № 3. — С. 344.

11. Наноконпозиты серебра и сополимера 1-винил-1,2,4-триаэола с натриевой солью метакриловой кислоты / Г.Ф. Мячина [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2009. — Т. 427, № 6. — С. 790.

12. Наноструктурированные сереброродержащие соединения на основе сульфатированного арабиногалактана, обладающие антимикробной и антитромботической активностью и способ их получения / Т.В. Ганенко [и др.] // Положительное решение о выдаче патента РФ. — 2012.

13. Наночастицы золота, стабилизированные водорастворимым биосовместимым поли-1-винил-1,2,4-триаэолом / Г.Ф. Мячина [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2010. — Т. 431, № 1. — С. 50.

14. Окислительно-восстановительные реакции арабиногалактана с ионами серебра и формирование наноконпозитов / Л.А. Грищенко [и др.] // Журнал Общей Химии. — 2006. — Т. 76, № 7. — С. 11—59.

15. Олон функционалт байгалийн полимерт суурилан м нг агуулан эрлийзжсэн наноконпозит нийлэгж лэх / Г. Долмаа [и др.] // Шинжлэх ухааны академийн мэдээ. — 2010. — № 3. — С. 15.

16. Особенности фазообразования и размерные эффекты наночастиц в наноконпозитах палладия / Л.П. Феоктистова [и др.] // Нанотехника. — 2009. — № 4. — С. 31.

17. Особенности формирования нанобиоконпозитов серебра и золота с антимикробной активностью / Г.П. Александрова [и др.] // Нанотехника. — 2010. — № 3 (23). — С. 34.

18. Особенности формирования наночастиц серебра в полимерной матрице / Г.Ф. Прозорова [и др.] // Доклады Академии Наук. — 2011. — Т. 437, № 1. — С. 50.

19. Сереброродержащие наноконпозиты на основе галактоманнана и каррагинана: синтез, строение, антимикробные свойства / М.В. Лесничая [и др.] // Известия РАН. Серия химическая. — 2010. — № 12. — С. 22—66.

20. Синтез и свойства наноконпозитов серебра и золота в матрице поли-1-винил-1,2,4-триаэола / Г.Ф. Мячина [и др.] // Журнал Структурной Химии. — 2010. — Т. 51. — С. 109.

21. Синтез наноразмерных частиц с магнитными свойствами для биомедицинских целей. / Г.П. Александрова [и др.] // Физическая мезомеханика. — 2004. — Т. 7. — С. 139.

22. Способ получения наноразмерных металлических и металлооксидных частиц / Г.П. Александрова [и др.] // Патент РФ № 2260500. — 2005.

23. Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана, обладающих антикоагулянтной и гиполипидемической активностью / Я.А. Костыро [и др.] // Патент РФ № 2319707. — 2008.

24. Средство, обладающее антимикробной активностью / Г.П. Александрова [и др.] // Патент РФ № 2278969. — 2006.

25. Структура и магнитные свойства нового инкапсулированного наномангнетика / Г.П. Александрова [и др.] // Нанотехника. — 2008. — № 3. — С. 11.

26. Трофимов Б.А., Сухов Б.Г. Наноконпозиты медицинского назначения на основе природных полимеров // В кн.: «Наука и нанотехнологии». Материалы научной сессии Президиума СО РАН. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2007. — С. 155.

27. A Theoretical and Experimental Study of NMR Contrasting Properties of Nanocomposites Based on Ferric Oxides Stabilized by Arabinogalactan Matrix / M.V. Petrova [et al.] // Applied Magnetic Resonance. — 2011. — Vol. 41. — P. 525.

28. Bactericidal action of Ag(0)- antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel non-living nanocomposite / I.A. Shurygina [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. — 2011. — Vol. 7. — P. 827.

29. Colloids of gold nanoparticles protected from aggregation with arabinogalactan. / E.R. Gasilova [et al.] // Macromolecular Symposia. — 2012. Accepted for press.

Сведения об авторах

Сухов Борис Геннадьевич — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

Трофимов Борис Александрович — доктор химических наук, профессор, академик РАН, директор Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН

С.Е. Ткачев¹, Н.Н. Ливанова^{1, 2}**РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВИДОТИПИРОВАНИЯ КЛЕЩЕЙ
IXODES PERSULCATUS И *IXODES PAVLOVSKYI***¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск)² Институт систематики и экологии животных (Новосибирск)

Определение вида клещей является важным в эпидемиологических и экологических исследованиях, однако не всегда возможно морфологически. В данной работе на основе последовательностей фрагмента гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы была сконструирована ПЦР-система для молекулярного видотипирования клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*, позволяющая специфически разделять эти два вида.

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, видотипирование

**THE DEVELOPMENT OF MOLECULAR SPECIES TYPING SYSTEM
FOR *IXODES PERSULCATUS* AND *IXODES PAVLOVSKYI* TICKS**S.E. Tkachiov¹, N.N. Livanova^{1, 2}¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk² Institute of Systematic and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk

Determination of ticks species is very important for epidemiology and ecology investigations but in some cases the morphological study couldn't be carried out. In this work the PCR system based on species-specific primers to cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene sequence was developed for molecular species typing of *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* ticks.

Key words: *Ixodes persulcatus*, *Ixodes pavlovskyi*, species-typing

Определение видов клещей — переносчиков разнообразных патогенов человека и животных, — имеет важное значение для эпидемиологических и экологических исследований в природных очагах. Однако в ряде случаев определение вида клеща морфологически является невозможным из-за отсутствия целого экземпляра с систематически значимыми признаками либо при проведении ретроспективного анализа образцов клещей, из которых с целью детекции патогенов молекулярно-генетическими методами были выделены нуклеиновые кислоты (генетический материал). Одним из подходов к решению этой проблемы может стать видотипирование клещей молекулярно-биологическими методами.

Ранее для клещей *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815) и *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), имеющих важное эпидемиологическое значение для территории Евразии, были предложены видоспецифичные системы ПЦР для типирования [3]. Для клещей *I. pavlovskyi* (Pomerantsev, 1946) в XX веке ареал на территории СССР был представлен двумя разобщенными частями, но исследования последних лет, проводимые в Западной Сибири, показали, что в начале XXI века в окрестностях г. Томска зарегистрирован устойчивый рост его обилия, а в окрестностях Новосибирского научно-го центра было показано устойчивое соопитание клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* при явной преобладании последнего [1, 2].

В настоящее время в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) для видов

клещей, найденных на территории Западной Сибири содержится ряд последовательностей, соответствующим различным локусам митохондриального и ядерного геномов. Одним из локусов, позволяющих проводить молекулярно-генетическое видотипирование, является ген цитохром с-оксидазы (цитохромоксидазы), кодирующий фермент класса оксидоредуктаз, который катализирует конечный этап переноса электронов на кислород в процессе окислительного фосфорилирования. Данный ген находится в геноме митохондрий клеток. Так как митохондриальная ДНК не является высококонсервативной и имеет высокую скорость мутирования, она является хорошим объектом для изучения филогении (эволюционного родства) живых организмов, а также видотипирования. В настоящее время в базе данных GenBank создан раздел GenBank: barcode (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi?tool=barcode>), содержащий информацию о последовательностях субъединицы I гена цитохромоксидазы, которые были выбраны как генетический «штрих-код» (barcode) для различных видов организмов.

Целью данной работы являлось конструирование ПЦР-системы для видотипирования клещей видов *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярными методами.

МЕТОДИКА**Выделение ДНК из клещей**

Выделение ДНК проводили из каждого клеща индивидуально. Для этого клеща замораживали, измельчали, помещали в полипропиленовую про-

бирку объемом 1,5 мл типа Eppendorf и проводили выделение с использованием коммерческих наборов «Проба НК» (ДНК-технология, Москва) в соответствии с инструкцией производителя.

Постановка ПЦР

Реакцию амплификации проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1х буфер для ПЦР (5х буфер для ПЦР — 0,335 М Трис-НСl pH 8,9, 88 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ MgCl₂, 0,05 % Tween 20, 25 % глицерин, 0,1 % крезоловый красный), 200 мкМ дНТФ, 0,5 мкМ праймеров, 2 ед. акт. Taq-ДНК полимеразы и 1 мкл выделенной ДНК. На поверхность смеси наслаивали минеральное масло. В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду. Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва). Протокол проведения ПЦР состоял из 35 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации (94 °С, 0,5 мин), стадию отжига (52 °С, 0,5 мин) и стадию элонгации (72 °С, 1 мин).

Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР

Детекция продуктов ПЦР проводилась методом гель-электрофореза в 1,0%-ном горизонтальном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл, в 1хTBE буфере (20х буфер TBE — 1 М Трис, 1 М Н₃ВО₃, 40 мМ ЭДТА, pH 8,0) при напряжении 5 В/см. Наличие полученных видоспецифичных ПЦР-фрагментов определялось визуально при УФ.

Определение нуклеотидных последовательностей и молекулярно-генетический анализ.

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ПЦР, соответствующих фрагментам генома ВКЭ, проводили с помощью наборов BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems, США) с применением автоматического анализатора ДНК модели ABI 310 (Applied Biosystems, США) в Центре секвенирования ДНК СО РАН. Поиск гомологии полученных нуклеотидных последовательностей с уже известными последовательностями фрагментов геномов клещей проводили с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время (по состоянию на начало июля 2012 г.), в базе данных GenBank содержатся 10 и 2 последовательности фрагментов гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы для клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, соответственно, и только по одной полноразмерной последовательности гена для каждого из этих видов клещей. Анализ последовательностей показал, что несмотря на внутривидовую вариабельность, внутри каждого из видов наблюдается высокая консервативность последовательности гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы (более 99 % гомологии), что позволило разработать видоспецифичные праймеры:

1) прямой родоспецифичный праймер:

Ixodes-F 5'- ACCTGATATAGCTTCCCTCG -3'

(соответствует позициям 1485 — 1505 н.о. в последовательности митохондриального генома *I. persulcatus* (Genbank AB073725);

2) обратные видоспецифичные праймеры:

для *I. persulcatus*:

Ipers-R 5'- TTgATTCTCTgTTggAACAgC -3' (соответствует позициям 2155-2174 н.о. митохондриального генома *I. persulcatus*)

для *I. pavlovskyi*:

Ipav-R 5'- TAATCCCCgTgggggACg -3' (соответствует позициям 2157-2173 н.о. митохондриального генома *I. persulcatus*)

С использованием сконструированных праймеров, методом ПЦР были исследовано 140 клещей видов *I. persulcatus* (91 экз.), *I. pavlovskyi* (41 экз.) и *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (8 экз.), собранных на территории Новосибирской области (в районе Новосибирского научного центра и Тогучинском районе), определенных морфологически. Было показано, что клещи *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* выявляются соответствующими видоспецифичными праймерами, в то время как клещи *D. reticulatus* используемой системой праймеров не выявляются (рис. 1). С целью подтверждения специфичности выявления видов клещей для ряда случайно выбранных положительных в ПЦР образцов было проведено секвенирование полученных ПЦР-фрагментов. Было показано, что последовательности, соответствующие образцам *I. persulcatus*, обладают более 99 % гомологии с последовательностями гена субъединицы 1 цитохром-оксидазы клещей *I. persulcatus*, собранными на территории о. Хоккайдо, Япония [4], и Внутренней Монголии, Китай (GenBank AB073725 и JF758629). Для образцов *I. pavlovskyi*, была показано, что их последовательности также обладают более 99 % гомологии с последовательностью, определенной ранее для клещей *I. pavlovskyi*, выделенных на территории о. Хоккайдо, Япония (номер в GenBank AB231669) [5].

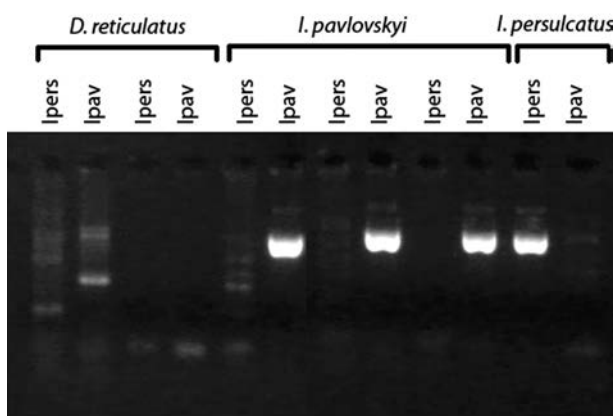


Рис. 1. Электрофоретическое выявление видоспецифичных продуктов ПЦР. *Ipers* и *Ipav* – дорожки со специфичными праймерами к видам *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi*, соответственно. Дорожки 1–4 – образцы *D. reticulatus*; 5–10 – образцы *I. pavlovskyi*; 11–12 – образцы *I. persulcatus*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была сконструирована ПЦР-система, позволяющая дифференцировать клещей *I. persulcatus* и *I. pavlovskyi* молекулярно-генетическими методами с высокой специфичностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ливанова Н.Н., Ливанов С.Г., Панов В.В. Особенности распределения клещей *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* на границе лесной и лесостепной зон Приобья // Паразитология. — 2011. — Т. 45, № 2. — С. 94—103.

2. Романенко В.Н., Чекалкина Н.Б. Видовой состав иксодовых клещей на территории г. Томска // Вестник Томского государственного университета. — 2004. — № 11. — С. 132—135.

3. Differentiation of Medically Important Euro-Asian Tick Species *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by Polymerase Chain Reaction / L. Rumer [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. — 2011. — Vol. 11, N 7. — P. 899—905.

4. Evolution of duplicate control regions in the mitochondrial genomes of metazoa: a case study with Australasian Ixodes ticks / R. Shao [et al.] // Mol. Biol. Evol. — 2005. — Vol. 22, N 3. — P. 620—629.

5. *Ixodes philipi* (Acari: Ixodidae): Phylogenetic Status Inferred From Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gene Sequence Comparison / H. Mitani [et al.] // J. Parasitol. — 2007. — Vol. 93, N 3. — P. 719—722.

Сведения об авторах

Ткачев Сергей Евгеньевич — м.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН (630090, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева, 8. Тел. (383) 363-51-37. E-mail: tkachev@niboch.nsc.ru)

Ливанова Наталья Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаборатории зоомониторинга ИСЭЖ СО РАН

А.С. Фомина, О.Е. Мазур, Н.М. Пронин

QUINQUESERIALIS QUINQUESERIALIS – СПЕЦИФИЧНЫЙ ПАРАЗИТ ОНДАТРЫ, И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ХОЗЯИНА

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)

В работе представлены результаты зараженности ондатры трематодой *Quinqueserialis quinqueserialis* в дельте реки Селенга. Установлено, что показатели зараженности ондатры в 2011 г. близки к данным экстенсивности и интенсивности инвазии 1981, 1982 гг. Исследование является первой попыткой оценить влияние зараженности на структуру и количество лейкоцитов крови зараженных ондатр в бассейне оз. Байкал.

Ключевые слова: *Quinqueserialis quinqueserialis*, Бурятия, ондатра, лейкоциты крови, индекс

QUINQUESERIALIS QUINQUESERIALIS – SPECIFIC PARASITE OF MUSKRAT, AND ITS INFLUENCE ON SOME HEMATOLOGIC PARAMETERS OF THE HOST

A.S. Fomina, O.E. Mazur, N.M. Pronin

Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

Data on infection of muskrat by trematoda species *Quinqueserialis quinqueserialis* in the Selenga River Delta are presented in this paper. The indexes of infection of muskrat by parasite in 2011 are similar to those in 1981 and 1982. The study is the first attempt to assess the influence of infestation on structure and quantity leukocytes of blood of infected muskrat in Lake Baikal basin.

Key words: *Quinqueserialis quinqueserialis*, Buryatia, muskrat, blood leukocytes, index

Квинквесириалез — гельминтозное заболевание ондатры, вызываемое трематодой *Quinqueserialis quinqueserialis* (Barker et Laughlin, 1911). История распространения этого зооноза связана с интродукцией ондатры в ряде регионов Российской Федерации [4]. В республике Бурятия в результате акклиматизационных работ, начатых в 1932 г., наиболее перспективным районом для развития ондатроводства стала дельта реки Селенги, где в настоящее время сосредоточена самая крупная популяция грызуна [3].

Воздействие *Q. quinqueserialis* на организм дефинитивных хозяев мало изучено. Известно, что квинквесириалез вызывает цитологические изменения, застойные явления и очаговую отечность в селезенке и печени зверька [1]. По мнению ряда авторов, трематода *Q. quinqueserialis* относится к числу наиболее патогенных паразитов для ондатры, способных вызывать эпизоотии и гибель животных [2].

Последние исследования, посвященные фауне гельминтов ондатры дельты р. Селенги, были завершены более 30 лет назад, а изучение влияния *Q. quinqueserialis* на организм ондатры вообще не проводилось. В связи с этим, актуальность углубленных исследований паразито-хозяйственных отношений в системе «*Q. quinqueserialis*-ондатра» и факторов вовлечения этих организмов в эпизоотический процесс квинквесириалеза, приобретает значимость, и особенно, в условиях интенсивного антрополического воздействия на речные экосистемы.

МЕТОДИКА

В основу работы положен анализ данных гельминтологических и гематологических исследова-

ний ондатры в дельте реки Селенги, 2011 г. (17.06-19.06.2011; 25.08-30.08.2011; 7.10 — 17.10.2011). Методом неполного гельминтологического вскрытия исследовано 69 особей разного пола и возраста. Ондатру добывали отстрелом из различных участков крупных проток (протоки Харауз, Мосалиха, Толстая ножка) южной части дельты р. Селенги. Все особи для паразитологического анализа были разделены на 3 возрастные группы: 1 года, 2-х и 3-х лет. В летней выборке число особей в возрасте 2-х лет составило 21 экз., в возрасте 3-х лет — 13 экз., в возрасте 1 года — 1 экз. В осенний период в представленной выборке наибольшее число особей отмечено в возрасте 1 года — 18 экз., а в возрасте 2-х и 3-х лет — 9 и 7 особей, соответственно.

Определение возраста ондатры проводили по методу Д.С. Цыганкова (1955), основанному на различиях в весе, длине тела зверьков и стертости зубов. Так как все отобранные ондатры были представлены половозрелыми особями, гематологический анализ был проведен на объединенной выборке, без учета сезона и возраста. Животные были распределены на 2 группы: 1-я — незараженные особи ($n = 6$), 2-я — зараженные с интенсивностью инвазии до 280 экз. Материалом для гематологического исследования служила цельная кровь, взятая из сердца в первые минуты после гибели животных. Общее количество и видовой состав лейкоцитов определяли по общепринятой методике. Мазки крови изготавливали на месте отбора, высушивали и фиксировали красителем Май-Грюнвальда с последующим окрашиванием раствором Романовского. Выраженность эндотоксикации и развитие патологического

процесса определяли по лейкоцитарному индексу интоксикации (отношение суммы плазматических клеток и всех гетерофилов к сумме лимфоцитов, моноцитов, базофилов и эозинофилов) и индексу гетерофильного сдвига (отношение суммы молодых гетерофилов к сумме более зрелых форм) [5]. В данной статье для отображения общего характера гематологических изменений используются качественные (сильная, средняя, слабая) величины в виде векторов направления того или иного признака.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи теста Манна – Уитни при уровне достоверности $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам гельминтологических исследований установлена зараженность трематодой *Q. quinqueserialis* ондатры всех возрастов, как в летний, так и осенний периоды. В целом, общая интенсивность инвазии в представленной выборке в летний период выше и составляет 45,6 экз., а в осенний – 35,6 экз. Экстенсивность инвазии, напротив, выше в осенний период и составляет $97,1 \pm 2,94 \%$, а в летний – $85,7 \pm 5,96 \%$. Увеличение экстенсивности инвазии *Q. quinqueserialis* в осенний период, вероятно, происходит в связи с максимальным накоплением инвазионных форм, включая промежуточных хозяев – моллюска *Anisus stroemi*. Анализ возрастной динамики зараженности ондатры показал, что наибольшая интенсивность инвазии регистрировалась у особей в возрасте 2-х лет (52,7 экз.), а наименьшая – у 3-летних особей (18,0 экз.). Зараженность годовиков достигала 33,2 экз. трематод. Средняя интенсивность инвазии за 2011 г. составила 40,4 экз. Сопоставление результатов по уровню зараженности ондатры *Q. quinqueserialis* в дельте реки Селенга за 2011 г. выявило совпадение наших значений с таковыми за 1981 и 1982 гг. [6]. Исследования архивных материалов показали, что период 1981 – 1982 гг. отмечен ростом уровня воды. Вероятно, высокая обводненность мелких водоемов и водотоков способствовала увеличению численности и распределения промежуточных хозяев трематоды – моллюска *Anisus stroemi* и сохранению инвазионного начала в дельте.

В ходе гематологических исследований было установлено, что в организме ондатры, зараженной *Q. quinqueserialis*, по сравнению с незараженными особями наблюдаются различной интенсивности патологические изменения изучаемых параметров (табл. 1).

Регистрируется снижение общего числа лейкоцитов крови, в основном за счет зрелых гетерофилов. Повышение числа незрелых форм гетерофилов и низкодифференцированных клеток, приводит к увеличению индекса гетерофильного сдвига, характеризующего течение воспалительного процесса в организме. Незначительное изменение в уровне агранулоцитов и лейкоцитарного индекса интоксикации на фоне

Таблица 1
Векторы направления гематологических изменений у ондатры, зараженной *Q. quinqueserialis*

Показатель	Векторы
Лейкоциты	↓↓
Лимфоциты	↑
Бласты	↑↑↑
Гетерофильные метамиелоциты	↑↑↑
Палочкоядерные гетерофилы	↓
Сегментоядерные гетерофилы	↓↓↓
Эозинофилы	↑
Базофилы	N
Моноциты	N
Лейкоцитарный индекс интоксикации	↓
Индекс гетерофильного сдвига	↑↑↑
Количество животных, экз.	48

Примечание: «↑» – увеличение признака; «↓» – уменьшение признака, «N» – нет изменений; изменения: «↑» – слабые; «↑↑» – средние; «↑↑↑» – сильные.

инвазии свидетельствует, вероятно, о слабой степени развития иммунопатологического процесса. Это вполне объяснимо, так как отношения между партнерами в давно сложившихся паразито-хозяинных системах относительно сбалансированы, и негативное влияние *Q. quinqueserialis* на организм облигатного хозяина, видимо, минимально. Вместе с тем, трематода, возможно, способна индуцировать разнообразные цитологические и цитогенетические трансформации. В клетках крови у зараженных *Q. quinqueserialis* особей ондатры наблюдаются такие патологии, как вакуолизация цитоплазмы, появление клеток с кариорексисом, приводящие к их гибели, и двуядерных лимфоцитов и бластов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные по зараженности ондатры трематодой *Q. quinqueserialis* указывают на стабильное существование паразитарной системы в дельте р. Селенга. По-видимому, существенное влияние оказывает на показатели зараженности ондатры гидрологический режим дельты р. Селенга.

Полученные первичные гематологические данные свидетельствуют о том, что трематода *Q. quinqueserialis* в природных условиях, вероятно, способна индуцировать в организме своего облигатного дефинитивного хозяина деструктивные цитологические и цитогенетические изменения и слабое развитие системных иммунопатологических процессов.

Работа выполнена в рамках программы НИР СО РАН, проект VI.43.1.3 и программы Президиума РАН «Живая природа России» (проект Р 30.11). Авторы выражают благодарность главному специалисту-эксперту А.В. Молчанову (Управление ветеринарии), заведующему В.И.

Елизову («Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов») и Д.Н. Никонову («Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов») за помощь в получении материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патоморфологические изменения некоторых органов ондатры при паразитировании трематоды *Quingueserialis quingueserialis* (Trematoda: Notocotylidae) в Бурятии / А.Б. Батуева [и др.] // Гельминтология сегодня: проблемы и перспективы. Тез. докл. науч. конф., Москва, 4–6 апр. 1989 г. — М., 1989. — Т. 1. — С. 40–49.

2. Максимов А.А. Болезни и их распространение в популяции ондатры // В кн. Эпизоотии

в популяциях ондатры в СССР. — Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1975. — С. 10–68.

3. Носков В.Т. Охотничьи животные Бурятии / В.Т. Носков. — Улан-Удэ: Изд-во БГУ, 2001. — 146 с.

4. Ондатра: Морфология, систематика, экология / Отв. ред. В.Е. Соколов, Н.П. Лавров. — М.: Наука, 1993. — 542 с.

5. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский [и др.] // Клин. лаб. диагностика. — 2006. — № 6. — С. 50–53.

6. Динамика зараженности животных гельминтами / Н.М. Пронин [и др.] / Отв.ред. В.Ж. Цыренов; АН СССР. Сиб. отд-ние Бурят. науч. центр. Ин-т биологии. — Улан-Удэ, 1991. — 201 с.

Сведения об авторах

Фомина Анастасия Сергеевна – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, факс: 8 (3012) 43-30-34; e-mail: anafoma@mail.ru)

Мазур Ольга Евгеньевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-42-29, 8 (9021) 607952, факс: 8 (3012) 43-30-34; e-mail: olmaz33@yandex.ru)

Пронин Николай Мартемьянович – д.б.н., зав. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: 8 (3012) 43-02-18, факс: 8 (3012) 43-30-34; e-mail: proninnm@yandex.ru)

М.А. Хаснатинов ², С. Хавликова ⁵, Э. Таплин ³, М. Казимирова ⁴, Н. Гунавардане ¹, М. Словак ⁴,
Б. Клемпа ⁵, И.М. Джоунс ¹, М. Лабуда ⁵, Э.А. Гоулд ⁶, Т.С. Грицун ¹

РОЛЬ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ НЕВИРЕМИЧЕСКОЙ ТРАНСМИССИИ ВИРУСА МЕЖДУ КЛЕЩАМИ

¹ Школа биологических наук, Редингский Университет (Рединг, Великобритания)

² Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)

³ Школа естественных наук, Уорикский университет (Ковентри, Великобритания)

⁴ Институт Зоологии (Братислава, Словакия)

⁵ Институт вирусологии (Братислава, Словакия)

⁶ Кафедра вирусологии политехнического университета (Марсель, Франция)

В настоящее время выделяют 3 субтипа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ, род *Flavivirus*, сем. *Flaviviridae*): Западно-Европейский (ассоциирован с клещом *I. ricinus*), Сибирский и Дальневосточный (ассоциированы с таежным клещом *I. persulcatus*). Одним из основных путей циркуляции ВКЭ в природе является невинермическая трансмиссия вируса между зараженными и незараженными клещами во время совместного питания на одном прокормителе. Ранее было обнаружено, что эффективность невинермической трансмиссии между клещами *I. ricinus* типового штамма Западно-Европейского субтипа «Hypr» (Hypr) составляет 60 %, в то время как для типового штамма Сибирского субтипа «Васильченко» (Vs) — только 5 %. Для установления вирусных детерминант, определяющих эффективность трансмиссии мы создали ряд рекомбинантных вирусов с взаимозаменяемыми генами структурных (str) и неструктурных (ns) белков. Рекомбинантный вирус Hypr[str]Vs[ns] обладал 70 % эффективностью невинермической трансмиссии. Введение отдельных структурных генов штамма Hypr в инфекционный клон Vs также увеличивало эффективность трансмиссии до 33 %. Таким образом, нами показано, что эффективность невинермической трансмиссии ВКЭ определяется, прежде всего, свойствами структурных белков вируса.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, трансмиссия, рекомбинантный вирус

THE ROLE OF THE STRUCTURAL PROTEINS IN THE NON-VIRAEMIC TRANSMISSION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

М.А. Khasnatinov ², Sabina Havlikova ⁵, Andrew Tuplin ³, Maria Kazimirova ⁴,
Niluka Goonavardane ¹, Mirco Slovak ⁴, Boris Klempa ⁵, Ian M. Jones ¹, Milan Labuda ⁵,
Ernest A. Gould ⁶, Tamara S. Gritsun ¹

¹ School of Biological Sciences, University of Reading, UK

² Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

³ School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, UK

Institute of Zoology, Bratislava, Slovakia

⁵ Institute of Virology, Bratislava, Slovakia

⁶ Unit des Virus Emergents, Marseille, France

There are 3 subtypes of tick-borne encephalitis virus (TBEV) distinguished at present time: European (EU), Siberian (SIB) and Far Eastern (FE). The former one is associated with *Ixodes ricinus* tick, whereas the latter two — with *I. persulcatus*. The circulation of TBEV in nature is mediated by the non-viraemic transmission between infected and uninfected ticks co-feeding on the same hosts and it was shown that transmission rate of «Hypr» strain (EU subtype) is much higher than rate of «Vasilchenko» strain (SIB subtype) — 60 and 5 % respectively. To reveal the viral determinants of transmission efficacy, we constructed the series of recombinant viruses with gradually exchanged genes coding structural (str) and non-structural (ns) viral proteins. The recombinant virus Hypr[str]Vs[ns] achieved the rate of non-viraemic transmission of 70 %. The introduction of separate structural genes of Hypr into Vs infectious clone has enhanced the transmission efficacy as well, though not to such extent as entire structural region but up to 33 % only. Thus, it was shown that efficacy of non-viraemic transmission of TBEV depends from properties of viral structural proteins mainly.

Key words: tick-borne encephalitis virus, transmission, recombinant virus

Клещевой энцефалит (КЭ) — это инфекционное заболевание, распространенное в лесной и лесостепной зоне Северной Евразии. Возбудитель КЭ — вирус, который передается человеку при укусе иксодовых клещей. Ежегодно в мире происходит порядка 10000 новых случаев заболеваний КЭ [5]. ВКЭ относится к семейству *Flaviviridae* род *Flavivirus* и в настоящее время выделяют 3 субтипа вируса — Дальневосточный, Сибирский

и Западноевропейский. Основным переносчиком первых двух субтипов является таежный клещ *Ixodes persulcatus*, который распространен в лесной и лесостепной зоне Азии и Восточной Европы, вплоть до Прибалтики. Основной переносчик вирусов Европейского субтипа — клещ *Ixodes ricinus*, обитающий в лесах Западной и Восточной Европы до Урала [6]. Геном вируса состоит из одной одноцепочечной молекулы РНК длиной

~11000 нуклеотидных оснований (н.о.). Одна открытая рамка считывания кодирует полипротеин, который расщепляется клеточными сигналазами и вирусной протеазой NS3 на 3 структурных и 7 неструктурных белков. На поверхности вириона расположены 2 структурных белка — мембранный (М) и оболочечный (Е), которые вместе с липидной мембраной образуют оболочку вириона [9]. В природе ВКЭ существует в процессе непрерывной передачи (трансмиссии) от зараженных клещей к незараженным. Существует 3 основных вида трансмиссии: неvirемическая, при которой вирус передается незараженным клещам во время совместного питания в непосредственной близости с зараженным клещом [7], virемическая, при которой вирус передается клещу с кровью больного животного [1] и трансвариальная, при которой вирус передается от зараженной самки потомству [2].

Недавно было обнаружено, что эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ Сибирского субтипа между клещами *I. ricinus* чрезвычайно низкая — при совместном питании с зараженными самками заражались только от 0 до 5 % нимф, в то время как для ВКЭ Западноевропейского субтипа этот показатель составлял 60—100 % (Т.С. Gritsun и М. Labuda, неопубл.). В настоящей работе мы попытались определить, какие вирусные белки определяют эффективность неvirемической трансмиссии. Для этого мы сконструировали ряд рекомбинантных вирусов, содержащих разные комбинации генов ВКЭ Сибирского и Западноевропейского субтипов, и сравнили их биологические свойства со свойствами соответствующих типовых штаммов обоих субтипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для культивации ВКЭ, титрования инфекционного вируса с помощью бляшкообразующих единиц, восстановления рекомбинантных вирусов и оценки эффективности репродукции вирусов в клетках млекопитающих использовали культуру клеток эмбриона свиньи СПЭВ. Все эксперименты проводили с использованием среды RPMI1640 с добавлением 2—5 % сыворотки крови эмбрионов коров и антибиотиков.

Типовые штаммы ВКЭ «Нург» и «Васильченко» были получены из коллекции Центра экологии и гидрологии «Оксфорд» [8]. Рекомбинантные вирусы конструировали с помощью методики инфекционного клонирования полноразмерных ДНК-копий геномов ВКЭ в плазмидных векторах pBR322 с использованием ряда промежуточных субклонов, содержащих отдельные гены ВКЭ, как описано ранее [4].

Концентрацию инфекционного вируса, а также морфологию бляшек определяли с помощью титрования бляшкообразующих единиц (БОЕ/мл) согласно Gould и Clegg, 1985 [3]. Эффективность репликации ВКЭ в культуре клеток млекопитающих оценивали по скорости накопления инфекционного вируса в течение первых 48 часов после

заражения. Монослой клеток заражали из расчета 1 БОЕ на клетку, адсорбировали вирус в течение 1 часа при комнатной температуре, тщательно промывали монослой и заливали среду поддержки. Через 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 48 часов отбирали аликвоты надклеточной среды и определяли титр инфекционного вируса.

Клещи *I. ricinus* были выведены в лабораторной колонии Института Зоологии Академии наук Словакии (Братислава). Эффективность неvirемической трансмиссии для каждого вируса определяли следующим образом. Группу из 10 голодных самок клещей заражали инъекцией 500 БОЕ исследуемого вируса на одного клеща. Зараженных клещей инкубировали при 24 ± 4 °C и влажности 85—90 % в течение 14 дней. Далее зараженных самок попарно прокармливали на мышах Balb/C одновременно с 15 неинфицированными нимфами *I. ricinus*, которые были прикреплены в непосредственной близости от самок-доноров. Открепившихся нимф и самок использовали для определения в них концентрации инфекционного вируса. Эффективность трансмиссии определяли как долю зараженных нимф. Эффективность репликации оценивали по средней концентрации инфекционного вируса в единичном зараженном клеще.

Все биологические эксперименты проводили как минимум в 3 независимых повторах. Для оценки вариабельности результатов рассчитывали стандартную ошибку средних значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выяснения роли отдельных белков ВКЭ в процессе неvirемической трансмиссии нами были сконструированы следующие рекомбинантные вирусы: Нург[*str*]Vs[*ns*] — 5'UTR и гены белков С, ргМ и Е взяты от типового штамма «Нург», а гены неструктурных белков и 3'UTR — от штамма «Васильченко»; Vs [Нург ргМ-Е] — гены белков ргМ и Е взяты от типового штамма «Нург», а 5'UTR, гены белков С и неструктурных белков и 3'UTR от штамма «Васильченко»; Vs [Нург Е] — ген белка Е взят от штамма «Нург», а остальной геном — от штамма «Васильченко». Таким образом, в ВКЭ «Васильченко», обладающего 5 % эффективностью неvirемической трансмиссии, были в разной пропорции введены гены структурных белков ВКЭ «Нург», обладающего 70 % эффективностью.

При оценке эффективности репродукции рекомбинантных ВКЭ и типовых штаммов в клетках млекопитающих выяснилось, что все они способны достигать высоких титров в культуре клеток СПЭВ. Динамика репродукции вирусов оказалась практически идентичной и к 32 часу после момента заражения титры вирусов достоверно не отличались друг от друга (рис. 1).

Во взрослых клещах *I. ricinus* все вирусы размножались со сходной эффективностью и достигали титров $3,65 - 5,71 \log_{10}$ БОЕ/мл. Интересно, что типовые штаммы размножались с практически одинаковой эффективностью — $4,56 \log_{10}$ БОЕ/мл для

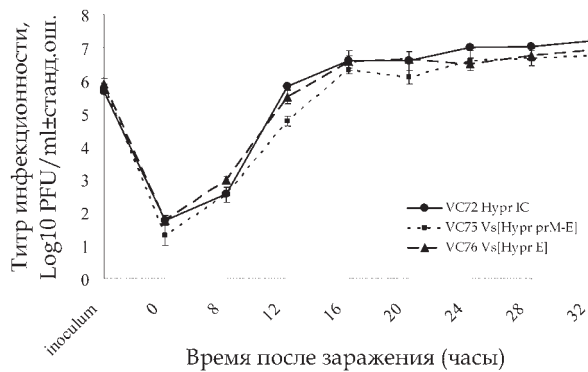


Рис. 1. Динамика репродукции рекомбинантных вирусов в культуре клеток млекопитающих (СПЭВ).

«Васильченко» и $4,54 \log_{10}$ БОЕ/мл для «Нург». При этом не обнаружено ни существенных различий в титрах типовых штаммов и химерных вирусов, ни корреляции между титрами вируса и композицией его структурных белков.

В нимфах *I. ricinus* штамм «Нург» размножался существенно лучше, чем «Васильченко». При этом, по мере введения структурных генов «Нург» в геном «Васильченко», эффективность репродукции вируса росла, была полностью восстановлена до значений штамма «Нург» при композиции Vs [Нург prM-E] и достигала максимума при композиции Hypr[str]Vs[ns] (рис. 2А).

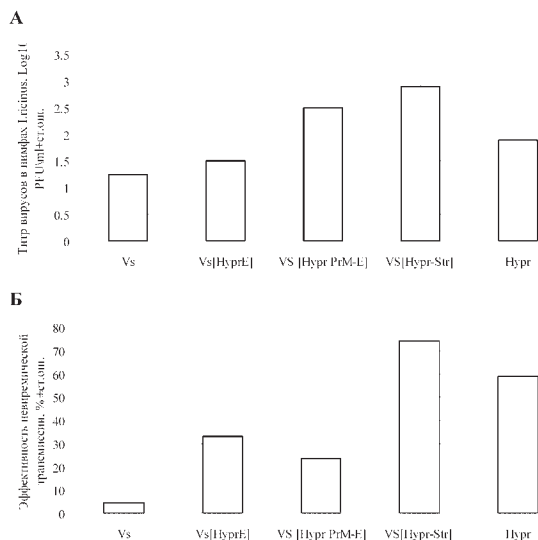


Рис. 2. А – репродукция рекомбинантных и исходных вирусов в нимфах *I. ricinus*; Б – эффективность неvirемической трансмиссии рекомбинантных и исходных вирусов от самок к нимфам *I. ricinus*.

Эффективность неvirемической трансмиссии от самок к нимфам также ясно коррелировала с композицией структурных белков ВКЭ. Так, замена гена белка Е в геноме «Васильченко» на ген Е штамма «Нург» привела к увеличению эффективности трансмиссии с $4,5 \pm 2,78\%$ до $33,16 \pm 10,44\%$. Наибольшая эффективность трансмиссии была характерна для рекомбинантного вируса Hypr[str]

Vs[ns], что согласуется с высокой эффективностью репродукции этого вируса в нимфах (рис. 2Б).

Таким образом, полученные результаты показывают, что эффективность неvirемической трансмиссии ВКЭ целиком и полностью зависит от комплекса структурных белков, каждый из которых вносит существенный вклад в этот процесс. Действительно, введение одного (Е) или даже двух (prM-E) генов штамма «Нург» в геном «Васильченко» привело только к частичному восстановлению способности к неvirемической трансмиссии между клещами *I. ricinus*, несмотря на то, что полностью восстановило способность вируса размножаться в нимфах *I. ricinus*.

Необходимо отметить, что наибольшую эффективность трансмиссии показал рекомбинантный вирус Hypr[str]Vs[ns], который помимо генов структурных белков содержал также нетранслируемый регион 5'UTR вируса «Нург». Поскольку ни один рекомбинантный вирус с заменой индивидуальных генов структурных белков не восстановил способность к неvirемической трансмиссии до сравнимых значений, роль 5'UTR и ансамбля структурных белков в этом процессе требует более глубокого изучения.

Данная работа выполнена при поддержке грантов BBSRC BBS/B/00697, The Sixth EU Framework grant (VIZIER EU Contract LSHG-CT-2004-511960) и грантом MRC ID 87652. Данный проект вдохновлен идеями покойного проф. Milan Labuda, который сформулировал концепцию неvirемической трансмиссии ВКЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов В.А., Малов И.В., Ющук Н.Д. Клещевой энцефалит. Новосибирск, «Наука», 2002. — 183 с.
2. Danielova V., Holubova J. Transovarial transmission rates of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks. In: Dusbabek F, Bukva V, eds. Modern acarology. Vol 2, Prague, Czech Republic: SPB Academic Publishing; 1991. — С. 7 — 10.
3. Gould E.A., Clegg J.C.S. Growth, titration and purification of togaviruses. // In: B. W. J. Mahy (ed.), Virology: A Practical Approach. — IRL Press, 1985. — P. 43 — 48.
4. Gritsun TS, Gould EA Development and analysis of a tick-borne encephalitis virus infectious clone using a novel and rapid strategy // J. Virol. Methods. — Vol. 76. — P. 109 — 120.
5. Kunz C., Heinz F.X. Tick-borne encephalitis. — Vaccine, 2003. — Vol. 21. — P. 1 — 2.
6. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis // Lancet. — 2008. — Vol. 371. — P. 1861 — 1871.
7. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature / M. Labuda [et al.] // Experientia. — 1993. — Vol. 49. — P. 802 — 805.
8. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses / T.S. Gritsun [et al.] // Virus Res 27. — 1993. — P. 201 — 209.

9. Rice C. Flaviviridae: the viruses and their replication // In: Fields, B., Knipe, M.D. (Eds.), Fields Virology. — Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia and New York, 1996.

Сведения об авторах

Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971)

Havlikova S. – Institute of Virology, Bratislava

Tuplin A. – лектор School of Life Sciences, University of Warwick

Kazimirova M. – научный сотрудник Institute of Zoology, Slovakia

Goonavardane N. – научный сотрудник School of Biological Sciences, University of Reading, UK

Slovak M. – научный сотрудник Institute of Zoology, Slovakia

Klempa B. – руководитель группы экологии вирусов Institute of Virology, Bratislava

Jones I. M. – глава департамента School of Biological Sciences, University of Reading, UK

Labuda M. – профессор Institute of Virology, Bratislava

Gould E.A. – профессор Unit des Virus Emergents, Marseille, France

Gritsun T.S. – лектор School of Biological Sciences, University of Reading, UK

Д.Д. Цыренова, Д.Д. Бархутова, В.П. Гаранкина, Б.Б. Намсараев

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ ОЗЕРА КОТОКЕЛЬСКОЕ И СПОСОБ ЕГО ОЧИСТКИ

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)

*В озере Котокельское при исследовании качества воды были обнаружены цианобактерии, образующие токсины, опасные для здоровья людей и животных. По содержанию хлорофилла *a* в воде озера Котокельское можно отнести к эвтрофным водоемам с высокой продуктивностью фитопланктона, по микробиологическим показателям, таким, как общая численность микроорганизмов и численность сапрофитов, — к «загрязненным водам». Препарат «Байкал ЭМ 1» активно участвует в процессах самоочищения воды, о чем свидетельствуют данные по снижению содержания хлорофилла в водной толще аквариума и уменьшения общей численности микроорганизмов.*

Ключевые слова: оценка качества воды, токсинообразующие цианобактерии, хлорофилл *a*, общая численность бактерий, эвтрофные водоемы

MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT OF WATER QUALITY OF LAKE KOTOKELSKOE AND METHOD OF ITS PURIFICATION

D.D. Tsyrenova, D.D. Barkhutova, V.P. Garankina, B.B. Namsarayev

Institute of general and experimental biology SB RAS, Ulan-Ude

*During assessment of water quality in the lake Kotokelskoe, we observed some cyanobacteria that forming harmful to human and animal toxins. According to the chlorophyll *a* content, the lake Kotokelskoe is eutrophic with high productivity of phytoplankton. But microbiological parameters such as total number of microorganisms and saprophytes cause to classify this lake as «polluted waters». Preparation «Baikal EM 1» is actively involved to the processes of self-purification of water. It could provide decreasing of chlorophyll content total number of microorganisms in aquarium water.*

Key words: assessment of water quality, toxic cyanobacteria, chlorophyll *a*, total number of bacteria, eutrophic water bodies

В последние десятилетия уделяется большое внимание антропогенному эвтрофированию поверхностных вод, следствием которого является изменение биоты, направленность и интенсивность процессов, бурное развитие водорослей, известное как «цветение воды». Гиперпродукция фитопланктона приводит к накоплению органического вещества в водоеме, ухудшению качества воды и образованию токсинов, опасных для здоровья людей и животных.

Объектом исследования являлось озеро Котокель — одно из крупных озер в Прибайкалье и имеющее рекреационное значение. В данном озере в период с июля по сентябрь во время бурного развития фитопланктона, вызывающего «цветение воды», ежегодно регистрируется массовая гибель рыб, а затем заболевания населения, диагностируемые как синдром алиментарно-токсической пароксизмальной миоглобинурии.

Известно, что во всем мире широко используются микробиологические препараты для повышения плодородия почвы и очистки вод [1, 6]. Микробные препараты нового поколения отличаются сложным качественным и количественным составом и комплексностью действия на различные биотопы, экосистемы. Микробиологический концентрат «Байкал ЭМ 1» — устойчивый симбиоз молочнокислых, фотосинтезирующих, азотфиксирующих бактерий и дрожжей. Также в состав препарата входят биологические активные компо-

ненты микробного происхождения. При очистке водоемов, промышленных и бытовых стоков на очистных сооружениях были получены положительные результаты при применении препарата «Байкал ЭМ 1» [1].

Целью нашего исследования являлось оценка качества воды озера и его очистка. В задачи входило определение видового состава цианобактерий, численности бактерий-деструкторов органического вещества и использование микробиологического препарата «Байкал ЭМ 1» для очистки воды озера.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микробиологические исследования воды озера Котокельское были проведены с мая по август 2009 г. на 3 станциях — юг (№ 1), центр (№ 2) и север (№ 3).

Для определения видового состава цианобактерий пробы микроскопировали с помощью микроскопа Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) в проходящем свете и с иммерсией при увеличении 1000 — 1250. Определение таксономической принадлежности цианобактерий на основании морфологических признаков проводили по Голлербаху, Еленкину [2, 3].

При изучении биологической продуктивности водоемов широко используется определение содержания фотосинтетических пигментов в планктоне. По концентрации хлорофилла *a* можно судить об общей биомассе и о продукции фитопланктона.

Определение содержания хлорофилла в планктоне, во-первых, позволяет выражать биомассу фитопланктона в абсолютных весовых единицах одного из важнейших компонентов клетки фотосинтетиков, во-вторых, открывает новые возможности изучения первичной продукции, так как содержание хлорофилла *a* закономерно связано со скоростью новообразования органического вещества в процессе фотосинтеза. Поэтому определение содержания хлорофилла *a* можно считать наиболее общим показателем фотосинтетической активности фитопланктона. Определение данного пигмента состояло из двух этапов: фиксации проб и определение ее концентрации. Для фиксации хлорофилла *a* 20 мл исследуемой воды пропускали через мембранный фильтр «Millipore». Экстракцию проводили 5–10 мл 96-м этиловым спиртом. Экстракты центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об/мин.

Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Shumadsu (Япония) при длине волн от 400 до 1000 нм. Расчет содержания хлорофилла рассчитаны по формуле:

$$C_{\text{хл а}} = 16,29 \times \text{ОП}_{665} - 8,54 \times \text{ОП}_{652}, \text{ мкг/мл} \quad (1)$$

$$C = (C_{\text{хл а}} \times V \times l \times 1) / V_{\text{обр}}, \text{ мкг/мл} \quad (2)$$

где $C_{\text{хл а}}$ — концентрация хлорофилла *a*, рассчитанная по (1) формуле, V — объем растворителя, мл; V — объем образца (20 мл), мл; l — толщина кюветы, см.

Общую численность бактерий (ОЧМ) определяли методом Разумова на мембранных фильтрах [4]. Для этого 5 мл воды (1 мл ила) отфильтровывали через мембранный фильтр, фиксировали и окрашивали 2,5%-м эритрозином. Подсчет вели под микроскопом с иммерсионным объективом с увеличением 90, при окуляре с сетчатым микрометром с увеличением 10. Просчитывали 10 полей зрения, подсчет кокков и палочек велся одновременно. Численность аэробных сапрофитов определяли подсчетом колоний, выросших в чашках Петри в течение 3 суток при температуре 30 °С, при глубинном посеве проб на среду РПА. Учет численности целлюлозоразлагающих бактерий вели на среде Пфеннига [5].

Лабораторный эксперимент по изучению влияния препарата «Байкал ЭМ 1» на микробиологические показатели воды озера был проведен на пробах воды и донных осадков в аквариумах, отобранных 26 августа 2009 г. Препарат «Байкал ЭМ 1» был предоставлен компанией НПО «Эм-центр». Эксперимент состоял из четырех вариантов: 1. Вода (контроль); 2. Вода + «Байкал ЭМ 1» (опыт); 3. Придонная вода — вода + донный осадок (контроль); 4. Придонная вода — вода + донный осадок + «Байкал ЭМ 1» (опыт). Опыт проводили в четырехкратной повторности. Концентрат препарата «Байкал ЭМ 1» был внесен в количестве 1 : 1000, рН препарата 3,4. Второе внесение препарата «Байкал ЭМ 1» произведено 21 сентября 2009 г. (в количестве 1 : 1000).

Высота столба воды в аквариумах (без ила) 17 см; придонной воды 10 см (ил — 7 см). Освещение естественное, температура — комнатная (18–20 °С). Характеристика исходной воды: цвет — слабо желтой окраски, запах не ощущается, мутность — слабо опалесцирующая, прозрачность — 7 см. Характеристика донного осадка: цвет — зеленовато-коричневый, мелкодисперсный, пластичный, запах землистый.

В начале эксперимента значения рН были равны:

1. Вода (контроль) — 7,16;
2. Вода + «Байкал ЭМ 1» (опыт) — 7,13;
3. Придонная вода — вода + донный осадок (контроль) — 6,36;
4. Придонная вода — вода + донный осадок + «Байкал ЭМ 1» (опыт) — 6,56.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В планктоне озера определен видовой состав цианобактерий на основании морфологических признаков. Всего в исследованных пробах обнаружено 8 разновидностей и формы цианобактерий: *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus cedrorum* Sauv., *Cloeoapsa minor*, *Calotrix elenkin*, *Phormidium frigidum*, *Ph. woronochinii*, *Ph. fovelarum*, *Limnotrix* sp.

Таблица 1
Видовой состав и процентное соотношение цианобактерий озера Котокельское

Таксон	Соотношение, %				
	06.05.09	06.07.09	27.07.09	07.08.09	25.08.09
<i>Microcystis aeruginosa</i> Kütz. emend Elenk.	50	50	70	40	70
<i>Synechococcus cedrorum</i> Sauv.	10	—	—	—	—
<i>Cloeoapsa minor</i> (Kütz.) Hollerb. Ampl.	5	—	—	—	—
<i>Calotrix elenkin</i> Kossinsk.	15	20	20	30	30
<i>Phormidium frigidum</i> Fritsch.	5	—	—	—	—
<i>Ph. woronochinii</i> Anissimova sp. nov.	5	—	—	15	—
<i>Ph. fovelarum</i> (Mont.) Gom.				15	—
<i>Limnotrix</i> sp.	10	30	—	—	—

Примечание: «—» — таксон не обнаружен.

Наибольшее их разнообразие зарегистрировано в мае. Видовой состав цианобактерий и их соотношение представлены в таблице 1.

Одноклеточные цианобактерии были представлены видами *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus cedrorum* и *Cloeocapsa minor*, все остальные виды являлись нитчатыми. По разнообразию видового состава следует выделить род *Phormidium* (3 вида), остальные роды представлены единично.

В период исследований доминирующим видом среди цианобактерий в планктоне являлась одноклеточная цианобактерия *Microcystis aeruginosa* (50 – 70 %). Часто встречались виды *Calotrix elenkin*, *Limnotrix* sp. и *Synechococcus cedrorum*, количество которых варьировало от 10 до 15 % в мае. В июле планктонные цианобактерии были представлены *Microcystis aeruginosa*, *Calotrix elenkin*, *Limnotrix* sp., соотношение которых менялось. Данные виды в литературе рассматриваются как токсинообразующие [6].

Содержание хлорофилла *a* в планктоне озера варьировало от 109,4 до 172,3 мкг/л). Максимум содержания хлорофилла *a* выявлен в начале августа, что связано с повышением температуры воды. В этот же период наблюдается наибольшая концентрация кислорода в воде и уменьшение прозрачности воды в озере, что обусловлено интенсивным развитием фитопланктона. В июле содержание хлорофилла *a* выше в южной части озера по сравнению с центром. В то же время в конце августа, его содержание примерно одинаково по акватории озера (рис. 1).

Концентрация хлорофилла используется для определения трофности водоема. По содержанию хлорофилла *a* в воде (109,4 – 172,3 мкг/л) озеро Котокельское можно отнести к эвтрофным водоемам с высокой продуктивностью фитопланктона. Причем, озеро остается эвтрофным в течение всего летнего периода. Высокая продуктивность озера связана с летним прогреванием водной толщи, присутствием и доступностью биогенных элементов.

В воде и донных осадках озера были определены общее микробное число и численность некото-

рых физиологических групп бактерий-деструкторов органического вещества. В водной толще озера общая численность микроорганизмов варьировала от 1,4 млн. кл/мл до 3,6 млн. кл/мл. На станции № 1 (юг) максимальная численность выявлена в июле, тогда как на станции № 2 (центр) – в августе, на станции №3 (север) – в мае.

В донных отложениях ОМЧ была на порядок выше и достигала значений 23.9 – 67.8 млн. клеток в 1 мл осадка. Наиболее высокая численность бактерий-деструкторов выявлена в июле – августе на всех исследуемых станциях, что связано с повышением температуры воды и их активной деятельностью в этот период.

В водной толще количество целлюлозоразлагающих бактерий не превышало 10 кл/мл на центральном и северном станциях. На южной станции количество целлюлолитиков достигало 100 клеток в 1 мл. В донных осадках их количество изменялось от 100 до 10000 клеток/мл. Наибольшее количество микроорганизмов – деструкторов, использующих целлюлозу в качестве субстрата, обнаружено на станции №1.

Сапрофитные микроорганизмы являются важным показателем в оценке качества воды и ее самоочищении. Число сапрофитов коррелирует с количеством легкоусвояемого органического вещества. Изменение этого числа является одним из чувствительных показателей повышения трофности водоемов. Сапрофитные бактерии, достигали максимальных значений в июле в донных осадках на южной станции и были равны 67 тыс. клеток в 1 мл ила. Наименьшее их количество обнаружено в донных осадках на северной станции в количестве 100 клеток в 1 мл. В воде количество сапрофитов варьировало от 1200 до 8300 клеток. Наиболее активная деятельность сапрофитных микроорганизмов наблюдается в августе.

В результате проведенного эксперимента с применением препарата «Байкал Эм 1» было показано, что при внесении данного препарата в воду значения pH в опытных образцах становятся ниже, чем в контроле. А в эксперименте с придонной водой

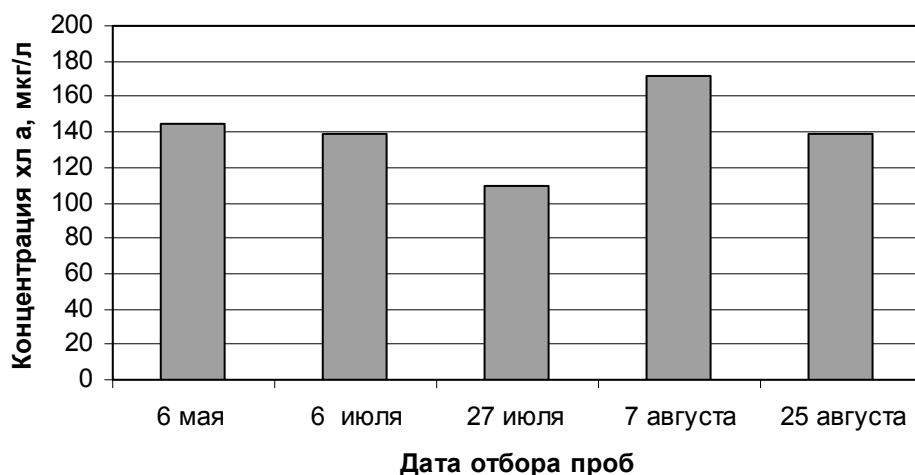


Рис. 1. Содержание хлорофилла в акватории озера (мкг/мл).

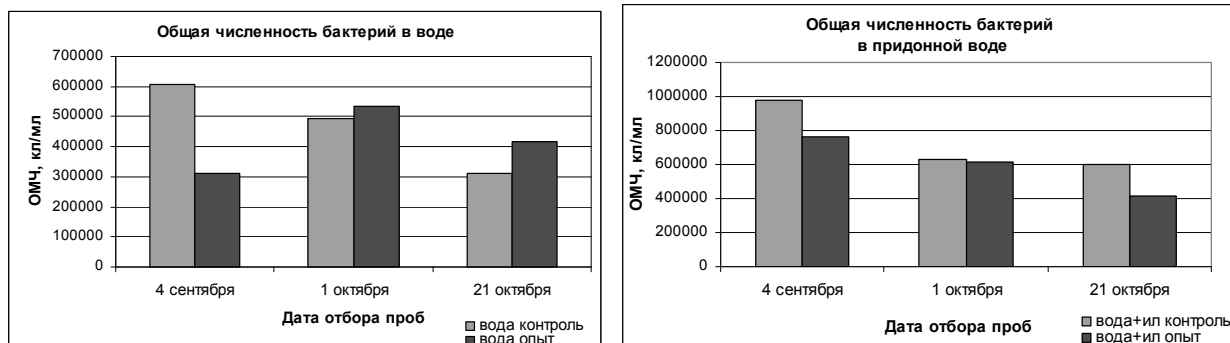


Рис. 2. Общая численность бактерий в воде.

(вода + донные осадки) не наблюдается резких изменений в величине pH по сравнению с контролем.

Измерение концентрации растворенного кислорода в воде (12 октября и 5 ноября) показало, что его содержание достигает в контроле 7,5 и 6,48 мг/л, в опыте — 6,88 и 6,33. В придонной воде концентрация кислорода была ниже и достигала значений 5,18 и 5,53 мг/л в контроле и 4,45 и 5,15 — в опыте.

Общая численность бактерий в воде возрастает от 300 000 до 530 000 к/мл в опытных пробах (рис. 2). Максимум их численности наблюдается в опыте через месяц. В контрольных пробах наблюдается постепенное уменьшение их численности. В придонных водах опытной партии наблюдается уменьшение численности бактерий, как в опыте, так и в контроле.

Численность сапрофитных микроорганизмов в воде возрастала от 43250 к/мл в контроле до 124333 к/мл в течение недели, а в опытных образцах их численность выросла от 42750 до 455000 к/мл.

Через две недели численность сапрофитов достигала 348000 к/мл в воде с добавлением препарата, в то время как их количество в контроле составляло 231667 к/мл. Эти результаты показывают, что добавление препарата «Байкал ЭМ 1» стимулирует деструкцию органического вещества до легкоусвояемых форм, о чем свидетельствует активное развитие сапрофитных бактерий. В придонной воде численность сапрофитных бактерий увеличивается равномерно как в контроле, так и в опытных образцах. Более заметный рост численности бактерий наблюдается через 2 недели после начала эксперимента. В контроле количество сапрофитных бактерий увеличивается от 19750 к/мл до 32500 в течение 1 недели и до 256500 к/мл в течение 2 недель, в опыте — от 17750 до 42750 и 240330 к/мл соответственно.

Содержание хлорофилла в аквариумах было определено в конце сентября. Результаты показывают, что содержание хлорофилла в начальный период в воде, как в опыте, так и контроле достигает

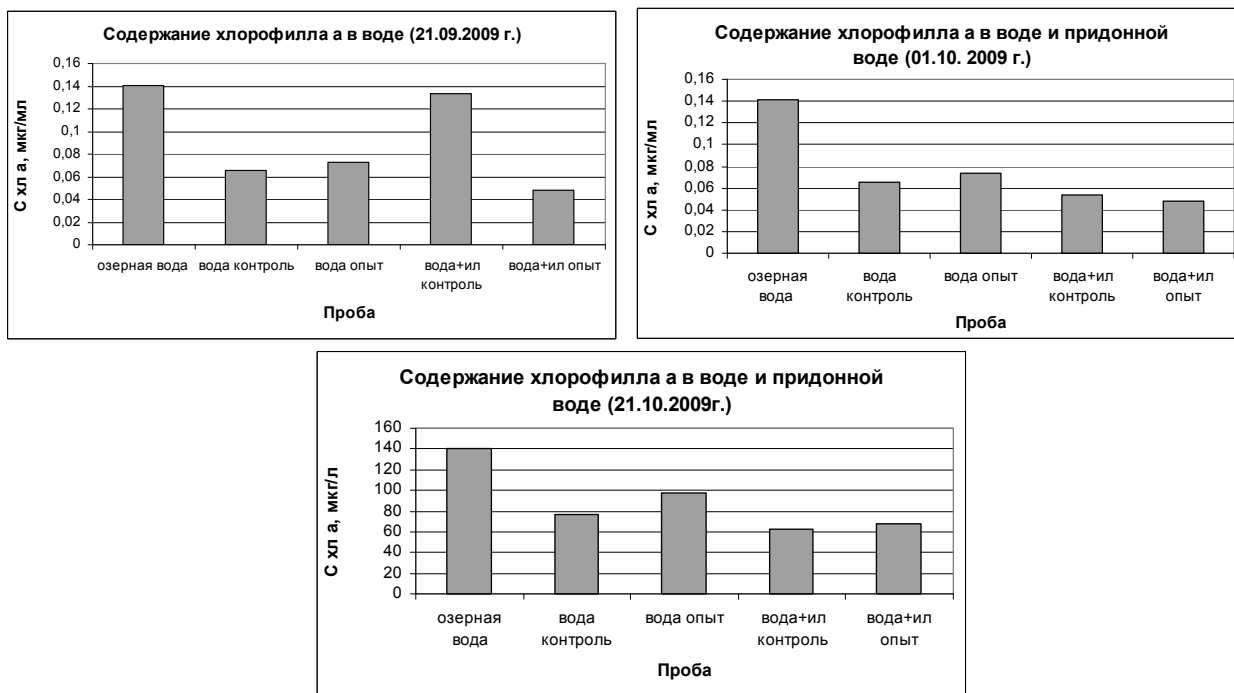


Рис. 3. Содержание хлорофилла в воде.

140 – 160 мкг/л. При таких значениях хлорофилла *a* воды считаются эвтрофными. Затем их содержание заметно снижается. В конце октября их количество составляет 80 – 96 мкг/л (рис. 3).

Таким образом, в микробном мате озера Котокельское обнаружены представители токсинобразующих видов цианобактерий, которые возможно являются причиной замора рыб и заболевания людей. По содержанию хлорофилла *a* в воде озера Котокельское можно отнести к эвтрофным водоемам с высокой продуктивностью фитопланктона, по микробиологическим показателям (общая численность микроорганизмов и численность сапрофитов) – к «загрязненным водам». Влияние микробиологического препарата «Байкал ЭМ 1» в контролируемых условиях проявляется в течение первого месяца опыта. Препарат активно участвует в процессах самоочищения воды, о чем свидетельствуют данные по снижению содержания хлорофилла в водной толще аквариума и уменьшения общей численности микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 10-04-01185-а, № 1204-98081-р_сибирь_а, Интеграционных грантов № 5 и № 94.

Сведения об авторах

Цыренова Дулма Доржиевна – к.б.н., м.н.с. ИОЭБ СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (924)6537048)
Бархутова Дарима Дондоковна – к.б.н., с.н.с. ИОЭБ СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (924)6502073)
Гаранкина Валентина Петровна – к.б.н., инж. ИОЭБ СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)
Намсараев Баир Бадмабазарович – д.б.н., проф., зав. лабораторией микробиологии ИОЭБ СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6)

ЛИТЕРАТУРА

1. Колмаков В.И. Методы предотвращения массового развития цианобактерии *Microcystis aeruginosa* Kutz emend. Elenk. в водных системах // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 2. – С. 149 – 153.
2. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. – М.: Наука, 1989. – 286 с.
3. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – С. 69 – 77.
4. Микробиологические препараты «Байкал ЭМ 1», «Тамир», «ЭМ-курунга» // Практическая биотехнология в сельском хозяйстве, экологии, здравоохранении: Сб. тр. – М.: Изд-во «Агрорус», 2006. – 307 с.
5. Определитель пресноводных водорослей СССР. Сине-зеленые водоросли / М.М. Голлербах, Е.К. Косинская, В.И. Полянский. – М.: Советская наука, 1953. – Вып. 2. – 385 с.
6. Синезеленые водоросли СССР / А.А. Еленкин. – М. – Л.: Изд-во АН СССР, 1949. – Вып. 2. – С. 990 – 1907.

Е.А. Чапоргина ¹, Г.А. Данчинова ¹, М.А. Хаснатинов ¹, А.В. Ляпунов ¹, С.В. Пыжьянов ²,
Е.В. Арбатская ¹

РАСПРОСТРАНЕНИЕ АРБОВИРУСОВ И ВИРУСОВ ГРИППА В ПРИБАЙКАЛЬЕ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Восточно-Сибирская государственная академия образования (Иркутск)

В статье приводятся результаты исследований арбовирусов и вирусов гриппа птиц, проводимых с конца 70-х гг. прошлого века в Прибайкалье. На этой территории установлена циркуляция арбовирусов серогруппы Калифорнийского энцефалита (Тягиня, Инко, зайца беляка), Батаи, Гета и различных вирусов гриппа А среди птиц. Изучено их географическое распространение и степень активности в различных регионах.

Ключевые слова: Прибайкалье, серогруппа Калифорнийского энцефалита, вирус Батаи, Гета, вирусы гриппа А

CIRCULATION OF ARBOVIRUSES AND INFLUENZA VIRUS IN PRIBAIKALYE

E.A. Tchaporgina ¹, G.A. Danchinova ¹, M.A. Khasnatinov ¹, A.V. Liapunov ¹,
S.V. Pyzhjanov ², E.V. Arbatskaya ¹

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Eastern-Siberian State Educational Academy, Irkutsk

The California encephalitis serogroup virus, Batai virus and Geta virus were isolated as result of investigation of distribution of arboviruses in Pribaikalye. The results of the study of influenza A virus in birds in Pribaikalye are presented as well.

Key words: Pribaikalye, Californian encephalitis serogroup, Batai virus, Geta virus, Influenza A virus

Актуальность изучения распространения арбовирусных инфекций и вирусов гриппа определяется масштабами циркуляции этих возбудителей, их сохранением в природных очагах и, естественно, опасностью возникновения заболеваний. Глобальное потепление климата и антропогенное влияние на природные очаги обуславливают расширение ареалов переносчиков, прокормителей и возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней. В связи с этим необходимы постоянные широкомасштабные обследования территорий, и, в частности, Прибайкалья. Кроме этого Байкальский регион с каждым годом привлекает все большее число туристов и отдыхающих, посещающих широко распространенные очаги арбовирусных инфекций в сезон их максимальной опасности.

Арбовирусные инфекции — наиболее многочисленная группа среди заболеваний вирусной этиологии. К арбовирусам относится большая группа вирусов, которые передаются при укусе кровососущих членистоногих переносчиков (комары, москиты, мокрецы, клещи) восприимчивым позвоночным животным. К настоящему времени в мире описано более 500 арбовирусов, около 100 из которых способны вызывать заболевания у людей, и этот перечень постоянно увеличивается [2].

Грипп также является распространенной вирусной инфекцией, поражающей не только людей, но и некоторых животных и птиц. Возбудителем заболевания является вирус гриппа А (ВГА) сем. *Orthomyxoviridae*, род *Influenzavirus*. Способность ВГА инфицировать тот или иной вид животных и тяжесть заболевания во многом зависят от особенностей структуры поверхностных белков

[1]. Естественные хозяева и переносчики ВГА — дикie мигрирующие птицы, преимущественно утки. Именно в популяциях диких водоплавающих птиц существует наибольшее разнообразие ВГА, и именно они являются «прародителями» особо патогенных для человека и домашних животных форм гриппа [5].

МАТЕРИАЛЫ

Основными объектами обследований для изучения иммунного статуса были люди (сыворотки крови). Также на арбовирусы были исследованы комары и их естественные прокормители — мелкие млекопитающие и птицы, на вирусы гриппа — птицы. Территория обследования — Прибайкалье, включающее Республику Бурятия, Иркутскую и Читинскую области.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Арбовирусные инфекции

и их эпидемиологическое значение в Прибайкалье

Первые наши исследования начаты в 1978 г.

На территории Прибайкалья нами изолировано 20 штаммов вирусов серогруппы Калифорнийского энцефалита (СКЭ), 5 штаммов вируса Батаи, 4 штамма вируса Гета, для которых установлена их преимущественная экологическая связь с комарами рода *Aedes*.

Данные сероэпидемиологических исследований сывороток здоровых людей и сельскохозяйственных животных, собранных в различных районах, свидетельствуют о циркуляции в обследованных регионах Прибайкалья трех вирусов СКЭ: Тягиня, Инко и Зайца беляка. Циркуляция

вирусов Тягиня, Инко и Заяц белая более интенсивна в лесостепной зоне Прибайкалья, чем в степной. Максимально выраженная напряженность очагов вирусов СКЭ наблюдается в зоне высокой численности комаров. Значительная часть образцов сывороток крови населения Прибайкалья реагирует с вирусами Тягиня, Инко и Заяц белая одновременно. Это свидетельствует о том, что вирусы СКЭ обладают выраженными перекрестными реакциями, поэтому в течение жизни у людей повышается вероятность повторного инфицирования одним, двумя или несколькими вирусами из этой группы, что приводит к образованию группоспецифических антител.

Отмечается четкое нарастание показателей иммунной прослойки к вирусам СКЭ с увеличением возраста людей, проживающих во всех административных районах Прибайкалья, при отсутствии выраженного отличия в напряженности иммунитета у мужчин и женщин. Высокий уровень гуморального иммунитета у взрослых жителей обследованных территорий служит фактором, ограничивающим заболеваемость, связанную с вирусами СКЭ в старших возрастных группах.

Изоляция вирусов СКЭ и доказательство циркуляции вирусов Тягиня, Инко и Заяца белой на территории Прибайкалья послужили поводом для проведения эпидемиологического анализа 380 историй болезни взрослого населения с целью выявления людей, имевших в анамнезе гриппоподобные симптомы. Всего было подобрано 50 человек, от которых были взяты пробы крови. У пяти человек исследованы парные сыворотки крови, при этом у одного больного отмечена сероконверсия к вирусам Инко и Тягиня. При исследовании единичных сывороток у шести больных обнаружены антитела к IgM к вирусу Инко. При параллельном исследовании сывороток крови этих больных в реакции нейтрализации выявлены вируснейтрализующие антитела к вирусам Инко и Тягиня с 4-х кратным преобладанием титра антител к штамму Инко (1-я проба Инко 1 : 20; 2-я проба Инко 1:80; Тягиня 1 : 40). Эти результаты дают основание считать, что причиной заболевания семи обследованных больных (14 %) послужил вирус СКЭ, в частности, вирус Инко.

Заболевания, связанные с вирусами СКЭ, по-видимому, имеют существенное значение в патологии человека, однако их диагностика не налажена, и эти заболевания проходят под разными диагнозами (например, ОРВИ, грипп и пр.). Большая часть выявленных больных была в возрасте до 30 лет. Все заболевания наблюдались в июле – августе. Клиническая картина заболеваний характеризовалась гриппоподобным течением и наличием таких симптомов как озноб, лихорадка, головная боль, гиперемия слизистой оболочки ротоглотки, слабость. Клинические проявления были многообразны, отсутствовали патогномоничные симптомы. Для дифференциальной диагностики подобных случаев заболеваний необходимо специальное лабораторное обследование.

Первая изоляция вируса Батаи в Прибайкалье в 1985 г. вызвала интерес в плане изучения иммунной прослойки к данному возбудителю среди людей, сельскохозяйственных животных, мелких млекопитающих и птиц. В результате обследования населения Иркутской области у 2,4 % здоровых людей и 1,5 % лихорадящих больных были выявлены антигеммагглютинины к вирусу Батаи, этиологически связанные с вирусом Батаи. Почти во всех случаях титры антител в пробах крови к вирусу Батаи у здорового населения были 1 : 10, редко 1 : 20; 1 : 40, а у больных в первых сыворотках крови антитела отсутствовали, во-вторых, титры составляли 1 : 20.

При обследовании сывороток крови местного населения, крупного и мелкого рогатого скота во всех районах юга Прибайкалья обнаружены положительные находки к вирусу Батаи. В районах с наиболее суровыми природно-климатическими условиями выявлены высокие показатели иммунной прослойки. Показатели гуморального иммунитета у мелкого рогатого скота в среднем в три раза превышают аналогичные показатели у крупного рогатого скота. У птиц антитела к вирусу Батаи встречались относительно редко (1,1 %). Среди диких млекопитающих процент положительных проб был еще ниже и составил 0,3 % [3].

В большинстве районов Прибайкалья антитела к вирусу Батаи не выявлены. Серопозитивные находки обнаружены только в сыворотках крови жителей Северо-Байкальского и Тункинских районов Республики Бурятия [8, 7]. В сыворотках крови крупного рогатого скота процент серопозитивных сывороток также не высок. Единичные положительные находки вируса Батаи там, где нами ранее изолированы штаммы этого вируса, очевидно, свидетельствуют о низком эпидпотенциале его природных очагов. Вероятно, в Прибайкалье в настоящий момент наблюдаются «вялые» очаги вируса Батаи, подобные очагам, исследованным на о. Сахалин [6].

Результаты проведенных исследований существенно расширяют представления о распространении и циркуляции этих новых для Прибайкалья вирусов. И хотя их эпидемическая значимость различна, необходим постоянный мониторинг за очагами вирусов СКЭ, Батаи и Гета.

Циркуляция вирусов гриппа А в Прибайкалье

В 80 – 90-е гг. прошлого столетия в Прибайкалье выявлена циркуляция целого спектра ВГА: H1N4, H3N2, H3N6, H3N8, H4N6, H7N1, H7N8, H13N1, H13N6, H13N8 и вирус болезни Ньюкасла – ВБН [3, 5, 6]. Подавляющее большинство штаммов орто- и парамиксовирусов изолировано от птиц озерно-болотной экологической группы. Впервые изолирован вирус серотипа H4N6 от ондатры, свидетельствующий о вовлечении водных млекопитающих в круг хозяев данного серотипа.

В третьем тысячелетии был продолжен эколого-эпидемиологический мониторинг за ВГА среди птиц, экологически связанных с водой (чайковые, утиные, поганковые, лысухи, баклановые). К 2005 г.

основным субтипом ВГА, инфицировавшим птиц, был субтипа Н3, а в 2006 – 2008 гг. к ним присоединились вирусы субтипа Н5 и Н7, а также Н6Н1.

При серологическом исследовании аллантоисов в РТГА с антисыворотками к ВГА после III пассажа были выявлены положительные пробы к различным серовариантам ВГА: Hsw1N1; H0N1; H1N1; H2N2; H3N2; H5N1. Интересен тот факт, что положительные пробы к серотипу вируса Н5 были обнаружены только в 2006 – 2007 гг., в 2008 г. не было ни одной пробы, позитивной к вирусу Н5Н1. В результате исследования материалов 2010 г. были выявлены вирусы, содержащие гемагглютинины Hsw, H0, H2 (Hsw1N1; H0N1; H2N2) и вирусы гриппа В, с преобладанием последнего. Следует отметить, что в естественных условиях вирусы гриппа В вызывают заболевания только у человека, хотя имеются косвенные серологические доказательства возможной циркуляции их среди животных – оленей и птиц [4].

Сравнительный многолетний анализ результатов вирусологического обследования птиц в Прибайкалье показал существенные отличия антигенного состава циркулирующих ВГА. В 1979 – 1988 гг. доминировал вирус Н3Н8 с единичными находками Н4Н6, Н3Н2 и ВБН, в 1991 г. доминировали вирусы субтипа Н13 (Н6 и Н8) с единичными находками Н3Н8. В 2006 – 2007 гг. преобладали вирусы серотипа Н6Н1 и отмечено появление субтипов Н5; Н7; Hsw1N1; H0N1 с единичными находками субтипа Н3. Уже на следующий год показано наличие вирусов, содержащих гемагглютинины типа Н7 и Н3, а также Hsw1N1; H3N2; H1N1 и H2N2, и отсутствие позитивных проб в вирусу Н5Н1.

Отмечено, что в течение 2 – 3 лет происходят значительные изменения в эпизоотическом процессе как качественного, так и количественного порядка. Наблюдается смена не только основного возбудителя ВГА по антигенной формуле, но также появляются или исчезают некоторые виды вирусов, активно циркулировавшие среди птиц Прибайкалья.

Сведения об авторах

Чапоргина Елена Александровна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Данчинова Галина Анатольевна – д.б.н., руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971; e-mail: dan-chin@yandex.ru)

Хаснатинов Максим Анатольевич – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Ляпунов Александр Валерьевич – к.б.н., научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Пыжьянов Сергей Владимирович – д.б.н., проф. ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирская государственная академия образования» (664011, г. Иркутск, ул. Н. Набережная, 6)

Арбатская Елена Валентиновна – научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; тел. (3952)333-971).

Широкое распространение ВГА среди птиц, которые обитают в регионе, мигрируют в юго-восточную Азию и зимуют в Китае, Вьетнаме, Таиланде, Малайзии и других странах континентальной Азии и на Филиппинах означает, что в любой момент возможно появление высокопатогенных вариантов ВГА и развитие эпизоотий, а затем и эпидемических вспышек. Результаты проведенных исследований по распространению гриппа также свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from blackheaded gulls / R.A. Fouchier [et al.] // J. Virol. — 2005. — Vol. 79. — P. 2814 – 2822.
2. Ciota A. T., Kramer L. D. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. Viruses. — 2010. — Dec 2 (12). — P. 2594 – 2617.
3. Горин О.З. Современные особенности эпидемиологии арбовирусных инфекций, экологии арбовирусов и вирусов гриппа в природных биоценозах юга Восточной Сибири : дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1994. — 67 с.
4. Жданов В.М., Гайдамович С.Я. Общая и частная вирусология. Том 2. — М.: Медицина, 1982. — С.179 – 180.
5. Изоляция вирусов гриппа А от диких птиц и ондатры в западной части Восточно-Азиатского миграционного русла / Д.К. Львов [и др.] // Вопр. вирусол. — 2001. — № 4. — С. 35 – 39.
6. Львов С.Д. Эколого-эпидемиологические закономерности циркуляции арбовирусов на севере Евразии : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1994. — 50 с.
7. О циркуляции вирусов комплекса Калифорнийского энцефалита и Батаи в Прибайкалье / Е.А. Чапоргина [и др.] // Мед. паразитология. — 1995. — № 4. — С. 56 – 60.
8. Чапоргина Е.А. Распространение арбовирусов в Прибайкалье : автореф. дис. канд. биол. наук. — Иркутск. — 1998. — 20 с.

В.А. Чхенкели, А.В. Анисимова, Н.А. Горяева

**МОНИТОРИНГ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ – ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
МАССОВЫХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ БОЛЕЗНЕЙ МОЛОДНЯКА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ***Иркутская государственная сельскохозяйственная академия (Иркутск)*

В работе приведены данные по эпизоотологическому мониторингу массовых желудочно-кишечных болезней молодняка сельскохозяйственной птицы в Иркутской области. В результате проведенного анализа заболеваемости сельскохозяйственной птицы за период 2006–2010 годы выделены следующие нозологические единицы: колибактериоз (37,3 %), сальмонеллез (25,4 %), пастереллез (19,8 %), спирохетоз (14,4 %), стафилококкоз (2,9 %), инфекционный ларинготрахеит (0,2 %). Результаты мониторинговых исследований свидетельствуют о том, что желудочно-кишечные заболевания вызываются широким спектром представителей условно-патогенной микрофлоры. Однако микробные ассоциации в большинстве своем представлены микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* – родов *Escherichia* и *Salmonella*. Установлено не только широкое разнообразие выделенных серологических вариантов кишечной палочки и сальмонеллы, но и колебание их соотношения в общей структуре выделенных культур в рассматриваемом временном промежутке.

Ключевые слова: эпизоотологическая ситуация, мониторинг, колибактериоз, сальмонеллез

**MONITORING OF BACTERIAL AGENTS – ETIOLOGICAL FACTORS OF MASS
GASTRO-INTESTINAL DISEASES OF YOUNG POULTRY**

V.A. Chkhenkeli, A.V. Anisimova, N.A. Goryaeva

State Agricultural Academy, Irkutsk

The work presents the results of epizootological monitoring of mass gastro-intestinal diseases of young poultry in the Irkutsk Region. As a result of the poultry sickness rate analysis covering the period of 2006–2010 the following nosological units have been distinguished: colibacteriosis (37,3 %), salmonellosis (25,4 %), pasteurilosis (19,8 %), spirochetosis (14,4 %), staphylococcus diseases (2,9 %), infectious laryngotracheitis (0,2 %). The results of the monitoring research indicated that gastro-intestinal diseases are caused by a wide range of opportunistic pathogenic microflora agents. However, these bacteria groups are mostly represented by microorganisms *Enterobacteriaceae* family of *Escherichia* and *Salmonella* types. The research established not only wide diversity of the distinguished serological colon bacillus and salmonella varieties, but also fluctuations in their proportion in the common structure of the distinguished culture in the examined time interval.

Key words: epizootological situation, monitoring, colibacteriosis, salmonellosis

В структуре патологии сельскохозяйственных животных и птицы раннего периода развития одно из ведущих мест занимают желудочно-кишечные болезни, наносящие значительный экономический ущерб животноводческим и птицеводческим хозяйствам [1, 4, 5, 10]. В большинстве случаев они имеют инфекционную природу, а основным этиологическим фактором при этом являются возбудители семейства *Enterobacteriaceae*. В последние годы увеличение токсичности кормов при сохранении массивной стресс-нагрузки на птицу, особенно цыплят первых дней жизни, привело к повышению эпизоотологической значимости инфекций энтеробактериального происхождения. Переболевшая птица пожизненно остается носителем и источником возбудителя инфекции, ассимилируя его, в том числе и в продукты птицеводства – яйца. Кроме того, являясь ослабленными, такие куры более подвержены влиянию других патогенных агентов, которые, персистируя в их организме, могут повышать свою вирулентность [2]. Предрасполагающими факторами развития этих заболеваний является нарушение правил кормления и содержания, а также несоблюдение ветеринарно-санитарных мероприятий. В птицеводстве с использованием интенсивной

технологии одной из проблем является снижение уровня неспецифической резистентности организма птицы и их устойчивости к действию неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе патогенной и условно-патогенной микрофлоры, что сопровождается возникновением заболеваний, снижением продуктивности и качества продукции [9]. Доказано, что в современных условиях интенсивная технология искажает процессы формирования кишечного микробиотопа у молодняка. Дисбактериоз кишечника замыкает патогенетический порочный круг, разорвать который необходимо как для успешной профилактики основного заболевания, так и для ликвидации его последствий [7]. Кроме того, в регионе отмечается природный дефицит важных микроэлементов: йода, селена, кобальта, цинка и др. в рационах животных. Существует также дефицит витаминов, белков и углеводов. При этом даже незначительное нарушение режима ухода, кормления и содержания приводит к нарушению обменных процессов в организме птицы, повышению заболеваемости и падежа, снижению количества и качества птицеводческой продукции [8]. В подобных условиях необходимо обеспечить стойкое благополучие птицефабрик, что может быть достигнуто

при рациональном и своевременном проведении специальных мероприятий: диагностических, профилактических, лечебных.

Цель работы заключалась в изучении роли и места колибактериоза и сальмонеллеза в инфекционной патологии птиц в условиях Иркутской области.

МЕТОДИКА

Объектом исследования являлись отчетные материалы хозяйств области, ветеринарная отчетность Службы ветеринарии Иркутской области (форма № 1 – вет, форма № 2 – вет), отдела животноводства Министерства сельского хозяйства Иркутской области, ветеринарная отчетность (форма № 4 – вет) ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория» (ИМВЛ). В работе использовали комплексный эпизоотологический метод.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного анализа заболеваемости за период 2006–2010 годы выделены сле-

дующие нозологические единицы: первое место среди инфекционных болезней кур занимает колибактериоз (37,3 %), второе – сальмонеллез (25,4 %), третье – пастереллез (19,8 %). Зарегистрировали также спирохетоз (14,4 %), стафилококкоз (2,9 %), инфекционный ларинготрахеит (0,2 %). В период с 2006 по 2010 гг. сальмонеллез достигал максимума в 2009 г. (45,1 %), минимальное количество зарегистрированных вспышек сальмонеллеза отмечено в 2010 г. (8,4 %). В 2006 г. сальмонеллез составил 20,4 % от всех случаев инфекционных заболеваний птиц. С 2007 по 2009 гг. сальмонеллез имел тенденцию к росту в процентном отношении от всех случаев инфекционных заболеваний птиц, хотя абсолютные показатели оставались практически на одном уровне (93–94 случая в год). Число заболевшей колибактериозом птицы в период с 2006 по 2010 гг. находилось на постоянно высоком уровне и в последний период имело тенденцию к росту. В 2007 г. колибактериоз составил 18,8 % от всех случаев инфекционных заболеваний птиц, а в 2010 г. – 43,9 %.

Таблица 1
Мониторинг распространения серотипов E. coli при выявлении колибактериоза птиц в Иркутской области
(по данным ветеринарной отчетности ФГБУ «ИМВЛ»)

Серотипы E. coli, %														
2006 г.			2007 г.			2008 г.			2009 г.			2010 г.		
Объекты выделения			Объекты выделения			Объекты выделения			Объекты выделения			Объекты выделения		
Патматериал	Эмбрионы	Фекалии	Патматериал	Эмбрионы	Фекалии	Патматериал	Эмбрионы	Фекалии	Патматериал	Эмбрионы	Фекалии	Патматериал	Эмбрионы	Фекалии
O33 – 24,6 O115 – 23,0 O142 – 26,0 O127 – 15,0 O126 – 12,0 O141 – 14,0 O157 – 12,0 O1 – 30,5 O41 – 12,0 O9 – 37,0 O10 – 37,0 O78 – 37,0 O139 – 15,0 O26 – 15,0 O86 – 15,0 O17 – 15,0 O15 – 2,6 O2 – 1,0 O56 – 0,5	O111 – 43,0 O137 – 20,0 O78 – 20,0 O157 – 20,0 O41 – 20,0 O117 – 20,0 O26 – 20,0 O113 – 5,8 O142 – 4,3 O135 – 4,3	O149 – 20,0 O126 – 20,0 O55 – 20,0 O4 – 20,0 O41 – 20,0 O101 – 16,2 O115 – 7,6 O139 – 2,3 O86 – 16,2 O18 – 7,5 O127 – 26,8 O103 – 7,6 O78 – 11,1 O103 – 8,9 O15 – 8,9 O2 – 11,1 O103 – 8,9 O1 – 16,5 O115 – 6,0 O119 – 0,5 O111 – 1,0	O33 – 10,3 O8 – 11,5 O15 – 25,9 O1 – 1,5 O41 – 12,7 O9 – 22,1 O9 – 16,2 O101 – 6,4 O115 – 7,6 O117 – 19,6 O117 – 2,3 O86 – 5,0 O33 – 16,2 O18 – 3,8 O111 – 7,5 O127 – 8,9 O55 – 26,8 O103 – 8,9 O15 – 8,9 O2 – 11,1 O103 – 8,9 O1 – 16,5 O119 – 0,5 O111 – 1,0	O137 – 54,0 O78 – 6,3 O17 – 43,5 O8 – 12,7 O127 – 20,9 O9 – 6,4 O115 – 15,0 O117 – 10,7 O117 – 10,7 O117 – 8,2 O111 – 4,3 O55 – 4,3 O15 – 3,3 O2 – 4,4 O103 – 2,0 O1 – 4,4 O119 – 0,8 O115 – 0,4 O137 – 2,0 O26 – 0,4 O78 – 2	O4 – 31,8 O26 – 5,7 O103 – 16,6 O4 – 15,0 O33 – 20,2 O15 – 23,1 O35 – 15,5 O101 – 8,1 O2 – 16,1 O119 – 10,7 O157 – 8,2 O8 – 4,0 O141 – 4,3 O138 – 3,3 O139 – 4,4 O20 – 2,0 O55 – 4,4 O127 – 0,8 O115 – 0,4 O137 – 2,0 O26 – 0,4 O78 – 2	O26 – 16,6 O103 – 28,9 O4 – 16,6 O9 – 16,6 O15 – 20,8 O35 – 16,6 O33 – 3,3 O101 – 16,6 O41 – 16,6 O26 – 33,3 O119 – 33,3 O10 – 11,7 O8 – 18,0	O141 – 16,6 O26 – 16,6 O15 – 16,6 O35 – 16,6 O9 – 16,6 O111 – 16,6 O78 – 5,0 O1 – 3,9 O111 – 3,3 O119 – 3,3 O115 – 2,5 O15 – 1,6 O103 – 10,0 O127 – 1,6 O8 – 5,9 O101 – 1,5 O126 – 0,6 O117 – 0,6 O86 – 0,6 O139 – 0,6 O55 – 5,7 O26 – 3,0 O11 – 5,2	O33 – 17,8 O41 – 22,2 O18 – 22,2 O9 – 12,8 O157 – 64,0 O106 – 10,6 O2 – 7,1 O18 – 6,1 O4 – 6,9 O78 – 5,0 O1 – 3,9 O111 – 3,3 O119 – 3,3 O115 – 2,5 O15 – 1,6 O103 – 10,0 O127 – 1,6 O8 – 5,9 O101 – 1,5 O126 – 0,6 O117 – 0,6 O86 – 0,6 O139 – 0,6 O55 – 5,7 O26 – 3,0 O11 – 5,2	O41 – 22,2 O18 – 22,2 O9 – 12,8 O157 – 64,0 O106 – 10,6 O2 – 7,1 O18 – 6,1 O4 – 6,9 O78 – 5,0 O1 – 3,9 O111 – 3,3 O119 – 3,3 O115 – 2,5 O15 – 1,6 O103 – 10,0 O127 – 1,6 O8 – 5,9 O101 – 1,5 O126 – 0,6 O117 – 0,6 O86 – 0,6 O139 – 0,6 O55 – 5,7 O26 – 3,0 O11 – 5,2	O11 – 33,3 O41 – 33,3 O9 – 33,3 O157 – 33,3 O106 – 10,6 O2 – 7,1 O18 – 6,1 O4 – 6,9 O78 – 5,0 O1 – 3,9 O111 – 3,3 O119 – 3,3 O115 – 2,5 O15 – 1,6 O103 – 10,0 O127 – 1,6 O8 – 5,9 O101 – 1,5 O126 – 0,6 O117 – 0,6 O86 – 0,6 O139 – 0,6 O55 – 5,7 O26 – 3,0 O11 – 5,2	O139 – 21,6 O26 – 13,6 O20 – 22,2 O103 – 12,0 O8 – 7,3 O119 – 1,7 O138 – 0,5 O2 – 13,6 O9 – 10,4 O18 – 8,8 O117 – 8,8 O141 – 3,1 O115 – 2,6 O27 – 0,3 O78 – 6,3 O33 – 5,2 O147 – 4,2 O15 – 2,1 O127 – 2,1 O1 – 0,5 O4 – 5,7 O27 – 0,2	O18 – 1,9 O33 – 7,3 O26 – 0,7 O86 – 7,0 O55 – 40,0 O8 – 15,3 O101 – 5,0 O35 – 15,3 O2 – 1,9 O4 – 0,9 O78 – 0,6	O41 – 25,0 O2 – 25,0 O117 – 50,0	

Результаты мониторинговых исследований по колибактериозу птицы в Иркутской области представлены в таблице 1. Следует отметить, что было исследовано 7499 образцов, включая патологический материал, эмбрионы и фекалии. Положительными на колибактериоз оказались 3840 проб, что составило 51,0 %. Возбудители колибактериоза выделялись из проб, доставленных в лабораторию из следующих хозяйств региона: СПХ «Окинский», ООО «Саянский бройлер» ОП «Меgetское», Сосновский филиал СХОАО «Белореченское», п. Базой Эхирит – Булагатского района; ЗАО «Братская птицефабрика», «Ангарская птицефабрика», частного сектора. Неблагополучными по колибактериозу птицы являются следующие районы Иркутской области: Иркутский, Зиминский, Куйтунский, Усольский, Усть-Удинский, Тулунский. При серологической диагностике было выявлено 45 серотипов *E. coli* (табл. 1).

В результате бактериологических исследований, проведенных ФГБУ «ИМВЛ» за последние 5 лет (2006 – 2010 гг.), было выявлено 194 случая сальмонеллеза птицы (табл. 2). В 2006 г. возбудителя данной инфекции выделили в 3 случаях из патоматериала птицы (возраст 6 – 7 дней, 14 – 20 дней) ПК «Окинский»; в 2-х случаях из патоматериала птицы частного сектора – Боханский район; в 1 случае из патоматериала птицы частного сектора – г. Нижнеудинск. *S. enteritidis* была выделена из желтка инкубационного яйца ООО «Саянский бройлер». В 2007 г. возбудителя сальмонеллеза (*S. enteritidis*) выделили из патоматериала птицы (3 случая – ООО «Саянский бройлер», 15 – ЗАО «Ангарская птицефабрика», 13 – Зиминский и Ангарский районы; Куйтунский район – 2 случая (*S. pullorum*), Черемховский район – 2 случая (*S. enteritidis*), Тулунский район – 1 случай (*S. enteritidis*). Из тушек птицы

сальмонелла была выделена в 6 случаях (1 – «Саянский бройлер», 1 – ООО «Саянский бройлер» ОП «Меgetское», 1 – СПХ «Окинский», 2 – Зиминский район, 1 – Ангарский район). Из эмбрионов – 14 случаев (ООО «Саянский бройлер» – 7, Ангарский район – 7 (*S. enteritidis*); из инкубационного яйца – в 2-х случаях (ООО «Саянский бройлер», 1 – УК, г. Ангарск). Из фекалий выделили *S. enteritidis* в 6 пробах (Иркутский район – 1; Черемховский район – 2 случая *S. pullorum*, в 3 случаях – частный сектор). В 2008 г. из патоматериала выделили *S. enteritidis* (Ангарский район – 5, Зиминский район – 2, Черемховский район – 1, Братский район – 3 случая). *S. enteritidis* выделили из эмбрионов птицы: 1 – СПХ «Окинский», 1 – Ангарский район, 6 – Братский район, 6 случаев – Зиминский район. В Черемховском районе – 1 случай (*S. enteritidis*), возбудитель выделен из фекалий. С поверхности тушек (2 – *S. enteritidis* – СПХ «Окинский», 2 – *S. enteritidis* – ООО «Саянский бройлер» ОП «Меgetское», 3 – ЗАО «Ангарская птицефабрика»). В 2009 г. из патологического материала были выделены *S. gallinarum* в Черемховском районе (1 случай), *S. enteritidis* в Зиминском р-не (2 случая), 2 случая (*S. gallinarum*) в Братском р-не и 2 случая в Иркутском районе (*S. enteritidis*, *S. machaga*). *S. enteritidis* выделили из трупа птицы из частного сектора, *S. machaga* – из трупа чайки филиала Иркутского цирка. С инкубационного яйца в 7 случаях была выделена *S. enteritidis* в Ангарском районе, в 7 случаях – *S. enteritidis* (6 – ООО «Саянский бройлер» ОП «Меgetское», 1 – частный сектор). *S. enteritidis* была выделена в 1 случае из эмбрионов птицы в Зиминском районе. В 2010 г. увеличилось количество положительных проб на сальмонеллез до 3,3 % от общего количества проб, которые были исследованы в ФГУ

Таблица 2

Мониторинг распространения сальмонеллеза птицы в Иркутской области
(по данным ветеринарной отчетности ФГБУ «ИМВЛ»)

Объекты выделения	2006 г.		2007 г.		2008 г.		2009 г.		2010 г.	
	Исследовано материала всего	Положительные пробы / %	Исследовано материала всего	Положительные пробы / %	Исследовано материала всего	Положительные пробы / %	Исследовано материала всего	Положительные пробы / %	Исследовано материала всего	Положительные пробы / %
Патологический материал	361	8/2,2	320	36/11,3	330	11/3,3	404	9/2,2	321	55/17,1
Эмбрионы птиц	226	6/2,7	1570	14/0,9	1479	14/0,9	752	1/0,1	794	2/0,3
Яйцо инкубационное	145	1/0,7	305	3/1,0	351	–	494	14/2,8	162	–
Тушки	116	–	148	6/4,1	159	7/4,4	121	–	103	–
Фекалии птиц	72	–	119	6/5,0	65	1/1,5	208	–	108	–
Сыворотки птиц	–	–	–	–	–	–	–	–	241	–
Всего:	920	15/1,6	2462	65/2,6	2384	33/1,4	1979	24/1,2	1729	57/3,3

«ИМВЛ». *S. enteritidis* была идентифицирована в 17 пробах (СХ ОАО «Белореченское»), *S. hamburg* — в 4-х пробах патоматериала (СПХ «Окинский»), в 4-х пробах патоматериала — Зиминский район, 30 пробах — *S. enteritidis* (Усольский район). *S. enteritidis* была выделена в 2-х случаях в Зиминском районе, объектом выделения явились эмбрионы птиц.

Для лечения и профилактики острых желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственной птицы широко используются антибиотики, сульфаниламидные препараты, нитрофураны в комплексе с иммуномодулирующими средствами, витаминами. Однако это не всегда дает положительный эффект [9, 11]. Рынок предоставляет сегодня широкий спектр вакцин для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта инфекционной этиологии как российского, так и зарубежного производства. Эффективная вакцинопрофилактика, как правило, предотвращает появление клинических признаков у птицы. В птицеводстве в настоящее время широко используются также пробиотические препараты для коррекции микробиоценоза желудочно-кишечного тракта цыплят [2, 3, 6, 8]. Пробиотики широко востребованы, так как механизм действия их в отличие от антибиотиков направлен не на уничтожение части популяции кишечных микроорганизмов, а на заселение кишечника конкурентоспособными штаммами бактерий пробиотиков, которые осуществляют неспецифический контроль над численностью условно-патогенной микрофлоры путем вытеснения ее из состава кишечного микробиоценоза. Однако и использование пробиотиков также не всегда эффективно.

Таким образом, желудочно-кишечные болезни молодняка сельскохозяйственной птицы были и остаются одной из главных проблем в хозяйствах практически всех районов Иркутской области. В условиях иммунодефицитов, как следствия воздействия разного рода факторов, необходимы новые комплексные подходы к организации противозoonотических мероприятий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования установлено, что эпизоотологическая ситуация по желудочно-кишечным инфекциям сельскохозяйственной птицы последние годы в Иркутской области не улучшилась. Результаты мониторинговых исследований свидетельствуют о том, что массовые желудочно-кишечные заболевания сельскохозяйственной птицы вызываются широким спектром представителей условно-патогенной микрофлоры. Микробные ассоциации в большинстве своем представлены микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* — родов *Escherichia* и *Salmonella*. Однако на про-

тяжении 5 лет наблюдали не только широкое разнообразие серологических вариантов кишечной палочки и сальмонеллы, но и колебание их соотношения в общей структуре выделенных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антиоксидантные свойства препаратов последнего поколения — продуктов биотехнологии: обнаруженные эффекты, механизмы действия / В.А. Чхенкели [и др.] // Вестник ИрГСХА. — 2012. — Вып. 49. — 181–191 с.
2. Ижбулатова Д.А., Деблик А.Г., Маликова А.Р. Влияние пробиотиков на морфофункциональное состояние органов цыплят // Ветеринария. — 2008. — № 3. — С. 52–55.
3. Кухаренко Н.С., Кухаренко А.А., Кухаренко О.И. Дисбактериозы животных и птиц (инновационные подходы лечения и профилактики). — Благовещенск: ДальГАУ, 2010. — 193 с.
4. Лечебно-профилактическая эффективность препарата Леван-2 на основе продуктов глубинного культивирования базидиомицета *Trametes pubescens* (Shumach:Fr.) Pilat. при колибактериозе телят / В.А. Чхенкели [и др.] // Вестник ИрГСХА. — 2011. — Вып. 43. — С. 118–125.
5. Некоторые аспекты изучения антимикробной активности грибов — ксилотрофов рода *Trametes* / В.А. Чхенкели [и др.] // Сибирский медицинский журнал. — № 2. — 2011. — С. 82–86.
6. Панин А.Н., Малик Н.И. Пробиотики — неотъемлемый компонент рационального кормления животных // Ветеринария. — 2006. — № 7. — С. 3–7.
7. Перспективы применения препарата на основе гриба-ксилотрофа рода *Trametes* для профилактики бактериальных инфекций у цыплят / В.А. Чхенкели [и др.] // Известия ВУЗов. Прикладная биохимия и биотехнология. — 2011. — № 1. — С. 87–94.
8. Пробиотики и микронутриенты при интенсивном выращивании цыплят кросса Смена / Г.А. Ноздрин [и др.]. — Новосибирск: НГАУ, 2009. — 207 с.
9. Старосельский А. Проблемы и пути решения сальмонеллезной инфекции в современном птицеводстве // Ветеринария. — 2010. — № 2. — С. 13–15.
10. Чхенкели В.А., Шкиль Н.А., Тихонов В.Л. Система мероприятий по лечению и профилактике желудочно-кишечных заболеваний телят в Иркутской области : Методические рекомендации. — Иркутск, 2010. — 62 с.
11. Эпизоотическая ситуация по сальмонеллезам птиц в России / С.С. Яковлев [и др.] // Ветеринария. — 2008. — № 6. — С. 12–14.

Сведения об авторах

Чхенкели Вера Александровна — зав. кафедрой анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО ИрГСХА, профессор, д.б.н. (664007, г. Иркутск, ул. Декабрьских событий, 105а, кв. 12. Тел.:(3952)387798; 89501290770)

Анисимова Анна Валерьевна — аспирант каф. анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО ИрГСХА (664049, г. Иркутск, м-он Юбилейный, 77, кв. 9).

Горьева Нина Андреевна — аспирант каф. анатомии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО ИрГСХА (664022, г. Иркутск, ул. Комсомольская, 35).

Н.А. Шарапова, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов,
Н.Е. Терешкина, Е.А. Михеева, Л.В. Савицкая, А.В. Гаева, А.К. Никифоров

ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДА ИЗ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253» И КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ЕГО ОСНОВЕ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Описаны результаты выделения гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» с применением неионного детергента с последующей хроматографической очисткой. Показана возможность применения полученного антигена вируса бешенства в качестве иммунореагента при конструировании диагностикума путем конъюгации с наночастицами коллоидного золота для выявления специфических антител в иммунных сыворотках лошадей-продуцентов и в препарате антирабического иммуноглобулина в дот-иммуноанализе.

Ключевые слова: гликопротеид, фиксированный вирус бешенства, диагностикум

ISOLATION OF GLICOPROTEID FROM THE FIXED RABIES VIRUS, STRAIN «MOSCOW 3253», AND CONSTRUCTING OF DOT-IMMUNOASSAY DIAGNOSTICUM ON ITS BASIS

N.A. Sharapova, M.N. Kireyev, E.G. Abramova, S.V. Generalov, Zh.V. Matveyeva,
I.M. Zhulidov, N.E. Tereshkina, E.A. Mikheyeva, L.V. Savitskaya, A.V. Gayeva, A.K. Nikiforov

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

Described here are the results of glicoproteid isolation from the fixed rabies virus, strain «Moscow 3253», using non-ionic detergent with subsequent chromatographic purification. The obtained antigen was demonstrated to be applicable as immunoreagent for construction of diagnosticum, by means of conjugation with colloid gold nanoparticles. The diagnosticum is meant for detection of specific antibodies in immune sera of horses-producers, and in the preparation of anti-rabies immunoglobulin, in dot-immunoassay.

Key words: glicoproteid, fixed rabies virus, diagnosticum

ВВЕДЕНИЕ

Учитывая широкое распространение бешенства и возрастающий объем проводимых лечебно-профилактических мероприятий, конструирование и усовершенствование диагностикумов для выявления антирабических антител остаётся актуальной проблемой [1, 9–11].

Гликопротеид, входящий в состав наружного белкового слоя липопротеиновой оболочки рабдо-вирусов и образующий на поверхности вириона шипы длиной 5–10 нм, играет ведущую роль в прикреплении вирионов в клетке и определяет типовую специфичность рабдо-вирусов [1, 2, 6, 9, 12, 15]. Гликопротеид является наиболее мощным иммуногеном, индуцирующим образование вируснейтрализующих антител, что позволяет рассматривать его как эффективный иммунореагент для конструирования диагностикумов, достоинством которых является отсутствие балластных внутренних компонентов вируса, способствующих проявлению неспецифических реакций и исключение инфекционного материала при анализе [2, 9].

Технология получения очищенных гликопротеидов связана с решением двух основных проблем: дезинтеграцией вирусных частиц, очисткой гликопротеидов от субвирусных компонентов и солюбилизирующего агента. В основном для дезинтеграции вирусных частиц применяют детергенты [1, 2, 4, 8, 9]. В литературе описано большое

количество методов и различных детергентов, с помощью которых удается извлечь поверхностные гликопротеиды вирусов гриппа, парагриппа, вено-сузального энцефаломиелита лошадей, клещевого энцефалита, герпеса и бешенства [1–4, 8, 9]. Наиболее мягкое и селективное действие на вирусную оболочку оказывают неионные детергенты. Из неионных детергентов для получения вирусных гликопротеидов чаще всего применяется тритон X-100 [ПЭГ-(9-10)-p-t-октилфенол]. Обработка вирусов данным детергентом не сопровождается солюбилизацией липидного компонента и выходом в раствор внутренних вирусных белков. Это позволяет получать препараты высокой степени чистоты. Для отделения солюбилизованных гликопротеидов от внутренних вирусных белков используют гель-фильтрационную хроматографию, центрифугирование и диализ. Диализом могут быть удалены низкомолекулярные и хорошо растворимые вещества. Следует подчеркнуть, что очистка от детергента является одним из основных этапов процесса получения очищенных, биологически активных гликопротеидов [2].

Целью настоящего исследования явилось выделение и очистка гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», его характеристика и конструирование на основе выделенного антигена диагностикума для определения титра антирабических антител в дот-иммуноанализе (ДИА).

МЕТОДИКА

Фиксированный вирус бешенства (штамм «Москва 3253») выращивали в культуре перевиваемых клеток Vero. Вирус очищали гель-хроматографией и концентрировали тангенциальной ультрафильтрацией. Гликопротеид вируса бешенства выделяли из концентрированного тангенциальной ультрафильтрацией и очищенного гель-хроматографией фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» культурального происхождения. Работы по получению и инаktivации культурального вируса бешенства проводили в соответствии с МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства».

Для выделения гликопротеида использовали известную методику [13]. Тритон X-100 добавляли к суспензии очищенного и концентрированного фиксированного вируса бешенства (концентрация 5,9 мг/мл) до конечной концентрации 2 %. Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин и охлаждали на ледяной бане (5 мин). Затем смесь центрифугировали на Eppendorf 5415R при 13000 об/мин в течение 2,5–3 ч при температуре 4 °C. Супернатант, содержащий G-белок, диализовали против раствора бикарбоната аммония 0,01M NH_4HCO_3 pH 7,8 в течение 48 ч со сменой буфера через 8 ч и лиофилизировали на установке для лиофилизации «ALPHA I-5».

Леофилизированный материал растворяли в 1 мл деионизованной воды и осаждали в 15 объемах охлажденного ацетона путем центрифугирования на Eppendorf 5415R при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °C. Далее преципитат отмывали однократно охлажденным до температуры минус 20 °C этанолом путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 4 °C, затем дважды отмывали горячим этанолом (56 °C) центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при температуре 22 °C. Осадок растворяли в 1 мл раствора 0,01 M NH_4HCO_3 (pH 7,8) и леофилизировали. Далее полученный препарат растворяли в 1 мл деионизованной воды и проводили гель-фильтрацию на хроматографической системе «ЛКВ». В качестве носителя использовали TSK-гель HW-65, упакованный в хроматографическую колонку размером 15 × 250 мм, уравновешенную 3 свободными объемами 0,01 M фосфатного буфера pH 7,3, содержащего 0,137 моль/л NaCl и 0,0027 моль/л KCl (буфер элюции). Подготовленную пробу наносили на колонку в объеме 0,5–1 мл. Выход белков контролировали на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм. Степень очистки оценивали с помощью электрофореза в 12 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) и с набором белков стандартной молекулярной массы: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), овальбумин (45 кДа).

Содержание белка в полученном препарате определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Для характеристики антигенных свойств гликопротеида проводили иммунизацию мышей инбредной линии BALB/c массой 18–20 г (питомник РосНИПЧИ «Микроб»), прошедшим контроль генетической стандартности лабораторных животных инбредных линий. Манипуляции с животными проводили в соответствии с Приказом № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» (2003) и «Положением о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2003). Животных иммунизировали следующими антигенами: изолированным гликопротеидом; цельным вирусом культурального происхождения; гликопротеидом с наночастицами коллоидного золота в качестве адьюванта и гликопротеидом с полным адьювантом. Антиген вводили в дозе 25 мкг/мышь при первой иммунизации и 50 мкг/мышь в последующие четыре иммунизации. Отрицательным контролем служили сыворотки мышей, которым вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия. Антигены вводили внутривентрально с двухнедельным интервалом. Первое введение антигена с полным адьювантом Фрейнда осуществляли подкожно. Кровь для исследования на наличие специфических антител брали из хвостовой вены после третьей и пятой иммунизаций на пятые сутки после инъекции. Уровень специфических антител в сыворотках определяли в ИФА с использованием антивидового пероксидазного конъюгата.

Охарактеризованные образцы очищенного гликопротеида объединяли, леофилизировали и использовали в качестве иммунореагента для конструирования диагностикума для прямого ДИА [7] и для сенсибилизации твердой фазы при постановке непрямого ДИА. В качестве маркера при изготовлении диагностикума использованы наночастицы коллоидного золота со средним диаметром частиц 15–17 нм, которые получали по методу Г. Френса с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя золотохлористоводородной кислоты при 100 °C [14]. В качестве подложки (твердой фазы) при постановке ДИА применяли расчерченную на квадраты НЦМ с размером пор 0,45 мкм («Millipore»).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате выделения и хроматографической очистки гликопротеида из вируса бешенства на хроматограмме регистрировали два пика, где первый пик предположительно соответствовал конгломератам недезинтегрированного вируса, а второй пик — гликопротеиду с молекулярной массой около 65 кДа, по данным электрофореза. На рисунке 1 «Электрофореграмма гликопротеида вируса бешенства на этапах очистки» представлены данные электрофореза выделенного гликопротеида в сравнении с овальбумином и БСА. Полученные данные подтверждают литературные данные, согласно которым молекулярный вес гликопротеида вируса бешенства составляет 65–90 кДа, в зависимости от способа получения и исходного материала [1, 5, 6, 10].

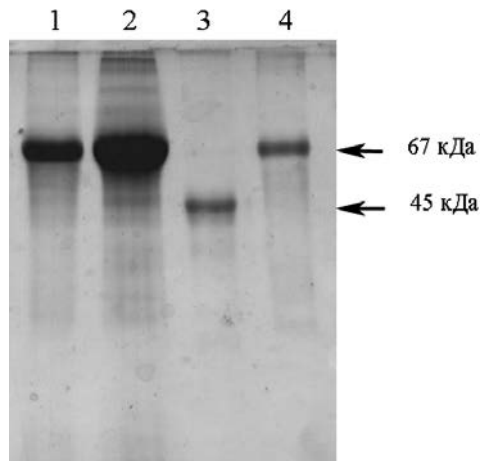


Рис. 1. Электрофореграмма гликопротеида вируса бешенства на этапах очистки. **1** – очищенный гликопротеид фиксированного вируса бешенства; **2** – препарат после осаждения ацетоном и этанолом; **3** – овалбумин (45 кДа); **4** – БСА (67 кДа).

При определении содержания белка в изолятах зафиксированы следующие данные: во фракции, соответствующей 1 пику, уровень содержания белка составил 0,28 мг/мл; во фракции, соответствующей 2 пику – 0,65 мг/мл.

Сыворотки, полученные в результате иммунизации мышей, характеризовались следующими титрами специфических антител: 1/80 – при введении цельного вируса бешенства; 1/160 – 1/320 – при использовании гликопротеида без адьюванта; 1/640 – при иммунизации гликопротеидом с коллоидным золотом и 1/640 – 1/1280 – при инъекциях гликопротеида с полным адьювантом Фрейнда. По результатам наших исследований, иммуногенность очищенного гликопротеида была выше иммуногенности цельного вируса бешенства, причем наибольшей способностью к индукции вируснейтрализующих антител обладал гликопротеид, введенный совместно с полным адьювантом Фрейнда.

На рисунке 2 «Результаты прямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота» представлены результаты определения уровня специфических антител в иммунных сыворотках лошадей-продуцентов и препарате антирабического иммуноглобулина в прямом варианте ДИА, где гликопротеид вируса бешенства использовали как иммунореагент при конструировании диагностикума на основе гликопротеида и наночастиц коллоидного золота. Используемые в качестве маркера при изготовлении диагностикума наночастицы коллоидного золота со средним диаметром частиц 15–17 нм обеспечивают интенсивное розовое или красно-коричневое окрашивание пятен, соответствующих положительной реакции последовательных разведений исследуемых образцов с конъюгатом. Главное преимущество диагностикумов с использованием очищенного гликопротеида заключается в специфичности, поскольку в этом случае анализ настроен на выявление вируснейтрализующих антител. За

титр сыворотки или иммуноглобулина принимали наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно. При исследовании гипериммунных сывороток лошадей-продуцентов в прямом ДИА с применением конъюгата, выявили титры специфических антител на уровне 1:320 – 1:640 при отрицательном результате с нормальной лошадиной сывороткой. Такие же титры были получены при исследовании данных сывороток в непрямом ДИА, при постановке которого в качестве сорбируемого на твердой фазе антигена использовали выделенный гликопротеид. Специфическая активность коммерческого препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, выявленная аналогичными методами, составила 1:5000 – 1:10000.

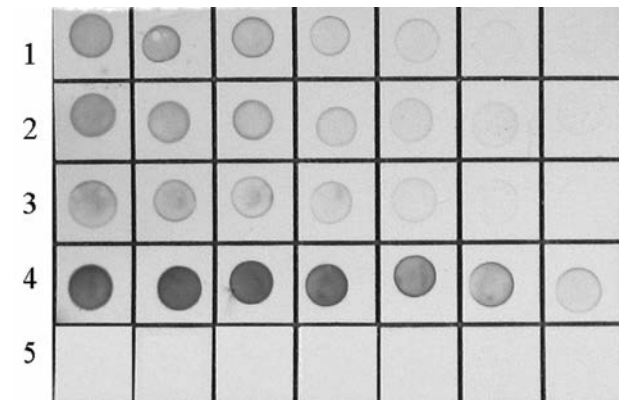


Рис. 2. Результаты прямого дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота. По оси абсцисс: двукратные разведения антирабических сывороток с 1 : 40 и антирабического иммуноглобулина с 1 : 160; по оси ординат: **1–3** ряды – гипериммунные лошадиные сыворотки; **4** ряд – гетерологичный антирабический иммуноглобулин; **5** ряд – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выделенный из фиксированного вируса бешенства штамма Москва «3253» с помощью неионного детергента гликопротеид с последующей хроматографической очисткой на TSK-геле HW-65 охарактеризован по молекулярной массе и антигенным свойствам. Впервые на основе гликопротеида и наночастиц коллоидного золота сконструирован диагностикум для определения уровня специфических антител в иммунных антирабических сыворотках лошадей-продуцентов и препарате антирабического иммуноглобулина при производстве данного лечебно-профилактического средства.

ЛИТЕРАТУРА

- Акиньшина Т.В. Разработка набора реагентов для оценки эффективности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства в серологических реакциях : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Щёлково, 2005. – 28 с.
- Березин В.Э., Зайдес В.М., Жданов В.М. Гликопротеиды оболочечных вирусов, получение

очищенных препаратов и оценка иммуногенных свойств // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина, 1986. — № 3. — Т. 31. — С. 262–274.

3. Выделение гликопротеидов вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей и оценка их иммуногенной активности / В.Э. Березин [и др.] // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина. — 1985. — № 5. — Т. 30. — С. 568–572.

4. Карпова Е.Ф., Цилинский Я.Я. Гликопротеиды вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей. Получение и антигенные свойства // Методы исследования в молекулярной, общей и медицинской вирусологии. — М., 1987. — С. 49–51.

5. Кротова Л.И. Изучение структурных белков вируса бешенства : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — М., 1985. — 25 с.

6. Медицинская вирусология: Руководство / под ред. Д.К. Львов. — М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. — 656 с.

7. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2009. — Вып. 1 (103). — С. 63–66.

8. Подавление инфекционности оболочечных вирусов с сохранением специфической биологической активности вирусных белков / В.Э. Березин

[и др.] // Вопросы вирусологии. — М.: Медицина, 1986. — № 4. — Т. 31. — С. 475–479.

9. Рахманин П.В. Иммуноферментная тест-система определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Щелково, 2008. — 29 с.

10. Тимиргалеев Р.В. Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител : автореф. дисс. ... канд. ветер. наук. — Казань, 2006. — 24 с.

11. Эпизоотическая ситуация при бешенстве в Саратовской области / В.И. Еремин [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. Инфекционные болезни. — 2011. — № 4, Т. 7. — С. 860–862.

12. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies virus glycoprotein. Biological and serological characterization // Infection and immunity. — 1977. — Vol. 16, N 3. — P. 754–759.

13. Dietzschold B. Oligosaccharides of the glycoprotein of rabies virus // Journal of virology. — 1977. — Vol. 23, N 2. — P. 286–293.

14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension // Nat. Phys. Sci. — 1973. — Vol. 241, N 105. — P. 20–21.

15. Mcallister P.E. and Wagner R. R. Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses // Journal of virology. — 1975. — Vol. 15, N 4. — P. 733–738.

Сведения об авторах

Шарапова Наталия Анатольевна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (г. Саратов, 410012, ул. Рахова, д. 137, кв. 84; e-mail: podbor_nat@mail.ru)

Киреев Михаил Николаевич — зав. лабораторией биохимии и протеомики, к. мед. н., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Абрамова Елена Геннадьевна — к.б.н., зав. лабораторией профилактических иммуноглобулинов, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Генералов Сергей Вячеславович — к.б.н., н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Матвеева Жанна Владимировна — н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Жулидов Иван Михайлович — биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Терешкина Наталья Евгеньевна — к.м.н., с.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Михеева Елена Александровна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Савицкая Лидия Владимировна — врач-бактериолог Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Гаева Анна Вячеславовна — м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Никифоров Алексей Константинович — к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Л.Н. Яшина ¹, С.А. Абрамов ², Г.Н. Данчинова ³, В.В. Гуторов ¹, Р. Янагихара ⁴**ХАНТАВИРУС SEEWIS (SWSV) И ЕГО ПРИРОДНЫЕ НОСИТЕЛИ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ**¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.)² Институт систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск)³ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)⁴ Гавайский университет в Маноа (Гавайи, США)

Представлено генетическое доказательство циркуляции хантавирусов среди насекомоядных в России. На территории Сибири установлено широкое распространение хантавируса Seewis (SWSV), открытого в Швейцарии от обыкновенной бурозубки. Впервые показано, что вирус SWSV встречается у нескольких близкородственных видов бурозубок: *Sorex araneus*, *S. tundrensis* и *S. daphaenodon*. Очаги циркуляции вируса SWSV выявлены в Республике Алтай, Красноярском крае, Кемеровской, Новосибирской областях и в окрестностях городов Новосибирск и Иркутск.

Ключевые слова: хантавирус, бурозубки, Сибирь

HANTAVIRUS SEEWIS AND RESERVOIR SPECIES IN SIBERIAL.N. Yashina ¹, S.A. Abramov ², G.A. Danchinova ³, R. Yanagihara ⁴¹ State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo² Institute of Systematic and Ecology of Animals, SB RAS, Novosibirsk³ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk⁴ University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA

Genetic evidence of shrew-borne hantavirus in Russia is presented here. Impressive distribution of a hantavirus Seewis (SWSV), previously discovered in the Eurasian common shrew from Switzerland was demonstrated in Siberia among closely related shrew species: *Sorex araneus*, *S. tundrensis* and *S. daphaenodon*. SWSV circulation was shown in Altai Republic, Krasnoyarsk Krai, Kemerovo and Novosibirsk regions, suburbs of Novosibirsk and Irkutsk Cities.

Key words: hantavirus, shrews, Siberia

ВВЕДЕНИЕ

Хантавирусы, принадлежащие к роду *Hantavirus* семейства *Bunyaviridae*, широко распространены во многих регионах мира и являются возбудителями двух клинически различных форм заболевания человека: геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Евразии и хантавирусного легочного синдрома в Северной и Южной Америке [11]. Природным резервуаром хантавирусов являются грызуны отряда Rodentia, причем каждый хантавирус ассоциирован с уникальным видом или несколькими близкородственными видами. Эпизоотологические исследования мелких млекопитающих, проводимые в очагах ГЛПС в России, давали основание предполагать, что бурозубки и кроты также могут служить резервуаром хантавирусов [1–3], однако прямые доказательства циркуляции хантавирусов в популяциях насекомоядных отсутствовали.

До недавнего времени единственным исключением из ассоциаций хантавирус — грызун был вирус Thottapalayam (TPMV), изолированный не от грызуна, а от представителя насекомоядных — азиатской гигантской белозубки (*Suncus murinus*), отловленной в Индии [14]. В течение пяти последних лет были получены доказательства того, что природными носителями хантавирусов являются

не только грызуны, но и насекомоядные семейств Soricidae и Talpidae, у которых обнаружено 12 новых хантавирусов [6, 12]. На территории Европы выявлены вирусы Seewis (SWSV) в обыкновенной бурозубке (*Sorex araneus*) из Швейцарии и Nova (NVAV) в европейском обыкновенном кроте (*Talpa europaea*) из Венгрии [6, 12]. Распространение хантавирусов, имеющих природными резервуарами насекомоядных, и возможность инфицирования этими вирусами человека остаются важными нерешенными задачами. Нами был проведен поиск и изучение генетического многообразия хантавирусов в популяциях насекомоядных семи административных регионов Сибири.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отлов животных и сбор образцов тканей проведены в различных биоценозах на территории Западной и Восточной Сибири (Республике Алтай, Алтайском и Красноярском краях, Новосибирской, Омской, Кемеровской и Иркутской областях) в период 2007–2008 гг.

Отлов мелких млекопитающих и отбор образцов осуществляли в соответствии с протоколом и рекомендациями по безопасной работе [9]. Образцы тканей легких помещали в жидкий азот, либо в стабилизирующий раствор RNAlater RNA

Stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Германия) для последующего выделения РНК и ее анализа методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ – ПЦР).

Вид землероек определен на основе строения тела и зубного аппарата специалистами-зоологами в Институте систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск). Дополнительно для подтверждения таксономической принадлежности бурозубок проведено определение и сопоставление с базой данных GenBank фрагмента гена цитохрома b митохондриальной ДНК (мтДНК) по методу, описанному в [9].

Вирусную кДНК синтезировали с использованием Expand reverse transcriptase (Roche, Германия) и родоспецифического праймера HPS (5'-TAGTAGTAGACTCC). Продукты двухраундовой амплификации получали с использованием двух серий праймеров по стандартному протоколу с использованием Taq ДНК-полимеразы производства фирмы «Сибэнзим» (Новосибирск). Первая серия праймеров и условия проведения реакции были описаны ранее [10], вторая серия праймеров была выбрана авторами. Для первого раунда использован праймер, комплементарный 5'- и 3'-концам S-сегмента генома S2FR: 5'-TAGTAGTA(G/T)(G/A)CTCCCTAAA(G/A)AG, для второго раунда использована пара праймеров: 387(+) G(A/T)GG(A/C/T)CA(G/A)AC(A/T)GCAGA(C/T)TGG и 1263(-) AGCTCAGGATCCATGTCATC.

Для построения филогенетических деревьев использован метод максимального правдоподобия с моделью эволюции GTR+I+Г в программе RAUP 4.0b10, выполненный на сервере RAXML Blackbox [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для анализа географического распространения и генетического разнообразия хантави-

русов, циркулирующих в землеройковых (сем. Soricidae) в Сибири, ткани легких от 90 бурозубок (45 обыкновенных (*S. araneus*), 28 тундряных (*S. tundrensis*), 5 средних (*S. caecutiens*), 3 крупнозубых (*S. daphaenodon*), 9 малых (*S. minutus*)) и 6 сибирских белозубок (*Crocidura sibirica*) были проанализированы методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров для L- и S-сегментов генома. Хантавирусная РНК была выявлена в образцах тканей 15 бурозубок, отловленных в 7 из 11 исследованных ключевых участков: северное побережье Телецкого озера (с. Артыбаш, Турочакский р-н, Республика Алтай), Крапивинский р-н (Кемеровская обл.), окрестности г. Карасук и лесопарковая зона Новосибирского Академгородка (Новосибирская область), с. Парная (Шарыповский р-он Красноярского края), Западный Саян (Красноярский край) и окрестности г. Иркутска (Иркутская область) (табл. 1).

Анализ последовательностей L- (2968 – 3313 н.о.) и S-сегментов (407 – 1243 н.о.) генома РНК изолятов от 11 *S. araneus*, двух *S. tundrensis*, двух *S. daphaenodon* показал их сходство с вирусом SWSV, ранее выявленным от *S. araneus* в Швейцарии [6]. Установлено, что выявленные вирусные последовательности являются новыми генетическими вариантами вируса SWSV и отличаются от изолята mр70 из Швейцарии на 16,3 – 20,2 % по нуклеотидным последовательностям и на 1,7 % по кодируемым аминокислотным последовательностям для L-сегмента, и на 17,4 – 19,1 % и 1,4 % для S-сегмента, соответственно. Выравнивание и сравнение новых последовательностей между собой установило уровень вариабельности геномов сибирских изолятов вируса SWSV 0 – 11,0 % н.о. и 0 % а.о. для L-сегмента и 0,2 – 8,5 % н.о. и 0 % а.о. для S-сегмента, соответственно. Уровень от-

Таблица 1

РНК изоляты вируса SWSV, выявленные в Сибири в бурозубках рода *Sorex*

Вид	Место отлова	РНК изолят	GenBank #
<i>S. araneus</i>	Республика Алтай, Телецкое	Telet-Sa300	GQ284578, EU424334
		Telet-Sa301	GQ284577, EU424335
		Telet-Sa313	GQ284579, EU424336
		Telet-Sa321	GQ284575, EU424337
		Telet-Sa500	GQ284576, EU424338
	Кемеровская обл., Крапивино	Kemerovo-Sa65	GQ284582, GQ267812
	Новосибирская обл., Новосибирск	Novosib-Sa374	GQ284581, GQ267804
	Новосибирская обл., Карасук	Karasuk-Sa56	GQ284586, GQ267809
	Красноярский край, Западный Саян	Krasn-Sa5	GQ284584, GQ267811
		Krasn-Sa6	GQ355616, GQ284583
	Красноярский край, Парная	Parnaya-Sa1220	GQ284580, GQ267810
<i>S. daphaenodon</i>	Иркутская обл., Иркутск	Irkutsk-Sd456	GQ284572, GQ267805
		Irkutsk-Sd475	GQ284573, GQ267806
<i>S. tundrensis</i>	Иркутская обл., Иркутск	Irkutsk-St489	GQ284574, GQ267807
	Новосибирская обл., Карасук	Karasuk-St2	GQ284585, GQ267808

личия новых нуклеотидных последовательностей от других ранее известных типов хантавирусов, выявленных у грызунов и насекомоядных, варьирует от 24,5 до 35,6 % и от 31,9 до 48,4 %, соответственно.

Новые последовательности группировались по географическому принципу. Нуклеотидные последовательности изолятов из одного места отлова показали минимальные различия, даже в том случае, если они были выявлены от разных видов насекомоядных. Так, нуклеотидные последовательности вирусных изолятов от *S. araneus* и *S. tundrensis*, отловленных в окрестностях города Карасук Новосибирской области, были идентичными для L-сегмента и отличались на 0,2 % для S-сегмента. Аналогичным образом, нуклеотидные последовательности S- и L-сегментов изолятов от *S. daphaenodon* и *S. tundrensis*, отловленных в окрестностях г. Иркутска, различались на 0,3–0,6 % и 0,9–1,2 %, соответственно. Напротив, последовательности изолятов вируса SWSV, выявленных от пяти особей *S. araneus*, отловленных в окрестностях Телецкого озера, образовывали две отдельные группы и продемонстрировали достаточно высокий уровень межгрупповой дивергенции для L-сегмента (6,4–7,7 %). Уровень различия по-

следовательностей S-сегмента был ниже и составлял 0,9–2,4 %.

Филогенетический анализ, основанный на фрагментах 346 н.о. и 837 н.о. L- и S-сегментов, соответственно, продемонстрировал группирование изолятов вируса SWSV по географическому принципу независимо от вида бурозубок - носителей вируса (рис. 1). Полученные результаты не согласуются с данными о строгом соответствии между видом вируса и видом его носителя, опубликованным ранее для большинства хантавирусов, переносимых грызунами [11]. Выявленная корреляция между генетическими различиями изолятов вируса SWSV и географическим происхождением видов-носителей свидетельствует о локальной видо-специфической адаптации в ходе эволюции вируса.

Обыкновенная бурозубка, являясь широко распространенным видом, имеет один из наиболее вариабельных кариотипов среди мелких млекопитающих и образует более 70 хромосомных рас, распространенных на территории Европы и Сибири. Семь хромосомных рас в Сибири последовательно сменяют друг друга в направлении с запада на восток [4]. На основе опубликованных исследований можно предполагать, что, по крайней мере, четыре хромосомные расы обыкновенной

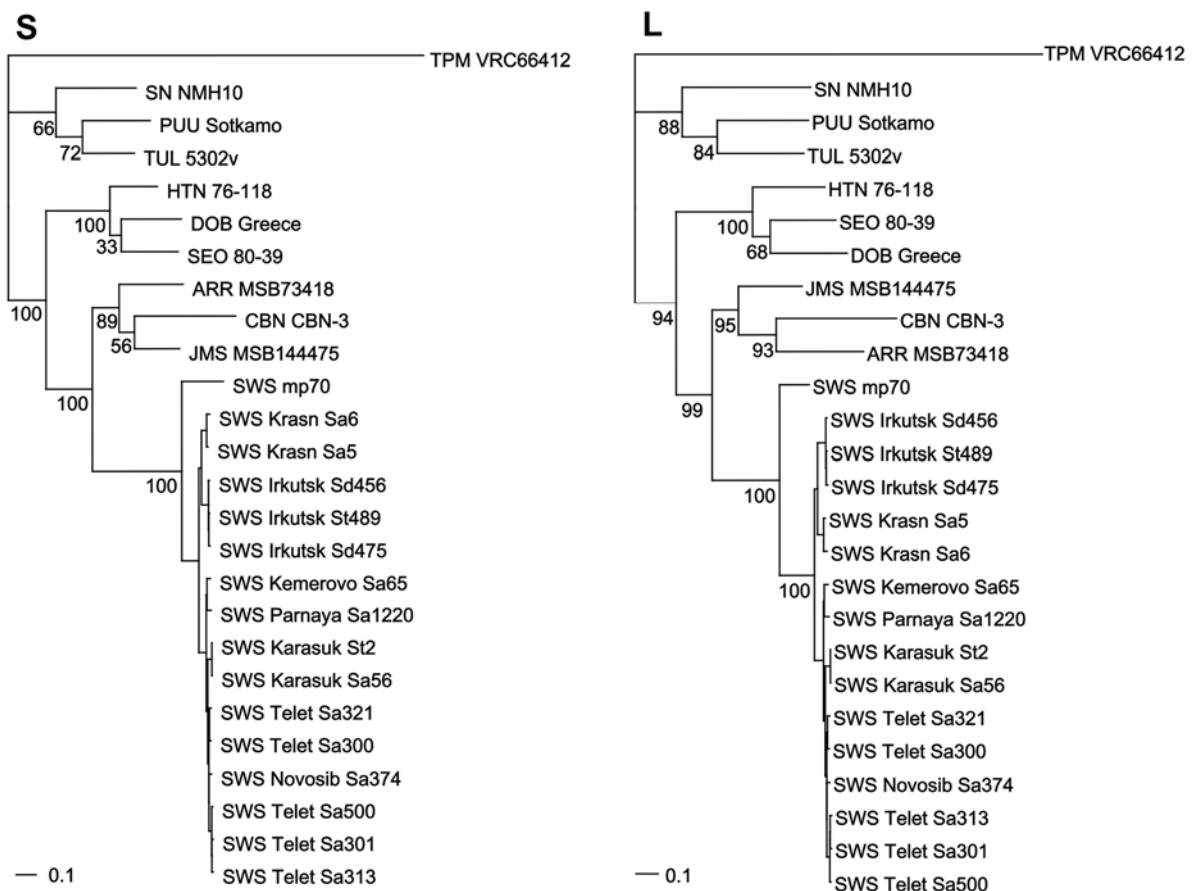


Рис. 1. Филогенетические деревья, отображающие объединение сибирских изолятов вируса SWSV по географическому признаку. Деревья построены на основе нуклеотидных последовательностей S- и L-сегментов генома длиной 837 и 346 н.о., соответственно, с использованием метода максимального правдоподобия, модель эволюции GTR+I+G, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов.

бурозубки обитают на изученной нами территории: Новосибирская раса (Novosib-Sa374), Томская раса (Kemerovo-Sa65 и Parnaya-Sa1220), раса Стрелка (Krasn-Sa5 и Krasn-Sa6) и Алтайская раса (Telet-Sa300, Telet-Sa301, Telet-Sa313, Telet-Sa321 и Telet-Sa500). Наши исследования показали высокий уровень дивергенции последовательностей L-сегмента (до 7,7 %) среди изолятов с Телецкого озера. Основываясь на гипотезе ко-эволюции хантавирусов и их хозяев, можно предположить, что две различные группы изолятов SWSV с Телецкого озера могут иметь различную эволюционную историю и циркулируют не в единой Алтайской расе, а в двух различных расах. Второй расой может быть либо новая неизвестная раса, либо Семинская раса [4], которая была обнаружена в Республике Алтай на расстоянии 100 км от места отлова на Телецком озере.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы значительное внимание уделялось выявлению новых видов — носителей хантавирусов среди мелких млекопитающих, в частности, насекомых. Выполненное исследование является первым молекулярным доказательством циркуляции хантавирусов среди бурозубок в России. Нами установлено широкое распространение на территории Сибири вируса SWSV, открытого в 2007 г. в Швейцарии. Впервые показано, что вирус SWSV встречается у нескольких близкородственных видов бурозубок рода *Sorex*: *S. araneus*, *S. tundrensis* и *S. daphaenodon*. Очаги циркуляции вируса SWSV выявлены в Республике Алтай, Красноярском крае, Кемеровской, Новосибирской областях. Наши данные подтверждают более ранние публикации о выявлении хантавирусного антигена в *S. araneus* на территории России [1–3] и идентифицируют тип хантавируса. Основываясь на полученных нами данных, а также литературных данных по выявлению SWSV в Швейцарии [12], Венгрии и Финляндии [8], находках антигена хантавируса у *S. araneus* из европейской части России [2], можно сделать заключение о широком распространении вируса SWSV на территории географического распространения обыкновенной бурозубки от Центральной и Северной Европы до Восточной Сибири. Широкое распространение SWSV может быть следствием исходного инфицирования хантавирусом предковой формы бурозубок с последующими переносами вируса между хозяевами и локальной адаптацией в течение длительного эволюционного времени.

Важнейшим нерешенным вопросом остается вопрос о патогенности для человека хантавирусов, циркулирующих среди насекомых. К настоящему времени получено лишь косвенное свидетельство инфицирования человека вирусом TRPMV, основанное на выявлении антител к вирусу TRPMV у людей [5]. Прямое генетическое доказательство ассоциации хантавирусов, выявленных от бурозубок и кротов, с заболеванием человека

в настоящее время отсутствует. Установленная нами циркуляция вируса SWSV в окрестностях больших городов (Новосибирска и Иркутска) и на территории с интенсивной туристической деятельностью (побережье Телецкого озера) дает веские основания для исследования роли выявленных вирусов в патологии человека.

Авторы искренне благодарны зоологам Т.А. Дунал, А.В. Кривопапову, В.В. Панову, А.А. Позднякову, Д.В. Петровскому из Института систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск), А.Ф. Тимошенко из Института эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (г. Иркутск), В.В. Виноградову из Красноярского государственного университета и Е.М. Лучниковой из Кемеровского государственного университета за их вклад в исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арбовирусы в Прибайкалье / Е.А. Чапоргина [и др.] // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2002. — № 2 (4). — С. 127–130.
2. Изучение циркуляции вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом среди мелких млекопитающих на территории СССР / Е.А. Ткаченко [и др.] // Вопр. вирусол. 1987. — № 32 (6). — С. 709–715.
3. Размещение природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом в различных ландшафтных зонах Тюменской области. / Ю.А. Мясников [и др.] // Вопр. вирусол. — 1992. — № 37 (3). — С. 161–165.
4. Хромосомная эволюция обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. в послеледниковое время на Южном Урале и в Сибири / А.В. Поляков [и др.] // Генетика. — 2001. — № 37 (4). — С. 448–455.
5. Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-born hantavirus. / M. Okumura [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. — 2007. — P. 173–181.
6. Evolutionary insights from a genetically divergent hantavirus harbored by the European common mole (*Talpa europaea*) / H.J. Kang [et al.] // PLoS One. — 2009. — Vol. 4. — e6149.
7. Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America / S.P. Morzunov [et al.] // J. Virol. — 1998. — Vol. 72. — P. 57–64.
8. Genetic diversity and phylogeography of Seewis virus in the Eurasian common shrew in Finland and Hungary / H.J. Kang [et al.] // Virol. J. — 2009. — Vol. 6. — P. 208.
9. Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing. U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention / J.N. Mills [et al.]. — Atlanta, 1995.
10. Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States / S. Arai [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2008. — Vol. 78. — P. 348–351.

11. Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem // *Emerg. Infect. Dis.* — 1987. — Vol. 3. — P. 95–104.

12. Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*) / J.-W. Song [et al.] // *Virol. J.* — 2007. — Vol. 4. — P. 114–118.

13. Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers // *Syst. Biol.* — 2008. — Vol. 57. — P. 758–771.

14. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India / D.E. Carey [и др.] // *Indian J. Med. Res.* — 1971. — Vol. 59. — P. 1758–1760.

Сведения об авторах

Яшина Людмила Николаевна – к.х.н., зав. лаб. ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (630559, р.п. Кольцово, Новосибирского р-на, Новосибирской обл.; тел. (383) 336-74-28)

Абрамов Сергей Александрович – к.б.н., с.н.с. Института систематики и экологии животных СО РАН

Данчинова Галина Анатольевна – д.б.н., руководитель лаборатории ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Гуторов Валерий Викторович – н.с., ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово

Yanagihara Richard – Professor, University of Hawaii at Manoa, 651 Ilalo Street, BSB 320L, Honolulu, Hawaii 96813, USA, M.D.

УДК 616.36-002:614.446

Г.С. Амагзаева, И.Б. Хахаетова, А.А. Хангажеева, Д.Г. Мункуева

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ А НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ

Управление Роспотребнадзора по Республике Бурятия (Улан-Удэ)

Проведен анализ особенностей эпидемиологического процесса заболеваемости вирусным гепатитом А в Республике Бурятия. Выявлены закономерности эпидемического процесса ВГА на территории Республики Бурятия. Дана характеристика вспышечной заболеваемости, результаты генотипирования и секвенирования выделенных вирусов. Освещена организационная и противоэпидемическая работа по профилактике ВГА.

Ключевые слова: вирусный гепатит А, уровень заболеваемости, эпидемиологическая ситуация, вакцинация

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF VIRAL HEPATITIS A ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BURYATIA

G.S. Amagzayeva, I.B. Khakhayeva, A.A. Khangazeyeva, D.G. Munkuyeva

The Department of Rospotrebnadzor of the Republic of Buryatia, Ulan-Ude

The article presents the analysis of the characteristics of the epidemiological process disease of hepatitis A in the Republic of Buryatia. Patterns of epidemic process of viral hepatitis A on the territory of the Republic of Buryatia were identified. Characteristics of outbreak sickness rate, results genotyping and sequencing of selected viruses are presented. The task and anti-epidemic work on the prevention of HAV was explored.

Key words: viral hepatitis A, morbidity, epidemiological situation, vaccination

В Республике Бурятия заболеваемость вирусными гепатитами начала регистрироваться с 1939 г., когда было зарегистрировано 11 случаев заболевания «инфекционного гепатита». Вирусный гепатит А (ВГА) как самостоятельная нозологическая форма начал регистрироваться с 1967 г.

Ежегодно в Республике до 2000 г. болело свыше 5 тыс. человек, наиболее высокий уровень заболеваемости регистрировался в 1974, 1979, 1980, 1984 и 1990 гг. с показателем заболеваемости от 499 до 600 случаев на 100 тыс. населения (рис. 1).

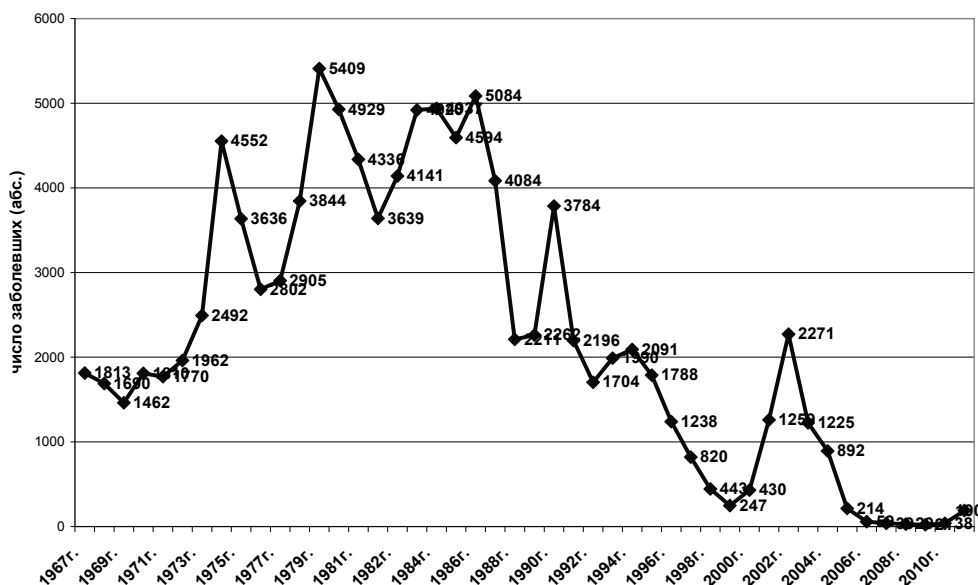


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости вирусным гепатитом А в Республике Бурятия с 1967 г. по 2011 г.

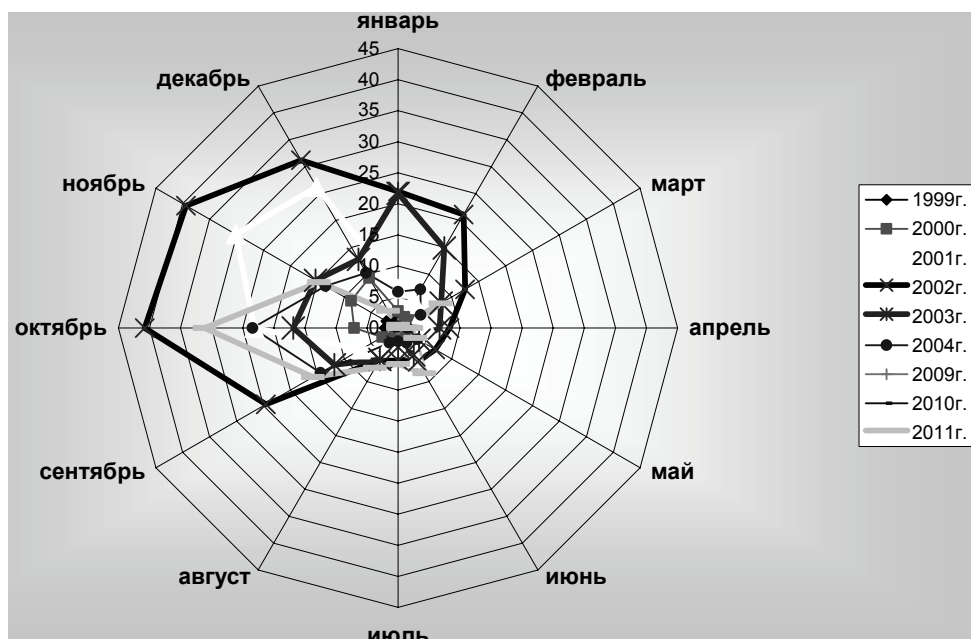


Рис. 2. Многолетняя внутригодовая динамика заболеваемости вирусным гепатитом А в Республике Бурятия с 1999 г. по 2011 г.

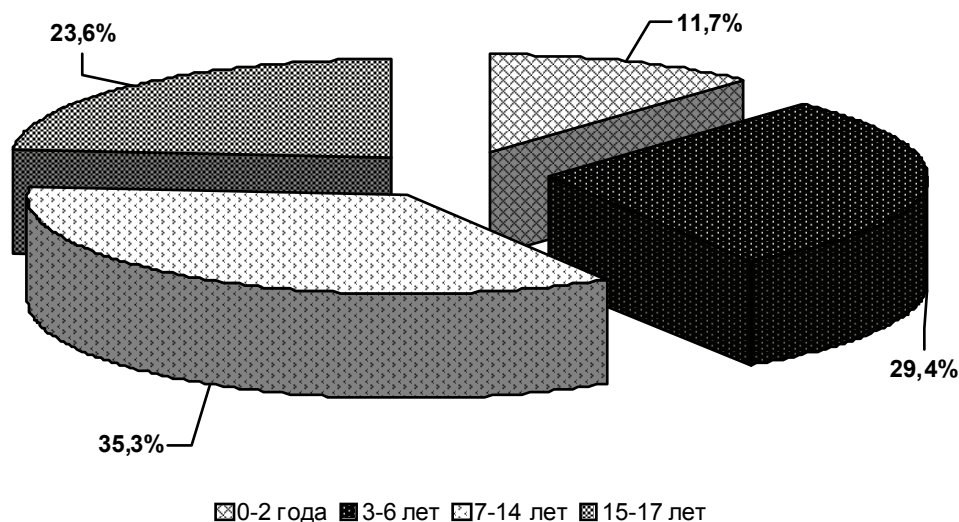


Рис. 3. Возрастная структура заболеваемости вирусным гепатитом А детского населения по Республике Бурятия в 2011 г.

В последние годы в Республике имеет место снижение показателей заболеваемости ВГА (2004 г. — 91,6, 2005 г. — 21,9, 2006 г. — 6,0, 2007 г. — 4,0, 2008 г. — 2,9, 2009 г. — 2,1), это связано не только с характерными для ГА циклическими уровнями заболеваемости, но и с действием ряда социальных факторов (снижением рождаемости, уменьшением числа детей, посещающих детские организованные коллективы).

При анализе внутригодовой динамики установлено, что сезонный подъем заболеваемости в годы с низкой заболеваемостью (1999 г., 2009 г.) и в годы с высокой заболеваемостью (2002 г.) начинается в сентябре, достигает максимального значения в ноябре и заканчивается в декабре-январе следующего года. Таким образом, сезонный подъем заболеваемости продолжается 4–5 месяцев в году (рис. 2).

Основной удельный вес среди заболевших составляют дети до 14 лет (62 %), из них 81 % — дети

школьного возраста. Высокая заболеваемость ВГА среди школьников обусловлена их высокой восприимчивостью к ВГА из-за отсутствия иммунитета и контагиозностью инфекции при нарушениях санитарно-противоэпидемического режима в организованных детских коллективах (рис. 3).

Для ВГА характерна цикличность, циклы колебания заболеваемости в Республике Бурятия регистрируются с интервалом в 7–8 лет. Очередной циклический подъем начался с 2001 г., когда уровень заболеваемости превысил показатели 2000 г. в 3 раза. На основании ретроспективного анализа и прогноза ожидается циклический подъем заболеваемости ВГА в Республике в 2012–2013 гг. (рис. 1).

Эпидемический процесс ВГА в Республике носит преимущественно спорадический характер. Однако для ВГА характерно периодическое возникновение вспышечной заболеваемости при

ухудшении санитарно-эпидемиологической ситуации. Так, с 1999 г. по 2011 г. зарегистрировано 72 случая групповой заболеваемости ВГА, с числом заболевших 1440 человек, среди них детей до 14 лет – 1136 человек или 79 %. В 2011 г. было зарегистрировано 4 случая групповых заболеваний ВГА с числом заболевших 92 человека. Вспышки имели контактно-бытовой путь передачи.

Управлением Роспотребнадзора по Республике Бурятия в целях повышения качества и эффективности эпидемиологического надзора за ВГА организовано взаимодействие с Референс-центром по мониторингу за вирусными гепатитами (ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора (г. Москва), куда ежегодно направляется информация о заболеваемости ВГА.

В 2011 г. в Референс-центр были направлены образцы крови из 4 очагов групповой заболеваемости ВГА. По результатам генотипирования и секвенирования выделенных вирусов в 3 очагах заболевание было вызвано вирусом гепатита А, относящемуся к 1А субтипу ВГА близкородственными штаммами U116-U118, U116-brt11_27. Согласно экспертному заключению Референс-центра по мониторингу за вирусными гепатитами штаммы вируса гепатита А U116-U118 и U116-brt11_27 значительно отличаются от изолятов, выявленных ранее на территории РФ, и имеют наиболее генетическое сходство со штаммами 1А, у циркулирующими на территории Монголии, Китая и Японии. Выявление штамма U116-U118 и близкородственного ему U116-brt11_27 на территории различных районов Республики в различный период времени, позволяет высказать предположение об эндемичности этих штаммов для территории Республики Бурятия. В четвертом очаге заболевание было вызвано штаммом вируса гепатита А U117, относящемуся к 3А субтипу, эндемичному для республик Средней Азии. Таким образом, в связи с миграцией населения высока вероятность заноса ВГА из стран дальнего и ближнего зарубежья.

Система борьбы с ВГА включает в себя комплекс мероприятий, направленных на все звенья эпидпроцесса: выявление и изоляцию источников инфекции; разрыв путей передачи и повышение невосприимчивости населения к ВГА. Наиболее эффективным и экономичным способом профилактики этой инфекции и недопущения групповых заболеваний является вакцинация. В Республике вакцинация ВГА начата с 2002 г., всего за период с 2002 – 2011 гг. привито 20208 чел. или 2,8 % от числа лиц групп риска, в т.ч. 19254 ребенка. Необходимо отметить, что в основном проводится вакцинация контактных лиц в очагах (рис. 4). Не проводится вакцинация групп риска в виду недостаточности финансовых средств для закупки вакцины.

В районах с прогнозируемым ростом заболеваемости ВГА организовано мониторинговое исследование питьевой воды на наличие антигена гепатита А. Начиная с 2005 г., антигены вируса гепатита А обнаружены в 2 % исследованных проб питьевой воды (табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследования питьевой воды на наличие антигенов вирусного гепатита А в Республике Бурятия

Годы	Всего проб	Обнаружен антиген вируса гепатита А
2005	149	8 проб
2006	108	7 проб
2007	190	1 проба
2008	190	5 проб
2009	170	–
2010	170	–
2011	170	–
Итого	1147	21 проба (1,83 %)

В целях профилактики вирусного гепатита А и предотвращения его распространения в Республике Бурятия издано Постановление Главного

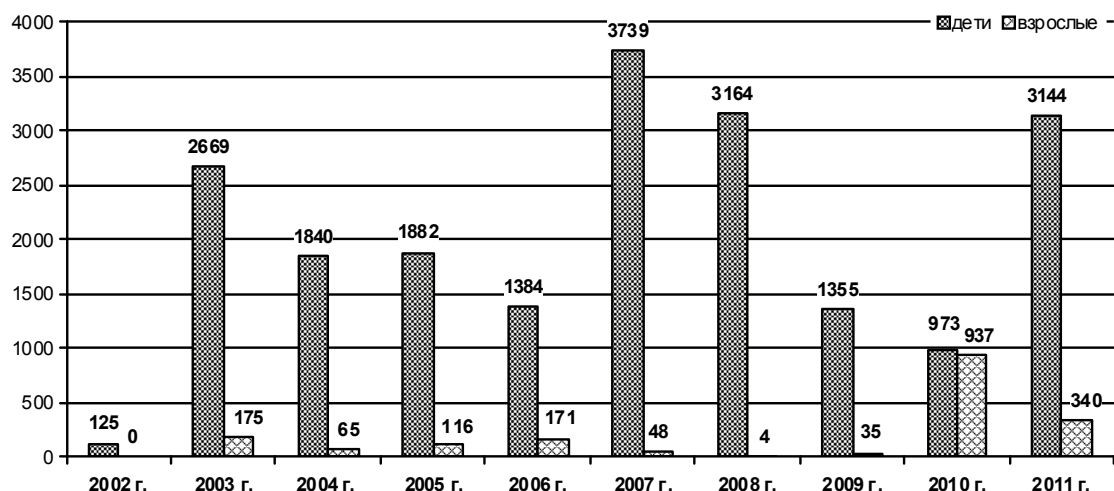


Рис. 4. Иммунизация против вирусного гепатита А (абс. числа) в Республике Бурятия в 2002–2011 гг.

государственного санитарного врача по РБ № 5 от 30.04.2008 г.; разработан план мероприятий по реализации Постановления Главного государственного санитарного врача РФ «О состоянии заболеваемости населения вирусным гепатитом А и мерах по ее снижению»; принят Закон Республики Бурятия «Об иммунопрофилактике населения

Республики Бурятия», где одним из мероприятий является вакцинация против ВГА детей находящихся в трудной жизненной ситуации, в т.ч. закрытых детских коллективах с круглосуточным пребыванием (дома ребенка, детские дома и др.). Ежегодно, с 2012 по 2016 годы планируется прививать по 1840 детей, всего будет привито 9200 детей.

Сведения об авторах

Амагзаева Галина Сергеевна – начальник отдела эпидемиологического надзора Управления Роспотребнадзора по Республике Бурятия (670013, г. Улан-Удэ; тел.: 8 (3012) 41-14-63)

Хахаева Ирина Борисовна – заместитель начальника отдела эпидемиологического надзора

Хангажеева Анна Александровна – ведущий специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора

Мункуева Дыжидма Галсандоржиевна – ведущий специалист-эксперт отдела эпидемиологического надзора

В.А. Вишняков, А.К. Носков

САНИТАРНАЯ ОХРАНА ТЕРРИТОРИИ СУБЪЕКТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ. СООБЩЕНИЕ 1. ПРИНЦИПЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОДХОДА К ОРГАНИЗАЦИИ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ НА УРОВНЕ МУНИЦИПАЛЬНЫХ РАЙОНОВ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

Предложен дифференцированный подход к организации системы мероприятий по санитарной охране территории, основанный на анализе транспортной и объектовой составляющих риска возникновения чрезвычайных ситуаций (ЧС) в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Суммарная оценка внешней и внутренней компоненты риска ЧС для каждого из муниципальных районов субъекта Российской Федерации позволяет определить необходимый для данного района тип готовности к проведению мероприятий по санитарной охране территории. Ранжирование субъекта РФ будет способствовать достижению оптимальной готовности учреждений здравоохранения и санитарно-эпидемиологического надзора на уровне муниципальных районов субъекта к возникновению заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране.

Ключевые слова: санитарная охрана, ранжирование, чрезвычайная ситуация, санитарно-эпидемиологическое благополучие

SANITARY PROTECTION OF THE TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION. REPORT 1. THE PRINCIPLES OF DIFFERENTIATED APPROACH TO THE ORGANIZATION OF ACTIVITIES OF THE SANITARY PROTECTION OF THE TERRITORY AT THE LEVEL OF MUNICIPALITIES

V.A. Vishnyakov, A.K. Noskov

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

A differentiated approach to the organization of measures for sanitary protection of the territory, based on the analysis of the transport and facility components of risk emergency situations in the field of sanitary-epidemiological welfare of the population is proposed. The total evaluation of the external and internal components of the risk emergency situations for each municipality of a region of the Russian Federation allows to determine type of readiness to conduct activities of the sanitary protection of the territory for a given area. The ranking of the region of the Russian Federation will contribute to the achievement of optimum readiness of the Institutions of Public Health and sanitary-epidemiological surveillance at the level of municipalities to the occurrence of diseases, requiring measures of sanitary protection.

Key words: sanitary protection, ranking, emergency situation, sanitary-epidemiological welfare

Современная концепция санитарной охраны территории базируется на принципе обеспечения готовности системы здравоохранения к появлению инфекционных болезней, вызывающих чрезвычайные ситуации (ЧС) в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в любом городском округе и муниципальном районе на территории страны [3, 4]. Однако вероятность возникновения ЧС такого рода, равно как и ее характер (нозологическая форма, спорадические или массовые заболевания и др.), для различных территорий неодинаковы. В частности, разные районы одного и того же субъекта Российской Федерации имеют неодинаковый риск возникновения инфекционных болезней, вызывающих ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения (далее — Болезней) [1, 2, 5].

Основными факторами, обуславливающими риск возникновения Болезней на определенной территории, являются:

1. Близость крупных транспортных магистралей, обеспечивающих межрегиональную и

международную миграцию населения и перевозку грузов: федеральных автомобильных трасс, железнодорожных путей, международных аэропортов, морских и речных портов.

2. Особенности приграничной миграции населения.

3. Наличие на территории района зон эндемичности Болезней, в том числе природных и антропогенных очагов.

4. Биологически опасные объекты.

В связи с этим в зависимости от наличия или отсутствия на определенной территории тех или иных факторов риска необходим дифференцированный подход к организации мероприятий по санитарной охране территории, в том числе к обеспечению готовности учреждений Роспотребнадзора, здравоохранения, лабораторных баз и ветеринарных служб к возникновению ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Алгоритм ранжирования территории субъекта по степени риска возникновения Болезней предполагает три этапа (рис. 1).

ШАГ 1. ОЦЕНКА ОТДЕЛЬНЫХ УГРОЗ

1. ТРАНСПОРТНАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ
• основные маршруты миграции людей и перемещения товаров (грузов)
• по видам транспорта:
- автомобильный
- железнодорожный
- авиационный (международные аэропорты)
- морской и речной (международные порты)

2. ОБЪЕКТОВАЯ (СТАЦИОНАРНАЯ) СОСТАВЛЯЮЩАЯ
• 2а. Эндемичные территории, в т.ч. природные и антропогенные очаги, СНП
• 2б. Биологически опасные объекты – БОО (техногенная компонента)
Учреждения, использующие ПБА I-II групп патогенности (НИИ, производство МИБП)
Микробиологические лаборатории, осуществляющие работы с живыми патогенами II-IV групп

ШАГ 2. ОЦЕНКА РИСКА УГРОЗ

1. ВНЕШНИЕ УГРОЗЫ:
РИСК ЗАНОСА В СУБЪЕКТ
Определение районов:
А. максимального риска
Б. среднего риска
В. минимального риска

2. ВНУТРЕННИЕ УГРОЗЫ:
РИСК ВЫНОСА ПАТОГЕНОВ:
• В пределах эндемичной территории или БОО
• В пределах муниципального района субъекта
• В другие муниципальные районы субъекта
• За пределы субъекта

ШАГ 3. РАНЖИРОВАНИЕ РАЙОНОВ

1. Суммарная оценка внешней и внутренней компонент риска для каждого муниципального района.
2. Определение достаточного уровня готовности для каждого района, исходя из суммарной оценки рисков:
Тип «А». Наличие специализированных госпитальной и лабораторной баз
Тип «В». Специализированные лечебные учреждения на 1–5 случаев Болезни. Перепрофилирование лабораторий для работы в условиях ЧС.
Тип «С». Ориентация на локализацию очага и эвакуацию больного в специализированную госпитальную базу в районах типа «А» или «В».

Рис. 1. Алгоритм ранжирования санитарно-противоэпидемических и профилактических мероприятий в районах субъекта РФ по степени угрозы возникновения ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

На первом этапе проводится выявление и оценка отдельных составляющих риска возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера на уровне субъекта. Такими составляющими являются, во-первых, транспортная система субъекта и, во-вторых, объектовая (стационарная) составляющая, представленная как совокупность биологически опасных объектов и ограниченных эндемичных по Болезням территорий, в том числе природных и антропогенных очагов.

При оценке транспортной составляющей риска ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения проводится анализ пассажирского и грузового потоков, их интенсивности, основных направлений, наличия и расположения пунктов пропуска через Государственную границу Российской Федерации и их пропускной способности. Оценка проводится отдельно по автомобильному, железнодорожному, авиационному, речному и морскому видам транспорта.

Объектовая составляющая угрозы включает, в первую очередь, наличие и активность эндемичных по Болезням территорий, в том числе природных и антропогенных очагов, в пределах субъекта. Также при оценке объектовой составляющей угрозы ЧС учитываются биологически опасные объекты (БОО), к числу которых следует отнести учреждения и организации, использующие в диагностических, производственных, научно-исследовательских целях патогенные биологические агенты I – II групп патогенности, и лаборатории, проводящие диагностические и иные виды работ с правом накопления живых микроорганизмов II – IV групп патогенности.

На втором этапе анализа проводится оценка полученных данных по критериям формирования

отдельно внешних и внутренних угроз на уровне конкретных муниципальных районов субъекта. При оценке внешней угрозы определяется риск заноса на территорию района опасных заболеваний с эндемичных территорий извне. При оценке внутренней угрозы определяется риск выноса опасных патогенов с территории данного района (эндемичной территории, природного очага, БОО):

1. В пределах эндемичной территории или БОО.
2. В пределах муниципального района.
3. В другие муниципальные районы субъекта.
4. За пределы субъекта, в том числе на территории соседних государств.

На третьем этапе анализа проводится суммарная оценка внешней и внутренней компонент риска для каждого из районов субъекта, которая позволяет определить необходимый для данного района объем мероприятий по санитарной охране в рамках одного из трех типов территории.

Тип «А» определяется для муниципальных районов с максимальным суммарным риском возникновения ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и предусматривает готовность к появлению как единичных, так и массовых случаев Болезней завозного или местного происхождения. Максимальная готовность подразумевает реальную возможность развертывания специализированных лечебных учреждений (инфекционного, провизорного госпиталя, изолятора, обсерватора) и лабораторных баз для работы с патогенами I – IV групп.

Тип «В» устанавливается для районов со средним суммарным риском возникновения ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и предусматривает наличие сил и средств,

ориентированных на появление единичных случаев Болезней, связанных с реализацией внешнего или внутреннего риска. В этих муниципальных районах предусматривается развертывание специализированных лечебных учреждений, рассчитанных на одномоментное пребывание не более 5 больных опасным инфекционным заболеванием, и формируются лабораторные базы с возможностью перепрофилирования для работы в условиях ЧС.

Тип «С» характеризует районы с минимальным суммарным риском возникновения ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. При выявлении отдельного случая Болезни обеспечивается локализация очага (изоляция больного) с последующей госпитализацией в ближайший предусмотренный комплексным планом специализированный госпиталь в муниципальном районе типа «А» или «В». На территории типа «С» не требуется развертывания лабораторной базы для работы с патогенами I – II групп.

Априори следует отметить, что административный центр субъекта Федерации будет являться территорией с готовностью по типу «А», что обосновывается концентрацией в пределах центрального города субъекта основных биологически опасных объектов и узлов транспортного сообщения (международный аэропорт и т.п.).

Дифференцированный подход к организации и планированию мероприятий по санитарной охране на основе ранжирования территории будет способствовать оптимизации распределения сил и

средств системы общественного здравоохранения и, в конечном итоге, увеличению эффективности санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий на территории каждого муниципального района в пределах субъекта Российской Федерации в случае возникновения инфекционных болезней, вызывающих ЧС, в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Изменения и дополнения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Санитарная охрана территории Российской Федерации СП 3.4.2318-08». Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.4.2366-08. — М., 2008.
2. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). — ВОЗ, Женева, 2006.
3. Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Методические указания. МУ 3.4.2552-09. — М., 2009.
4. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения. ФЗ № 52-ФЗ от 30.03.1999 г.
5. Санитарная охрана территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 3.4.2318-08. — М., 2008.

Сведения об авторах

Вишняков Владимир Александрович – младший научный сотрудник отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 220143)

Носков Алексей Кимович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока

Т.В. Каримова ¹, Л.Н. Фомина ¹, В.Г. Малявин ¹, М.В. Чеснокова ²,
Б.Т. Климов ², Э.Ф. Опочинский ³

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЗА ИЕРСИНИОЗАМИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ. СИСТЕМА УПРАВЛЕНИЯ КАЧЕСТВОМ

¹ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области (Новосибирск)

² Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

³ Федеральный центр гигиены и эпидемиологии (Москва)

Представлены результаты микробиологического мониторинга за иерсиниозами в Новосибирской области и опыт внедрения системы менеджмента качества в деятельность лаборатории особо опасных инфекций.

Ключевые слова: иерсиниозы, лабораторная диагностика, управление качеством

MODERN METHODS OF LABORATORY RESEARCHES IN EPIDEMIOLOGICAL MONITORING OF YERSINIOSES IN NOVOSIBIRSK REGION. QUALITY CONTROL SYSTEM

T.V. Karimova ¹, L.N. Fomina ¹, V.G. Malyavin ¹, M.V. Chesnokova ²,
V.T. Klimov ², E.F. Opochinsky ³

¹ Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Region, Novosibirsk

² Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

³ Federal Center of Hygiene and Epidemiology, Moscow

The results of yersinioses microbiological monitoring in Novosibirsk Region are presented and introduction of a quality management system in activities of a laboratory of especially dangerous infections is experienced.

Key words: yersinioses, laboratory diagnostics, quality management

АКТУАЛЬНОСТЬ

Иерсиниозы (псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз) имеют повсеместное распространение как в мире (Япония, Скандинавия, Восточная и Центральная Европа), так и в России (Сибирь, Северо-Западный регион, Дальний Восток) [1, 7, 11, 13]. Для человека они представляют опасность как пищевые сапрозоонозы [6], относятся к «эмерджентным» (emergent) инфекциям, эпидемиологические проявления которых возникают внезапно без видимых предвестников.

Новосибирская область — территория с высоким уровнем эпидемиологической опасности по псевдотуберкулезу, заболеваемость превышает среднефедеральный показатель в 8,3 раза (20,9 и 2,5 на 100 тыс. населения соответственно), ежегодно регистрируются вспышки псевдотуберкулезной инфекции, преимущественно в детских коллективах, фактором передачи служат овощные салаты. Для кишечного иерсиниоза характерна спорадическая заболеваемость (3,2 на 100 тыс. населения), не установлено значение в патологии человека энтеротоксигенных иерсиний, недостаточно изучены факторы их передачи.

Система эпидемиологического надзора за иерсиниозами требует совершенствования в плане ее быстрой, точной лабораторной диагностики, своевременного выявления возбудителя в эпидемических очагах инфекций. Это обуславливает укрепление,

модернизацию, оснащение практических лабораторий центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора современным оборудованием и внедрение в их работу новейших, надежных, эффективных средств и методов выявления возбудителей.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обобщить накопленный опыт применения современных методов лабораторной диагностики и поддержания системы управления качеством исследований при проведении эпидемиологического мониторинга иерсиниозов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование основано на ретроспективном и проспективном анализе данных микробиологического мониторинга иерсиниозов в Новосибирской области в период с 1995 по 2011 годы. Проведено бактериологическое исследование материала от 34728 больных людей, 119652 пробы из объектов окружающей среды (пищевые продукты, смывы, мелкие млекопитающие). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) использовали при исследовании 59 больных и 794 проб из объектов окружающей среды. Выделение и идентификацию культур, их био- и серотипирование выполняли согласно общепринятым методам [4, 5]. Для выявления и дифференциации ДНК вирулентных и авирулентных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и

Y. enterocolitica в объектах окружающей среды и клиническом материале использовали наборы для ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией («АмплиСенс *Yersinia enterocolitica/pseudotuberculosis*-FL») и с электрофоретической детекцией («АмплиСенс *Yersinia enterocolitica*-Ph, «АмплиСенс *Yersinia pseudotuberculosis*-Ph») производства ООО «Интерлабсервис», Москва.

На базе Референс-центра по природно-очаговым инфекциям ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (руководитель центра — директор института, доктор мед. наук, профессор С.В. Балахонов) проведено расширенное изучение молекулярно-генетических свойств 48 штаммов *Y. pseudotuberculosis* и 75 штаммов *Y. enterocolitica*. Плазмиды определяли по методу Т. Kieser [12]. Структура праймеров, размер амплифицирующего фрагмента и постановка реакции представлены в работе Т.М. Bogdanovich et al. [8]. Определение генов суперантигена YPM, инвазивности *inv*, «острова высокой патогенности» *hpi* *Y. pseudotuberculosis* (выделение, структура праймеров, программы амплификации, состав реакционной смеси) были аналогичны, использованным в работе Н. Fukushima et al. [9]. Все манипуляции с ДНК *Y. enterocolitica* для определения генов *ail*, *ystA*, *ystB* (выделение, структура праймеров, программы амплификации, состав реакционной смеси) были аналогичны, использованным в работе W.J.B. Wannet et al. и A. Ibrahim et al. [10, 14]. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществлен в ЗАО «Синтол» (Москва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В 2009 — 2011 гг. в соответствии с программами оснащения испытательных лабораторных центров (ИЛЦ) и Региональных центров мониторинга ин-

фекционных болезней II — IV групп патогенности лаборатория особо опасных инфекционных болезней (ООИ) ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» оснащена современным лабораторным оборудованием для ПЦР, в том числе амплификаторами «Rotor-Gene» 6000 и ДТ-96 с учетом результата в режиме Real-time, детектором «Джин-4» с учетом результата по конечной точке, экстрактором нуклеиновых кислот EasyMAG, а также идентификатором микроорганизмов MicroScan (Германия). Комплект оборудования позволил создать дополнительные рабочие места на всех этапах ПЦР анализа, увеличить количество исследуемых образцов за один цикл амплификации в 3 раза, заменить биохимическую идентификацию в пробирках и одновременно изучать антибиотикочувствительность, сократить сроки получения результатов при массовом исследовании диагностического материала на вспышках иерсиниозов.

Оптимальный подход к выявлению патогенов (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) реализовался через применение нескольких методов лабораторного исследования к одному образцу, включающих, наряду с бактериологическим анализом, использование ПЦР (рис. 1).

Подобный подход к лабораторной диагностике иерсиниозов в Новосибирской области увеличил достоверность результатов и частоту обнаружения иерсиний. Так, среднегодовой показатель (1995 — 2011 гг.) выделения иерсиний от людей составил 4,12 % (РФ — 0,73 %), из объектов окружающей среды — 5,10 % (РФ — 0,05 %). Метод ПЦР внедрен в деятельность лаборатории ООИ с 2005 г. При индикации *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в объектах окружающей среды и материале от больных людей специфические ампликоны ДНК энтеропатогенных иерсиний обнаружены

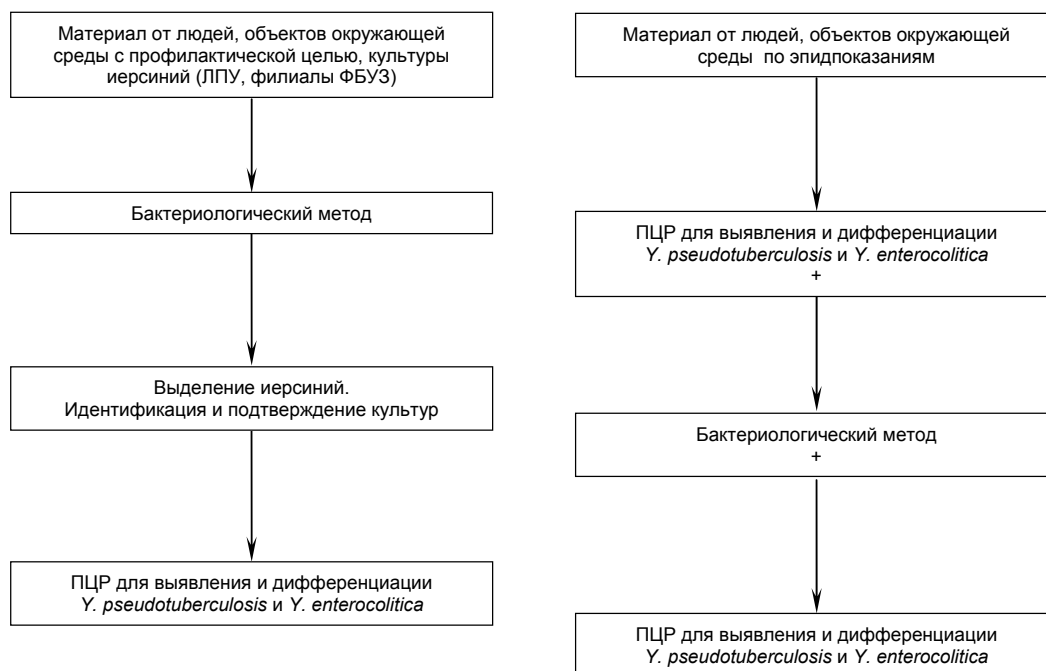


Рис. 1. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов.

в 12,85 и 20,43 % соответственно. Чаше от людей выявлялось ДНК *Y. pseudotuberculosis* (13,56 %), а из объектов окружающей среды — ДНК *Y. enterocolitica* (11,08 %). Удельный вес высеваемости *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* и выявления ДНК иерсиний представлены в таблице 1. Введение в алгоритм исследований ПЦР позволило более рационально использовать силы, средства, время, которые сегодня необоснованно много затрачиваются на проведение бактериологических исследований с отрицательным результатом.

Необходимо констатировать, что обеспечение санитарно-эпидемиологических мероприятий не ограничивается предоставлением результатов лабораторных исследований, но и предусматривает постоянное поддержание системы управления качеством.

ИЛЦ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» аккредитован в «Системе аккредитации лабораторий, осуществляющих санитарно-эпидемиологические исследования, испытания» на соответствие ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», а в 2010 г. — в Международной системе аккредитации DAKKS на соответствие ISO/IEC (EN) 17025:2005 аккредитованы три лаборатории центра, в том числе и лаборатория особо опасных инфекций (ООИ).

Обеспечение качества результатов исследований реализуется путем участия в межлабораторных сравнительных испытаниях, проведения внутрилабораторного контроля и подтверждения выделенных культур в Референс-центре (рис. 2).

Таблица 1

Мониторинг иерсиниозов в Новосибирской области (1995–2011 гг.)

Метод и объект исследования	Число исследованных проб	Число положительных результатов абс. (% ± m)	<i>Y. pseudotuberculosis</i> абс. (% ± m)	<i>Y. enterocolitica</i> абс. (% ± m)
Бактериологический	154380	7571 (4,90 ± 0,05)	1290 (0,84 ± 0,02)	6281 (4,07 ± 0,05)
в т.ч.	люди	34728	1430 (4,12 ± 0,11)	1248 (3,59 ± 0,10)
	окружающая среда	119652	6141 (5,1 ± 0,06)	42 (0,04 ± 0,01)
ПЦР*	853	114 (13,36 ± 1,16)	22 (2,58 ± 0,54)	92 (10,78 ± 1,06)
в т.ч.	люди	59	12 (20,34 ± 5,24)	8 (13,56 ± 4,46)
	окружающая среда	794	102 (12,85 ± 1,19)	14 (1,76 ± 0,47)
			88 (11,08 ± 1,11)	

Примечание: * — исследования проводятся с 2005 г.



Рис. 2. Критерии технической компетенции.

В 2009 – 2011 гг. лаборатория особо опасных инфекций принимала участие в межлабораторных сравнительных испытаниях с уполномоченными провайдером FAPAS, GEMMA (Англия), ЦНИИЭ (г. Москва), института «Вектор» (г. Новосибирск), «ФЦГиЭ» (г. Москва). Всего поступило на исследование 43 шифрованные пробы, выполнено 183 исследования, все задачи решены правильно.

Внутрилабораторный контроль проводился в целях предупреждения получения недостоверных результатов, как до начала проведения исследований (испытаний), так и в ходе испытаний. Первое включало мониторинг параметров окружающей среды, контроль качества и условий хранения диагностических препаратов, тест-систем и расходных материалов, поверку средств измерений, соблюдение сроков аттестации и технического обслуживания испытательного оборудования. Второе предполагало оперативный (точность, повторяемость, воспроизводимость результатов исследований) и статистический (стабильность результатов исследований) контроль, расчет и оценку неопределенности измерений. Согласно ISO 17025 для контроля качества использовались сертифицированные или аттестованные стандартные образцы, проводилось дублирование испытаний с использованием тех же или других методов, а также повторные испытания сохраняемых объектов.

В рамках внутрилабораторного контроля разработаны программа и график надзора за испытательным персоналом: разработаны матрицы полномочий, которыми определены функции, обязанности и допуски для каждого сотрудника к испытаниям, работе на оборудовании и прочим функциям.

В соответствии с требованиями ISO 9001:2008, ISO 17025:2005 в лабораториях ИЛЦ ежегодные проводятся внешние (Центральным органом по аккредитации РФ, аккредитационным центром ФРГ ГмБХ DAkkS) и внутренние аудиты (специалистами ИЛЦ ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области», имеющие сертификаты внутренних аудиторов).

В ходе внешнего аудита ассессоры выявили несоответствия в технической деятельности (50 %) и в системе менеджмента качества (50 %) ИЛЦ ФБУЗ «ЦГиЭ в Новосибирской области». Основные причины несоответствия заключались в: недостаточной регламентации процессов; незнании, непонимании персоналом требований стандарта; неисполнение персоналом требований внутренних документов ИЛЦ; недостаточном объеме внутрилабораторного контроля. Выявленные несоответствия, в том числе в лаборатории ООИ, были устранены в установленные сроки, что позволило получить Сертификат аккредитации на 5 лет.

Трехуровневая система организации лабораторной диагностики иерсиниозов предусматривает направление выделенных культур иерсиний для подтверждения и исследования их молекулярно-генетических свойств в Референс центре по мониторингу природно-очаговых инфекционных болезней (ФКУЗ Иркутский противочумный

институт Роспотребнадзора) [2]. Все изученные штаммы были подтверждены. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* принадлежали к O:1b серотипу двухплазмидному варианту (pVM 82 и pYV47 MDa), имели гены суперантигена *urtA/c*, детерминанты пилей адгезии IV типа (*ypaI*), инвазивности (*inv*), но не содержали остров высокой патогенности *hpi*. По набору факторов патогенности относились к первой генетической группе *Y. pseudotuberculosis*, преобладающей в Сибири [3].

Штаммы *Y. enterocolitica*, выделенные от мелких млекопитающих (5 штаммов), были представлены 3 и 4 биотипами O:3 серотипа, содержали плазмиду вирулентности (pYV 47 MDa) и *ystA* ген термостабильного токсина, что свидетельствует об их патогенности. Остальные штаммы отнесены к 1А биотипу и характеризовались наличием у 80 % штаммов гена *ystB*. Последнее имело отношение и к 12 штаммам *Y. enterocolitica*, изолированным от больных с энтероколитическим синдромом, — несмотря на отсутствие плазмиды pYV, генов *inv* и *ail* выявление гена термостабильного токсина B может свидетельствовать об этиологической роли сапрофитных *Y. enterocolitica* 1А в инфекционной патологии человека и их эпидемиологической значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оснащение лаборатории особо опасных инфекций в Новосибирской области современным оборудованием и внедрение новых эффективных методов диагностики иерсиниозов позволило оптимизировать микробиологический мониторинг возбудителя, заключающейся в повышении результативности и оперативности исследований, уменьшении объема отрицательных исследований классическим методом за счет применения экспресс диагностики.

Аккредитация в международной системе DAkkS способствовала внедрению системы менеджмента качества в деятельность лабораторий, созданию прозрачной структуры, позволяющей проследить весь производственный цикл и минимизировать влияние человеческого фактора и, в конечном итоге, значительно улучшить качество исследований и достоверность результатов. Это нашло отражение в абсолютном подтверждении изолированных лабораторий особо опасных инфекций культур иерсиний, а расширенная идентификация штаммов в Референс-центре установила циркуляцию в Новосибирской области возбудителей *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* с определенным набором факторов патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерсинии и иерсиниозы / под ред. проф. Г.Я. Ценовой. — СПб., 2006. — 168 с.
2. Чеснокова М.В. и др. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии — 2010. — № 17. — С. 188 — 192.

3. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Марамович А.С. Генотипирование *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке // Журнал микробиол. — 2006. — № 6. — С. 20–25.
4. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Методические рекомендации. МУ 3.1.1.2438-09; Утв. Руководителем Роспотребнадзора Г.Г. Онищенко 22.01.2009. — М., 2009. — 66 с.
5. Эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий. Инструкция №15-6/42; Утв. зам. начальника Главного эпидемиол. управления Минздрава СССР Г.Г. Онищенко 30.10.1990. — М., 1990. — 49 с.
6. Ющенко Г.В. Современное состояние проблемы иерсиниозов // Эпидемиол. и инфекц. болезни. — 1998. — № 6. — С. 8–11.
7. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe / Eds: Andrew Amato-Gauci and Andrew Ammon: ECDC, Sweden. — 2007. — P. 254–259.
8. Bogdanovich T.M. et al. Use of O-antigen gene cluster — specific PCRs for the identification and O-genotyping of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* // J. Microbiol. — 2003. — Vol. 41, N 11. — P. 5103–5112.
9. Fukushima H. et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis* — derived mitogen, and the high — pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 10. — P. 3541–3547.
10. Ibrahim A., Liesack W., Stackebrandt E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30, N 8 — P. 1942–1947.
11. Kangas S. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* O:1 traced to raw carrots // Finland. Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14, N 12. — P. 1959–1961.
12. Kieres T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // Plasmid. — 1984. — Vol. 12, N 1. — P. 19–36.
13. Rimhanen-Finne R. et al. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland, 2006 // Epidemiol. and Infect. — 2009. — N 137. — P. 342–347.
14. Wannet W.J.B. et al. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* a rapid and sensitive duplex PCR assay // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 39, N 12. — P. 4483–4486.

Сведения об авторах

Каримова Татьяна Викторовна — заведующая лабораторией особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 84; тел./факс: (383-2) -20-26-41; e-mail: tatiana-karimova357@gmail.com)

Фомина Людмила Николаевна — менеджер по качеству, врач санитарно-гигиенической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск; e-mail: nso-dap@rambler.ru)

Малявин Валерий Григорьевич — первый заместитель руководителя Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ), технический руководитель ИЛЦ, заведующий отделом лабораторного дела ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области» (630099, г. Новосибирск; тел.: 8-383-2-27-04-96)

Чеснокова Маргарита Валентиновна — доктор медицинских наук профессор заместитель директора по научной и противоэпидемической работе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: (3952) 22-13-12; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Климов Валерий Тимофеевич — кандидат медицинских наук старший научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: (3952) 22-01-43; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Опочинский Эдуард Федорович — врач-бактериолог лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» (117105, г. Москва, Варшавское шоссе, 19А; тел.: 8-495-952-12-64; e-mail: ooi@fcgsen.ru)

Н.М. Корецкая, А.Н. Наркевич, Л.Г. Носова

СВОЕВРЕМЕННОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ И ФАКТОРЫ, НА НЕЕ ВЛИЯЮЩИЕ*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (Красноярск)*

Проанализирована своевременность выявления туберкулеза легких у 1334 больных, лечившихся в Красноярском краевом противотуберкулезном диспансере № 1 в 2010–2011 гг. Несвоевременное выявление туберкулеза установлено у 60,2 %, а факторами, к нему предрасполагающими, являлись мужской пол, проживание в сельской местности, социальная незащищенность, нарушение регламентированных сроков прохождения флюорообследования. Показана значимость несвоевременно выявленных больных в увеличении резервуара туберкулезной инфекции и в распространении среди населения лекарственно устойчивых штаммов возбудителя. Установлено, что увеличение охвата населения профилактическим флюорообследованием лишь на 2,6 % привело к улучшению качественных показателей активного выявления туберкулеза легких в виде роста доли больных, выявленных при профилактических обследованиях и выявленных своевременно, а также снижения доли фиброзно-кавернозного туберкулеза легких и посмертной диагностики туберкулеза среди впервые выявленных больных. Сделано заключение о необходимости использования полученных результатов при проведении активного выявления туберкулеза среди населения с ориентацией работы на реальные, установленные в процессе исследования, его группы.

Ключевые слова: туберкулез легких, выявление

TIMELY DETECTION OF PULMONARY TUBERCULOSIS AND INFLUENCING FACTORS

N.M. Koretskaya, A.N. Narkevich, L.G. Nosova

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk

This study presents analysis of the timely detection of pulmonary tuberculosis in 1334 patients who underwent treatment in the Regional TB Dispensary N 1 in Krasnoyarsk city in 2010–2011. Late detection of tuberculosis was established in 60,2 %, and factors which are contributing to it were as following: the male, living in rural areas, social vulnerability, and violation of the regulated terms of X-ray examination. The significance of late diagnosed patients to increase the reservoir of tuberculosis infection and spread of drug-resistant strains among the population was shown. It was determined that an increase in coverage of population by preventive X-ray examinations resulted in improvement of quality indicators only in 2,6 % of active detection of pulmonary tuberculosis in the form of growing proportion of the patients revealed during preventive examinations timely, as well as reducing proportion of fibro-cavernous pulmonary tuberculosis and post-mortem diagnosis of tuberculosis among the newly diagnosed patients. During the active detection of TB among population with a focus of work on real, established during the research, its groups the conclusion about the need to use the obtained results was made.

Key words: pulmonary tuberculosis, detection

Своевременное выявление больных туберкулезом легких, под которым в нашей стране подразумевается выявление заболевания до развития деструктивных изменений и бактериовыделения, является непременным условием надежного контроля распространения туберкулезной инфекции среди населения и успешного лечения [1, 6]. Несвоевременно выявленные распространенные формы туберкулеза с распадом легочной ткани и выделением микобактерий туберкулеза (МБТ) дают более низкие результаты лечения и нередко приводят к летальным исходам [2].

Как известно, эффективность работы по выявлению больных туберкулезом отражает доля больных с деструкцией легочной ткани и удельный вес фиброзно-кавернозного туберкулеза легких в структуре впервые диагностированного специфического процесса, при этом особо рассматривают наиболее эпидемически опасные случаи заболевания — туберкулез с установленным бактериовыделением [5].

В этой связи повышение эффективности работы по выявлению туберкулеза легких невозможно без анализа факторов, влияющих на своевременность выявления специфического процесса.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа случаев своевременной и несвоевременной диагностики туберкулеза легких, а также оценка показателей его активного выявления на территории Красноярского края в современных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В разработку взяты истории болезни 1334 больных с впервые установленным диагнозом туберкулеза легких, лечившихся в стационаре Красноярского краевого противотуберкулезного диспансера № 1 в 2010–2011 гг.

Больные были разделены на две группы: 1-я — 531 больной (39,8 %), у которых специфический процесс был выявлен своевременно, то есть без деструкции легочной ткани и бактериовыделения;

2-я — 803 больных (60,2 %), у которых специфический процесс сопровождался распадом легочной ткани и бактериовыделением.

Анализировался возрастно-половой и социальный состав больных, структура и характеристика форм специфического процесса, пути выявления заболевания, а также сроки флюорографического обследования, предшествующего выявлению заболевания.

Для установления общих закономерностей активного выявления туберкулеза легких в современных условиях параллельно анализировались количественные (охват населения профилактическим флюорографическим обследованием) и качественные показатели активного выявления туберкулеза среди взрослого населения Красноярского края за 2010 — 2011 гг.

Из качественных показателей активного выявления нами были взяты в разработку шесть: удельный вес больных туберкулезом легких, выявленных при профилактическом флюорографическом обследовании; доля больных туберкулезом легких без распада легочной ткани и без бактериовыделения и доля лиц с посмертно установленным диагнозом туберкулеза легких среди всех впервые выявленных больных; удельный вес фиброзно-кавернозного туберкулеза в структуре заболеваемости; доля больных, умерших в течение первого года диспансерного наблюдения, среди всех случаев смерти и среди всех впервые выявленных больных. Перечисленные количественные и качественные показатели выкопированы из отчетов по форме № 8 и форме № 33 по Красноярскому краю за 2010 — 2011 гг.

Результаты исследования были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа. Достоверность полученных результатов оценивалась по *t*-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты проведенного исследования, в обеих группах преобладали мужчины: соответственно $56,9 \pm 2,1$ и $68,1 \pm 1,6$ %, однако их удельный вес среди несвоевременно выявленных больных туберкулезом легких был значительно выше ($p < 0,001$). Такая же тенденция наблюдалась и в соотношении больных, проживающих в сельской и городской местности: при преобладании первых (соответственно по группам $60,3 \pm 2,1$ и $67,1 \pm 1,7$ %) их доля среди несвоевременно выявленных больных оказалась более высокой ($p < 0,05$), что свидетельствует о недостаточном уровне работы по активному выявлению туберкулеза у сельских жителей.

По возрастному составу значимых различий по группам выявить не удалось: в обеих группах максимальный удельный вес составили лица в возрасте от 20 до 59 лет (соответственно по группам — $88,3 \pm 1,9$ и $87,6 \pm 1,2$ %).

При изучении социального статуса статистически значимые различия между больными 1-й

и 2-й групп были установлены для лиц БОМЖ (соответственно 0 % против $1,4 \pm 0,4$ %; $p < 0,001$), инвалидов ($3,0 \pm 0,7$ и $6,1 \pm 0,8$ %; $p < 0,01$), медицинских работников ($4,3 \pm 0,9$ и $0,9 \pm 0,3$ %; $p < 0,001$), неработающих трудоспособного возраста ($51,6 \pm 2,2$ и $64,6 \pm 1,7$ %; $p < 0,001$), рабочих профессий ($18,3 \pm 1,7$ и $12,3 \pm 1,2$ %; $p < 0,01$), служащих ($12,2 \pm 1,4$ и $2,6 \pm 0,6$; $p < 0,001$). Эти различия свидетельствуют о более четком проведении активного выявления туберкулеза среди организованного населения.

У больных II группы, по сравнению с I, в 2 раза большим был удельный вес диссеминированного туберкулеза легких ($42,7 \pm 1,7$ % против $21,3 \pm 1,8$ %; $p < 0,001$), ниже — очагового ($0,1 \pm 0,1$ против $18,6 \pm 1,7$ %; $p < 0,001$). Кроме того во II группе больных были диагностированы такие тяжелые запущенные формы туберкулезного процесса как казеозная пневмония ($8,7 \pm 1,0$ %), кавернозная ($0,4 \pm 0,2$ %), фиброзно-кавернозная ($1,9 \pm 0,5$ %), требующие значительно больших материальных затрат на лечение, характеризующиеся низкой его эффективностью и в подавляющем большинстве случаев неблагоприятным прогнозом.

Выраженные различия наблюдались и в распространенности поражения легочной ткани. Так, ограниченные одним-двумя сегментами процессы наблюдались в $67,4 \pm 2,0$ % случаев у больных I группы и лишь в $19,6 \pm 1,4$ % во II ($p < 0,001$) и, наоборот, обширные поражения значительно преобладали у больных II группы (долевые — соответственно составили $19,7 \pm 1,4$ против $8,5 \pm 1,2$ %; $p < 0,001$; более доли — $60,8 \pm 1,7$ против $24,1 \pm 1,9$ %; $p < 0,001$). Особенно показательное различие в удельном весе тотального поражения легких у больных I и II групп, который составил соответственно $9,6 \pm 1,3$ и $35,1 \pm 1,7$ % ($p < 0,001$).

Особо следует отметить, что 45,1 % больных II группы выделяли лекарственно устойчивые штаммы МБТ, при этом 26,6 % составляли МБТ с множественной лекарственной устойчивостью. По результатам проведенного анализа жизнеспособности МБТ по скорости и массивности роста было установлено, что в 44,5 % случаев они обладали высокой жизнеспособностью (рост до 30 дней с количеством колоний более 100). Наличие высокого удельного веса МБТ с лекарственной устойчивостью, особенно множественной, в сочетании с высокой жизнеспособностью предполагает повышенную их трансмиссивность. В этой связи несвоевременное выявление больных туберкулезом легких вело не только к увеличению резервуара туберкулезной инфекции, но и распространению среди населения лекарственно устойчивых штаммов МБТ. Специфический процесс в легких у больных II группы был выявлен в 2,6 раза чаще при обращении за медицинской помощью ($57,8 \pm 1,7$ против $22,2 \pm 1,8$ % в I группе больных; $p < 0,001$), что, несомненно, связано с более тяжелой структурой клинических форм туберкулеза и обширностью поражения легочной ткани.

Несвоевременное выявление заболевания у больных II группы связано не только с неблагоприятной социальной структурой, но и с нарушением регламентированных сроков прохождения профилактического флюорографического обследования. Сравнение сроков прохождения флюорографического обследования, предшествующего выявлению заболевания у больных I и II групп, показало, что в I группе был выше удельный вес больных со сроком обследования до 1-го года ($13,9 \pm 1,5$ против $9,6 \pm 1,3$ %; $p < 0,05$), от 1-го года до 2 лет ($43,1 \pm 2,1$ против $28,4 \pm 1,6$ %; $p < 0,001$) и ниже, со сроком более 3 лет ($26,4 \pm 1,9$ против $45,7 \pm 1,8$ %; $p < 0,001$). Полученные нами данные соответствуют литературным, в которых отмечена наиболее тяжелая структура клинических форм и характеристики специфического процесса у лиц, длительно не проходивших флюорографическое обследование [3, 4].

Анализ отчетных данных за 2010 – 2011 гг. установил, что количественный показатель активного выявления туберкулеза в Красноярском крае повысился в динамике на 2,6 % (с 53,4 до 56,0 %). Это повышение оказало положительное влияние и на качественные показатели активного выявления.

Несмотря на то, что удельный вес своевременного выявления туберкулеза легких остается на низком уровне (36,9 % в 2010 г. и 37,2 % в 2011 г. и соответствует таковому по полученным нами данным среди больных, лечившихся стационарно), отмечается тенденция к его росту. Кроме этой положительной тенденции следует отметить, что повысилась доля больных туберкулезом, выявленных при профилактических осмотрах с 58,2 до 59,2 %, снизился удельный вес фиброзно-кавернозного туберкулеза легких в структуре заболеваемости с 2,0 до 1,7 %, а также доля лиц с посмертной диагностикой туберкулеза среди всех впервые выявленных больных с 2,4 до 2,0 %.

По нашим данным, лишь два показателя имели отрицательную динамику, а именно, удельный вес больных, умерших до одного года диспансерного наблюдения среди всех умерших от туберкулеза (22,2 % в 2010 г. и 27,0 % в 2011 г.) и среди всех впервые выявленных больных (соответственно 4,0 и 4,4 %). Однако следует отметить, что эти два показателя отражают не только состояние работы по активному выявлению туберкулеза среди населения, но и эффективность работы по лечению больных. В этой связи данные показатели рекомендуют использовать для обоснования дифференцированных целевых мероприятий по снижению общего уровня смертности и при определении ресурсов, которые требуется выделить для своевременного выявления и адекватного лечения больных, что обуславливает их организационно-экономическое значение [5].

Нельзя не отметить тот факт, что в Красноярском крае такие показатели как охват населения флюорографическим обследованием с целью выявления туберкулеза, удельный вес больных, выявленных активно при профилактическом флюорографическом обследовании ниже сред-

них по Российской Федерации, а доля фиброзно-кавернозного туберкулеза легких в структуре заболеваемости, удельный вес лиц, умерших до одного года диспансерного наблюдения в структуре смертности и среди всех впервые выявленных больных, равно как и в посмертной диагностике, наоборот, выше.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости интенсификации работы по активному выявлению туберкулеза у населения Красноярского края путем увеличения не только количественных показателей, что, несомненно, актуально, но и проведения целенаправленного привлечения к профилактическому флюорографическому обследованию социально незащищенных категорий населения и лиц, длительно (более 3 лет) ему не подвергавшихся, ибо именно среди них специфический процесс в легких чаще всего выявляется несвоеременно.

ВЫВОДЫ

1. Своевременность выявления туберкулеза легких не зависит от возраста заболевших.
2. Факторами, предрасполагающими к несвоевременному выявлению туберкулеза легких, является мужской пол, проживание в сельской местности, социальная незащищенность (лица БОМЖ, инвалиды, неработающие трудоспособного возраста), а также нарушение регламентированных нормативными документами сроков профилактического флюорографического обследования.
3. Несвоевременное выявление больных туберкулезом легких ведет не только к увеличению резервуара туберкулезной инфекции, но и к распространению среди населения лекарственно устойчивых штаммов МБТ.
4. Низкий удельный вес своевременного выявления туберкулеза легких среди населения Красноярского края связан с недостаточным уровнем работы по активному выявлению заболевания. Повышение охвата населения профилактическим флюорографическим обследованием лишь на 2,6 % повысило качественные показатели активного выявления и своевременности диагностики специфического процесса.
5. Полученные результаты необходимо использовать при проведении планирования активного выявления туберкулеза среди населения с ориентацией работы на реальное, установленное в процессе исследования, его группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов С.Е., Гунтупова Л.Д., Дергачев А.В. и др. Выявление и диагностика больных туберкулезом органов дыхания по данным системы эпидемиологического мониторинга // Туберкулез в России. Год 2007: матер. VIII Российского съезда фтизиатров. — М., 2007. — С. 147–148.
2. Глумная Т.В., Корниенко С.В. Факторы, оказывающие влияние на исходы заболевания туберкулезом // Туберкулез в России. Год 2007:

материалы VIII Российского съезда фтизиатров. — М., 2007. — С. 18.

3. Панченко И.Н., Гаврилов П.В., Арчакова Л.И. Значение сроков флюорографического обследования в выявлении различных форм и фаз туберкулеза легких (на примере Республики Коми) // Торакальная радиология: Силлабус международной конференции и Школы для врачей / под ред. И.Е. Тюрина. — СПб.: Человек и его здоровье, 2010. — 248 с.

4. Поваляева Л.В., Бородулина Е.А., Бородулин Б.Е., Еремеева А.Е. Впервые выявленный тубер-

кулез легких и способ его выявления // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — №5. — С. 113—114.

5. Туберкулез в Российской Федерации, 2010 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. — М., 2011. — 280 с.

6. Шамсутдинов М.М., Аминев Х.К., Ганжиева З.Р., Измайлова Н.П. Влияние профилактического флюорографического обследования на эффективность лечения больных туберкулезом органов дыхания // Туберкулез и болезни легких. — 2011. — № 5. — С. 233—234.

Сведения об авторах

Корецкая Наталия Михайловна — заведующая кафедрой туберкулеза с курсом ПО, профессор Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел.: 8 (391) 261-76-82, факс: (391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Наркевич Артем Николаевич — клинический ординатор кафедры туберкулеза с курсом ПО Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб.: 8 (391) 261-76-82, факс: (391) 228-08-60; e-mail: kras-kaftuber@mail.ru)

Носова Лариса Германовна — доцент кафедры латинского и иностранных языков Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1; тел. раб.: 8 (391) 221-77-20, факс: 8 (391) 228-08-60; e-mail: nosovalg@mail.ru)

С.А. Коровин ¹, Д.В. Кулеш ¹, В.А. Хаптанова ², В.П. Ильин ¹, А.Г. Черкашина ¹, Л.Н. Лебедева ¹

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ Г. ИРКУТСКА В ПЕРИОД СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИХ РЕФОРМ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

В статье представлены результаты анализа динамики заболеваемости отдельных возрастных групп населения г. Иркутска болезнями, наиболее зависящими от социально-экономических факторов, за период 1992–2009 гг. Построенные полиномиальные регрессионные модели позволили выявить существенный рост показателей заболеваемости детей психическими расстройствами, болезнями нервной системы и органов пищеварения на фоне разнонаправленного изменения заболеваемости подросткового и взрослого населения за анализируемый период.

Ключевые слова: регрессионная модель, население, заболеваемость

DYNAMICS OF MORBIDITY OF POPULATION IN IRKUTSK BETWEEN DURING SOCIO-ECONOMIC REFORMS

S.A. Korovin ¹, D.V. Kulesh ¹, V.A. Haptanova ², V.P. Ilin ¹, A.G. Cherkashina ¹,
L.N. Lebedeva ¹

¹ Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

This article presents an analysis of disease trends in selected age groups of the population of Irkutsk for the period of 1992–2009 and it is found that most of these trends are dependent on socio-economic factors. Built polynomial regression models revealed significant increase in morbidity of mental disorders in children, diseases of the nervous system and the digestive system against opposing change prevalence of adolescent and adult population for the analyzed period.

Key words: regression model, population, incidence

Здоровье человека в современных условиях формируется под влиянием широкого спектра природных, техногенных, бытовых и социально-экономических факторов, и выявление степени влияния каждого из них является сложной задачей. Уровень воздействия социального стресса на показатели здоровья отдельных групп населения остается недостаточно исследованным. В ряде работ, в которых представлены научно обоснованные сведения по важнейшим аспектам здоровья и реформирования социально-экономической системы, приводится все больше данных о двустороннем характере связи между здоровьем населения и социально-экономическими реформами. Начиная с 1992 г., в связи со сменой модели социально-политического развития, наблюдалось существенное ухудшение качества общественного здоровья. [2, 6, 7].

Характеристика качества здоровья включает широкий ряд медико-демографических показателей, в том числе заболеваемость населения, регистрируемую по материалам обращения за медицинской помощью [5]. В связи с этим, важнейшими проблемами, не получившими пока достаточного отражения в литературе, являются региональные особенности формирования здоровья населения в период социально-экономических преобразований.

Целью настоящей работы явилась оценка взаимосвязи динамики показателей здоровья отдельных возрастных групп населения г. Иркутска

и социально-экономических преобразований в обществе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ частоты заболеваемости по обращаемости детей, подростков и взрослых в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) позволил выделить методом пошагового отбора наиболее зависимые классы болезней, позволяющие охарактеризовать здоровье отдельных групп населения, реагирующих на неблагоприятные условия жизни: психические расстройства, болезни нервной системы и органов чувств и болезни органов пищеварения [3]. При использовании лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.1 (StatSoft) с помощью пошагового регрессионного анализа были построены полиномиальные модели заболеваемости в разных возрастных группах по трем классам болезней, имеющим наиболее существенные изменения за период социально-экономических реформ с 1992 по 2009 гг. Независимой переменной (X) в этом случае являлись годы, зависимой (Y) — показатели заболеваемости в возрастных группах детей, подростков и взрослых, выраженные в относительных значениях на 1000 населения соответствующего возраста.

Группа моделей 4-го порядка, описывающих изменение общей заболеваемости за изучаемый период, имеет следующий вид:

дети: $1,2411E12 - 2,4779E9 \times x + 1,8552E6 \times x^2 - 617,3073 \times x^3 + 0,077 \times x^4$

подростки: $1,8362E12 - 3,6699E9 \times x + 2,7505E6 \times x^2 - 916,1759 \times x^3 + 0,1144 \times x^4$

взрослые: $6,6889E10 - 1,3121E8 \times x + 96481,1827 \times x^2 - 31,5209 \times x^3 + 0,0039 \times x^4$

Группа моделей 1-го порядка, описывающих тенденции изменения заболеваемости в изучаемых группах, выглядит следующим образом:

дети: $y = -188860,7 + 95,2 \times x$

подростки: $y = -44123,7 + 22,7 \times x$

взрослые: $y = 50417,6 - 24,8 \times x$

Значимость коэффициентов моделей оценивали по t критерию, об адекватности построенных моделей судили по коэффициентам детерминации и соответствию распределения остатков нормальному закону в соответствии с рекомендациями А.А. Халафяна (2008) [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показало проведенное исследование, построенные полиномиальные регрессионные модели характеризовали динамику заболеваемости по наиболее информативным классам болезней, что позволило выявить существенный (в 4,5 раза) рост общей заболеваемости детей (+95,2 единицы) на фоне сравнительно незначительного разнонаправленного изменения заболеваемости подросткового населения (увеличения на +22,8 единицы) и взрослого населения (снижения на -24,8 относительных единиц на 1000 соответствующего населения). Уровень общей заболеваемости взрослого населения изменялся за период с 1992 по 2009 годы от $1403,7 \pm 49,8$ до $701,4 \pm 30,8$ условных единиц. При этом можно выделить два временных периода. Так, с 1992 по 1998 гг. общая заболеваемость снижалась, а далее на втором этапе стабилизировалась на уровне в $701,4 \pm 30,8$ случаев на 1000 соответствующего населения. Динамика показателей общей заболеваемости подростков за данный период имела схожую тенденцию по сравнению с общей заболеваемостью взрослых, а с 1999 г. отмечался ее рост от $977,5 \pm 46,5$ до $1736,4 \pm 51,2$ случаев. Характер изменения заболеваемости детей за изучаемый период качественно иной по сравнению с заболеваемостью взрослых и подростков: показатели общей заболеваемости однонаправленно росли от величин $947,1 \pm 42,7$ случаев в 1992 – 1995 годах до $2303,1 \pm 62,1$ в 2009 г.

Модели первого порядка показывают линейные (упрощенные по сравнению с полиномами высших степеней) изменения заболеваемости по годам и позволяют по коэффициентам при независимой переменной оценивать направление (увеличение или уменьшение) и предсказать годовую скорость изменения самой заболеваемости. Так, в модели заболеваемости взрослых коэффициент X равен величине -24,8, что показывает скорость этого убывания за каждый год. В это же время, скорость прироста заболеваемости подростков имеет

величину, равную +22,8, а скорость прироста общей заболеваемости детей составляет величину +95,2 случаев на 1000 детского населения.

Уравнения полиномиальных регрессионных моделей заболеваемости взрослого населения для каждого из изучаемых информативных классов болезней показывают, что заболеваемость в классе болезней психических расстройств за период времени с 1992 по 2009 гг. не имеет существенных взлетов и падений. Изменения происходят в интервале $\pm 10,0$ условных единиц, что может характеризовать достаточно устойчивые психические реакции взрослого населения на происходящие процессы в стране за изучаемый период времени.

Анализ заболеваемости взрослого населения показал, что коэффициент при независимой переменной X в классе психических расстройств равен -0,06, что близко к нулю и означает незначительные изменения показателя. В классе болезней органов пищеварения коэффициент составил -4,4, в классе болезней нервной системы и органов чувств -9,0, что показывает скорость изменения показателей заболеваемости. Таким образом, моделирование заболеваемости взрослого населения показывает, что уровень психических расстройств за период времени с 1992 г. по 2009 г. не имеет существенных изменений и не может служить критерием (не может выражать тенденции) состояния социально-экономических изменений в обществе. Динамика же заболеваемости взрослого населения в классах болезней нервной системы и органов пищеварения существенно различается по характеру и частоте заболеваемости, что отражает тенденции состояния социально-экономических изменений в обществе и уровень медицинского обслуживания взрослого населения.

Показатели заболеваемости подростков по трем изучаемым классам: психические расстройства, болезни нервной системы и органов пищеварения с 1992 по 2009 г. изменялись разнонаправленно. Наибольшие колебания происходили в классе болезней нервной системы и органов чувств. Точную оценку скорости и направления изменения уровней заболеваемости в данных классах болезней показывают линейные модели заболеваемости подростков. Так, коэффициент при независимой переменной X в классе психических расстройств равен +0,8, что близко к нулю. В классе болезней пищеварения коэффициент -0,01, в классе болезней нервной системы и органов чувств -11,39. Это означает незначительные изменения в заболеваемости подростков психическими расстройствами и болезнями органов пищеварения и достаточно существенные, наиболее резко изменяющиеся - в классе болезней нервной системы и органов чувств.

Группа моделей, отражающих динамику показателей заболеваемости детей по анализируемым классам, показывает, что коэффициент при независимой переменной X в классе болезней психических расстройств равен +0,7, что близко

к нулю, в классе болезней органов пищеварения — +2,9, в классе болезней нервной системы и органов чувств составил — 2,2. Это означает отсутствие изменений в заболеваемости психическими расстройствами и наличие незначительных изменений показателей заболеваемости (от +2 до —3 условных единиц) в классах болезней органов пищеварения, болезней нервной системы и органов чувств.

Среди анализируемых трёх классов заболеваний (психические расстройства, болезни нервной системы, болезни органов пищеварения), наибольший темп изменения показателей заболеваемости в условиях социально-экономических преобразований продемонстрировали болезни нервной системы. При этом наиболее выраженный рост данного показателя в ответ на негативное изменение социально-экономических условий продемонстрировали подростки, затем взрослые и в меньшей степени — дети.

Таким образом, результаты анализа полученных моделей, отражающих динамику показателей заболеваемости по отдельным возрастным группам населения города Иркутска, позволили установить, что изменения социально-экономических факторов взаимосвязаны с уровнями формирования здоровья населения и являются важным звеном в информационной системе охраны общественного здоровья. Кроме этого, результаты оценки основных тенденций динамики показателей заболеваемости различных групп населения свидетельствуют о том, что уровень популяционного здоровья является важным диагностическим критерием эффектив-

ности социально-экономических преобразований в обществе и способствуют определению приоритетов в управлении здоровьем населения на региональном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гладышев А.В., Давлетшина Л.А., Игнатов И.В. Прикладной анализ демографической ситуации на региональном уровне. — М.: МЭСИ, 2010. — 141 с.
2. Захаренков В.В. Здоровье и сохранение трудового потенциала населения крупного промышленного региона. — Новокузнецк: Полиграфист, 2011. — 233 с.
3. Коровин С.А., Гольменко А.Д., Хаптанова В.А. Современные демографические процессы в столице Восточно-Сибирского региона в период экономических реформ // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 6 (76), Ч. 1. — С. 206—208.
4. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных: учебник. — 3-е изд. — М.: ООО «Бином-Пресс», 2008. — 512 с.
5. Чеченин Г.И. Системный подход и системный анализ в здравоохранении и медицине. — Новокузнецк: МАОУ ДПО ИПК, 2011. — 347 с.
6. Щепин О.П. Здоровье населения региона и приоритеты здравоохранения / под ред. проф. О.П. Щепина, В.А. Медика. — М.: ГЭОТАР, 2010. — 384 с.
7. Suhrcke M., Rocco L., McKee M. et al. Экономические последствия неинфекционных заболеваний и травм в Российской Федерации. Европейская обсерватория по системам и политике здравоохранения. — Тверь, 2008. — 134 с.

Сведения об авторах

Коровин Сергей Александрович — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории проблем общественного здоровья ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: (8-3952) 20-09-14; e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru)

Кулеш Дмитрий Владимирович — кандидат медицинских наук, директор института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: 8 (3952) 24-03-52; e-mail: niiem_irkutsk@mail.ru)

Хаптанова Валентина Абавна — ассистент кафедры поликлинической терапии и ОВП Иркутского государственного медицинского университета

Ильин Владимир Петрович — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и патологии эндокринной системы ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 20-73-67; e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru)

Черкашина Анна Глебовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории проблем общественного здоровья ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: 8 (3952) 20-09-14; e-mail: anna_glebovna@mail.ru)

Лебедева Людмила Николаевна — лаборант-исследователь лаборатории проблем общественного здоровья ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: 8 (3952) 20-09-14; e-mail: leb_46@mail.ru)

С.В. Николаева

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ МИКОБАКТЕРИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БУРЯТИЯ

Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер им. Г.Д. Дугаровой (Улан-Удэ)

Представлены результаты лечения больных туберкулезом легких с первичной (основная группа) множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и с приобретенной (группа сравнения) МЛУ к МБТ (микобактериям туберкулеза) в Республике Бурятия. Для оценки результатов лечения больных использованы показатели в соответствии со стандартными международными определениями случаев. Показатель негитации мазка мокроты выше в основной группе — 77,8 %, в группе сравнения — 44,4 % ($p < 0,05$). Показатель конверсии мазка мокроты в основной группе — 78 %, в группе сравнения — 41,9 % ($p < 0,01$). Нарастание спектра лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам (ПТП) резервного ряда до развития широкой лекарственной устойчивости чаще встречалось среди случаев с приобретенной МЛУ — 21 (10,3 %) больных. Переносимость ПТП резервного ряда в основной группе лучше, чем в группе сравнения, 28 и 43,4 % соответственно ($p < 0,05$). Через 24 месяца лечения исход, расцененный как «излечение», зарегистрирован в группе больных с первичной МЛУ и составил 26 % против 10,8 % в группе сравнения ($p < 0,01$). «Безуспешное лечение» отмечено только в группе с вторичной МЛУ — 5 человек (2,5 %). Показатель прерванного лечения в группе сравнения — 28,1 %, в основной группе — 18 % больных. Летальный исход от прогрессирования туберкулеза зарегистрирован только в группе больных с приобретенной МЛУ — 21 случай (10,3 %). Повышение эффективности лечения туберкулеза с МЛУ возможно за счет использования ускоренных методов обнаружения лекарственной устойчивости МБТ. Проведенный анализ позволяет предполагать, что своевременное назначение адекватного режима терапии больным с МЛУ способствует достижению высокой эффективности лечения.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лечение, множественная лекарственная устойчивость

EFFECTIVE MANAGEMENT OF PULMONARY TUBERCULOSIS COMPLICATED WITH MYCOBACTERIAL DRUG RESISTANCE IN THE REPUBLIC OF BURYATIA

S.V. Nikolayeva

Republican Clinical TB dispensary named after G.D. Dugarova, Ulan-Ude

We present the results of treatment of patients with primary multidrug resistant pulmonary tuberculosis (MDR PT) (main group) and with acquiring MDR PT (comparison group) in Republic of Buryatia. We used the indexes for estimation of the treatment results according to the international standard. Index of sputum clean negativations is higher in main group — 77,8 %, in comparison group — 44,4 %. The rate of negative sputum in main group was 78 %, in comparison group — 41,9 % ($p < 0,01$). Increasing of drug resistance to reserved medication up to MDR were often in the 2nd group (21/10,3 %). Tolerability to reserved medication in the 1st group was better than in the 2nd group (28 % and 43,4 % correspondingly, $p < 0,05$). In 24 months there were 26 % recovered patients in the 1st group and 10,8 % in the 2nd group ($p < 0,01$). Negative treatment result was observed only in the 1st group ($n = 5$, 2,5 %). Treatment was interrupted in 18 % of the 1st group of patients and in 28,1 % of the 2nd group of patients. There were 21 patients died in the 2nd group (10,3 %). We suppose that in the cases of tuberculosis the treatment results could be improved by the early diagnose of MDR and balanced anti-tuberculosis treatment.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, treatment, multidrug resistance

В последние годы в республике Бурятия отмечается тенденция к стабилизации основных показателей эпидемиологической ситуации по туберкулезу. Показатель заболеваемости туберкулезом в 2011 г. достиг 126,7 на 100 тыс. населения, превысив в 1,6 раза среднероссийский показатель. Показатель смертности снизился до 16,4 на 100 тыс. населения, что ниже в 1,7 раза показателя СФО. Показатель распространенности составил 233,8, темп снижения — 8,8 %. Показатель распространенности туберкулеза превысил среднефедеративный уровень в 1,3 раза, но ниже в 1,2 раза показателя СФО. Заболеваемость детей и подростков туберкулезом считается важным прогностическим эпидемиологическим показателем, отражающим

общую эпидемическую ситуацию по туберкулезу. Показатель заболеваемости детского населения в последние 3 года снизился с 55,9 в 2009 г. до 27,0 в 2011 г., темп снижения составил — 48,9 %.

Стандартная контролируемая химиотерапия туберкулеза высокоэффективна при лечении туберкулеза, вызываемого чувствительным возбудителем [1, 2]. Распространение туберкулеза, вызванного возбудителем с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), в настоящее время является серьезной проблемой здравоохранения [1, 6, 7]. МЛУ микобактерий (МБТ) является наиболее тяжелой формой бактериальной устойчивости [5]. Показатель распространенности МЛУ-ТБ по республике за 3 последних года увеличился с

38,0 в 2009 г. до 59,6 в 2011 г., темп роста составил — 36,2 %. Показатель превышает показатель СФО в 1,4 раза и среднероссийский показатель в 2,6 раза (РФ — 22,1).

Особую тревогу вызывает неуклонный рост числа больных с первичной МЛУ МБТ [1]. У пациентов с впервые выявленным и с рецидивами туберкулеза легких встречается высокий уровень первичной и вторичной МЛУ МБТ не только к основным, но и резервным противотуберкулезным препаратам (ПТП) [4]. Больные с хроническими формами туберкулеза легких являются группой высокого риска развития МЛУ, следующим этапом которого является формирование широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) — сочетанию лекарственной устойчивости к основным и резервным ПТП [4].

Лекарственная устойчивость МБТ имеет не только клинико-эпидемиологическое, но и экономическое значение, так как лечение таких больных обходится дороже, чем больных с МБТ, чувствительными к основным ПТП. С внедрением в практику быстрых методов диагностики лекарственной устойчивости МБТ появилась возможность своевременного назначения режима химиотерапии резервными ПТП больным с первичной МЛУ МБТ [2].

Разработка стандартов лечения лекарственно-резистентного туберкулеза является одним из приоритетных направлений современной фтизиатрии [2, 5].

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности лечения больных туберкулезом легких с МЛУ в Республике Бурятия.

Материалы и методы исследования

Основную группу (1-я) составили 50 больных с впервые выявленной (первичной) МЛУ к МБТ. Среди больных основной группы мужчин — 29 (58 %), женщин — 21 (42 %). В эту группу вошли впервые выявленные ранее не леченные больные с туберкулезом легких, у которых была выявлена МЛУ.

Группу сравнения (2-я) составили 203 больных с приобретенной (вторичной) МЛУ к МБТ. В группе сравнения мужчин — 160 (78,8 %), женщин — 43 (21,2 %). Во всех случаях исходом предыдущего курса лечения явилась неудача в связи с выявлением МЛУ МБТ.

Исследование лекарственной устойчивости МБТ проводилось дважды: с помощью автоматизированной системы на анализаторе ВАСТЕС MGIT 960, повторно методом абсолютных концентраций на плотных средах на ПТП 1 и 2 ряда у больных туберкулезом легких с бактериовыделением по результатам посева мокроты.

Мониторинг лечения включал: ежемесячное двукратное микробиологическое исследование мокроты (мазок и посев), ежемесячное биохимическое исследование крови, рентгенография органов грудной клетки каждые 3 месяца, ежемесячное определение массы тела больного, контроль побочных эффектов лечения и их купирование, ау-

диометрия, исследование функции печени и почек в зависимости от исходного состояния пациента.

Химиотерапию назначали по 4-й категории согласно приказу № 109 от 21.03.2003 г. Министерства здравоохранения Российской Федерации, которая состояла из интенсивной и поддерживающей фазы лечения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У всех больных был диагностирован распространенный деструктивный процесс в легких. В основной группе больных инфильтративная форма заболевания отмечена у 41 (82 %), диссеминированный туберкулез легких — у 5 (10 %), впервые выявленный фиброзно-кавернозный туберкулез — у 2 (4 %), казеозная пневмония — у 2 (4 %) человек. Группа пациентов с вторичной МЛУ представлена нозологическими формами: инфильтративный — 99 (48,8 %), фиброзно-кавернозный — 77 (37,9 %), диссеминированный — 22 (10,8 %), казеозная пневмония — 5 (2,5 %). Изучение клинической структуры туберкулеза установило, что у больных с первичной МЛУ встречались преимущественно благоприятные инфильтративные формы (82 %), при вторичной МЛУ — хроническая фиброзно-кавернозная форма (37,9 %).

Выявлены различия в спектре МЛУ между анализируемыми группами. В основной группе отмечена лекарственная устойчивость изониазиду (H) и рифампицину (R) у 6 (12 %), H, R и стрептомицину (S) у 36 (72 %), к H,R,S и этамбутолу (E) у 6 (12 %), к H,R,S и канамицину (K) у 2 (4 %) больных. В группе сравнения отмечена HR у 10 (4,9 %), HRS у 128 (63,1 %), HRSE у 34 (16,7 %), HRSK у 14 (6,9 %), HRE у 3 (1,5 %), HRSEK у 14 (6,9 %) больных, из чего следует, что при приобретенной МЛУ спектр лекарственной устойчивости шире: вдвое чаще встречается устойчивость к этамбутолу (25,1 %) и канамицину (13,8 %).

Для оценки результатов лечения больных туберкулезом легких с МЛУ использованы несколько показателей в соответствии со стандартными международными определениями случаев.

Показатель негативации мазка мокроты — число больных с положительным мазком, у которых к концу начальной фазы лечения был отрицательный мазок, от общего числа всех случаев с положительным мазком. В основной группе показатель негативации мазка мокроты достоверно выше и составил 77,8 %, в группе сравнения практически вдвое ниже — 44,4 % ($p < 0,05$).

Показатель конверсии мокроты — число больных с положительной культурой, у которых к концу начальной фазы лечения был отрицательный посев, от общего числа всех случаев с положительным посевом. В основной группе показатель конверсии мазка мокроты достоверно выше и составил 78 %, в группе сравнения — 41,9 % ($p < 0,01$).

Амплификация МБТ к ПТП резервного ряда среди случаев с первичной МЛУ встречалась у 2 (4 %) больных. В среднем через 13,5 месяцев лечения у 2 больных сформировалась ШЛУ.

Амплификация к ПТП резервного ряда среди случаев с приобретенной МЛУ встречалась чаще — у 21 (10,3 %) больных. В среднем расширение спектра устойчивости МБТ отмечено через $11 \pm 4,95$ месяца лечения. Чаще всего развилась лекарственная устойчивость к протионамиду — 14 больных (6,9 %), к офлоксацину — 13 (6,4 %), канамицину — 11 (5,4 %). Реже отмечена устойчивость к капастату — 7 (3,4 %), ПАСК — 6 (3 %), циклосерину — 4 (2 %) больных. В совокупности развилась ШЛУ у 9 (4,5 %) больных.

Переносимость ПТП резервного ряда в основной группе была лучше, чем в группе сравнения, и составила 28 и 43,4 % соответственно ($p < 0,05$).

Побочные неустраняемые реакции токсического типа отмечены у 14 больных (28 %). Непереносимость инъекционных ПТП в виде значительного снижения слуха, подтвержденного аудиограммой в динамике, развилась у 5 больных в среднем через 4,2 месяца лечения. На прием коксерина у 3 больных в среднем на 6-м месяце развился судорожный синдром, на прием офлоксацина у 4 больных в среднем на 4-м месяце — нарушение ритма сердца, агранулоцитоз, артралгии, мигренеподобные боли. На прием протионамида у 2 больных на 3-м месяце лечения возникли явления со стороны желудочно-кишечного тракта: тошнота, рвота, боли в желудке. Побочных реакций аллергического и токсико-аллергического типа в основной группе больных не встречалось.

В группе сравнения побочные неустраняемые реакции зарегистрированы чаще в 1,5 раза — у 88 (43,4 %) больных. Побочные реакции аллергического типа в виде дерматита встречались у 4 (2 %) больных на прием офломака и пазера. Токсико-аллергические реакции развились у 2 (1 %) больных на прием селемицина и капастата в виде покраснения кожи лица, головокружения, гипотонии, потери сознания. Токсические реакции умеренной и выраженной интенсивности, потребовавшие постоянной отмены ПТП-виновника, развились у 82 (40,4 %) больных.

Чаще всего встречались токсические реакции на селемицин — у 28 (34,1 %) пациентов в виде снижения слуха, шума в ушах в среднем через 4,9 месяца от начала лечения. Вторым по непереносимости из препаратов резервного ряда был протионамид. После приема протионамида у 13 (15,8 %) больных развилось токсическое действие ПТП в среднем через 4 месяца, из них у 9 отмечались желудочно-кишечные расстройства, у 2 пациентов комбинация протионамида и пазера вызвала лекарственный гепатит, у двух — гипотиреоз.

Следующим по непереносимости был пазер — на него развились в среднем через 5 месяцев побочные реакции у 10 (12,2 %) больных. У большинства больных (8) были предъявлены жалобы со стороны желудочно-кишечного тракта в виде снижения или отсутствия аппетита, тошноты, рвоты и поноса, обострения язвенной болезни желудка. Реже развивались артралгии (1 больной), гипотиреоз (1 больной).

После приема коксерина у 9 (11 %) больных в среднем через 5,3 месяца развились тяжелые побочные реакции со стороны центральной нервной системы в виде развития острого психоза у двух больных, попытки суицида у одного больного, судорожного синдрома у троих, интенсивных головных болей и головокружения у троих больных.

После инъекций капастата у 8 (9,8 %) больных в среднем после 3,4 месяца развилось стойкое снижение слуха, в 1 (1,2 %) случае — острая почечная недостаточность.

Прием офломака способствовал возникновению нарушения сердечного ритма у двоих, артралгии у 5, острой почечной недостаточности у одного, в целом побочные реакции появились у 8 (9,8 %) больных.

Через 24 месяца лечения по 4 категории благоприятный исход, расцененный как «излечение», зарегистрирован в группе больных с первичной МЛУ и составил 26 % (13 из 50), это значительно выше чем в группе сравнения ($p < 0,01$). Во 2-й группе излечено всего 21 больной и один завершил курс лечения, что в общей совокупности в 2,4 раза ниже и составило 10,8 %.

Исход лечения, который зарегистрирован как «безуспешное лечение», отмечен только в группе с вторичной МЛУ — 5 человек из 203 (2,5 %). Среди больных с первичной МЛУ неудачи лечения не наблюдали.

Показатель прерванного лечения высокий в группе сравнения 57 из 203 (28,1 %), тогда как в основной группе прервали лечение 9 больных из 50, что составило 18 %.

Летальный исход от прогрессирования туберкулезного процесса зарегистрирован в группе больных с приобретенной МЛУ — 21 больной (10,3 %), летальный исход от других причин — 3 больных (1,5 %). В группе больных с первичной МЛУ зарегистрирован один случай летального исхода не от туберкулеза (2 %).

Поскольку набор больных в когорту завершился в конце мая 2010 года, часть пациентов продолжают курс лечения: в основной группе 27 (54 %), в группе сравнения — 95 человек (46,8 %), исход лечения которых в настоящее время не определен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение эффективности лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза возможно за счет использования ускоренных методов обнаружения лекарственной устойчивости МБТ, что позволяет своевременно изменять режим химиотерапии. Возможность эффективного лечения туберкулеза с МЛУ до 70 % подтверждается опубликованными исследованиями в других регионах [1]. Проведенный анализ предполагает, что своевременное назначение адекватного режима химиотерапии больным туберкулезом легких с МЛУ МБТ способствует достижению эффективности лечения в более короткие сроки по показателю негативации мазка мокроты и конверсии мазка мокроты в 77,8 % и 78 % соответственно, а также по исходу курса лечения — «излечение» в 26 %.

Немаловажен факт хорошей переносимости ПТП резервного ряда при первичной МЛУ, который не будет негативно отражаться на эффективности лечения.

Амплификация спектра устойчивости МБТ при несвоевременном выявлении МЛУ и нестандартизированном подходе к его лечению способствует развитию ШЛУ, что в прогностическом плане является неблагоприятным фактором ухудшения эпидемиологической ситуации по туберкулезу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Власова Н.А., Никишова Е.И., Миронюк О.М., Марьяндышев А.О. Результаты лечения 100 больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью, получивших лекарственные препараты по одобрению комитета «Зеленый Свет» Всемирной организации здравоохранения в 2005 году, в Архангельской области // Туберкулез и болезни легких. — 2010. — № 8. — С. 44 — 49.
2. Дауров Р.Б. Клинико-рентгенологическая динамика у впервые выявленных больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий при раннем назначении резервной схемы химиотерапии по данным тест-системы «ТБ-Биочип» // Туберкулез и болезни легких. — 2010. — № 4. — С. 10 — 13.
3. Дорожкова И.Р., Попов С.А., Медведева И.М. Мониторинг лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в России за 1979 — 1998 гг. // Пробл. туб. — 2000. — № 5. — С. 19 — 22.
4. Кононец А.С., Сафонова С.Г., Сидорова С.В., Хорошилова Н.Е. и др. Клинические проявления и эффективность лечения больных деструктивным туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий в противотуберкулезных учреждениях ФСИН России // Пульмонология. — 2008. — № 3. — С. 67 — 72.
5. Рекомендации по лечению резистентных форм туберкулеза. — ВОЗ. — Женева, 1998. — Пер. с англ. — 47 с.
6. Самойлова А.Г., Марьяндышев А.О. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза — актуальная проблема фтизиатрии // Пробл. туб. — 2005. — № 7. — С. 3 — 9.

Сведения об авторах

Николаева Сайжина Васильевна — канд-идат медицинских наук, заместитель главного врача по лечебной работе ГУЗ РКПТД им. Г.Д. Дугаровой (670045, г. Улан-Удэ, ул. Кленовая, 146; сот. тел.: 89085939656; e-mail: nachmed_rptd@mail.ru)

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 579.25, 579.61

N. Ohashi ¹, Y. Yoshikawa ¹, T. Masuzawa ²

OVERVIEW OF TICK-ASSOCIATED RICKETTSIALES BACTERIA IN JAPAN

¹University of Shizuoka, Shizuoka, Japan²Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan

Rickettsiales bacteria are obligatory intracellular parasites in vertebrates and/or invertebrates, and some cause severe febrile illness in humans as well as livestock. In Japan, "*Rickettsia japonica*" and "*Orientia tsutsugamushi*" are well known as causative agents for "Japanese spotted fever" transmitted by ticks and "*Tsutsugamushi* disease" transmitted by mites, respectively. In recent years, many researchers have reported the presence of several tick-associated *Rickettsiales* bacteria in Japan, mostly by molecular-based analyses. Some of these might be public health or veterinary significance. Such *Rickettsiales* bacteria include spotted fever group rickettsiae other than *R. japonica*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., and *Neoehrlichia* sp. We will summarize and introduce the representatives of these *Rickettsiales* bacteria present in Japan.

Key word: *Rickettsiales*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neoehrlichia*

ОБЗОР БАКТЕРИЙ ПОРЯДКА RICKETTSIALES, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ В ЯПОНИИ

Н. Охашаи ¹, Й. Йошикава ¹, Т. Масузава ²¹University of Shizuoka, Shizuoka, Japan²Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan

Бактерии порядка *Rickettsiales* являются облигатными внутриклеточными паразитами позвоночных и беспозвоночных животных и некоторые из них вызывают тяжелые лихорадочные заболевания у человека и домашних животных. В Японии хорошо известны микроорганизмы *Rickettsia japonica* и *Orientia tsutsugamushi*, которые являются возбудителями Японской пятнистой лихорадки, переносимой иксодовыми клещами и лихорадки Цуцугамуши, переносимой соответственно краснотелковыми клещами. В последние годы появляется много сообщений о выявлении, преимущественно молекулярно-генетическими методами, в Японии нескольких новых бактерий порядка *Rickettsiales*, ассоциированных с клещами. Некоторые из этих бактерий могут иметь существенное ветеринарное или медицинское значение. Подобные бактерии включают риккетсий группы клещевых пятнистых лихорадок не относящихся к *R. japonica*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., и *Neoehrlichia* sp. В данном сообщении характеризуются основные представители этих групп, обитающие на территории Японии.

Ключевые слова: *Rickettsiales*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neoehrlichia*

The order *Rickettsiales* includes the genera *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Neoehrlichia* etc. [1, 2]. In Japan, before the first report of "Japanese spotted fever (JSF)" caused by *Rickettsia japonica* in 1984 [3], "*Tsutsugamushi* disease" caused by *Orientia tsutsugamushi* had only been known as a rickettsiosis. *R. japonica* and *O. tsutsugamushi* are transmitted by ticks and mites, respectively. In recent years, many isolation and molecular analyses revealed the presence of tick-associated *Rickettsiales* bacteria such as spotted fever group rickettsiae other than *R. japonica*, *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., and *Neoehrlichia* sp. in ticks or wild mammals. The representatives of these *Rickettsiales* bacteria in Japan are summarized as below.

SPOTTED FEVER GROUP (SFG) RICKETTSIAE

So far, SFG rickettsiae which were identified in Japan are *R. japonica* [4], *R. helvetica* [5], *R. tamurae* [6], *R. asiatica* [7], *Candidatus R. tarasevichiae* [8],

and *R. heilonjiangensis* [9]. *Rickettsia japonica* was isolated from tick species of *Haemaphysalis histricis*, *H. cornigera*, *H. flava*, *H. longicornis*, *Dermacentor taiwanensis*, and *Ixodes ovatus* [10]. *R. helvetica* was also isolated from ticks of *Ixodes ovatus*, *I. persulcatus*, and *I. monospinosus* [5] and also detected from Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, a northern part of Japan [11]. *R. tamurae* was isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks [6]. *R. asiatica* was isolated from *I. ovatus* ticks [7]. *Candidatus R. tarasevichiae* was detected by PCR from *I. persulcatus* ticks in Hokkaido [8]. *R. heilonjiangensis* was isolated from *H. concinna* ticks [9]. Of these, *R. japonica* cause severe febrile illness in humans frequently in Japan [12]. Human infection by *R. heilonjiangensis* has recently been confirmed [9]. Additionally, *R. tamurae* was found to cause rickettsiosis, but it seems to be rare. The immunocompromised hosts are probably more sensitive to *R. tamurae* infection [13].

EHRlichia spp.

Ehrlichia muris have firstly been isolated from a wild mouse of *Eothenomys kageus* (synonym of *E. smithi*) and reported in 1995 in Japan [14]. Later, several nonclassified genetic variants of the genus *Ehrlichia* have been found in Japan. Of these, the *Ehrlichia* HF strain has well studied. The HF strain was initially isolated and described from *I. ovatus* tick in 2000 [15]. The genetic variants of HF strain were detected by molecular analysis from wild mice of *Apodemus argenteus*, *A. speciosus*, and *E. smithi* [16] and dogs [17]. These bacteria cause fetal infection to immunocompetent laboratory mice. Recently, the *Ehrlichia* variant closely related to *E. ewingii* was identified from *H. longicornis* ticks [18]. *E. chaffeensis* which is well known as a human pathogen was detected from Sika deer (*Cervus nippon nippon*) and described in 2009 [19], although there is no report of human infection in Japan to date.

ANAPLASMA spp.

We have initially detected *Anaplasma phagocytophilum*, a human pathogen, from *I. persulcatus* and *I. ovatus* ticks inhabiting Japan in 2005 [20]. Recently, we confirmed that *H. formosensis*, *H. longicornis*, and *H. megaspinosus* were also potential arthropod vectors for transmission of *A. phagocytophilum* [21]. The genetic variants of *A. phagocytophilum* have also been identified from Sika deer and boars in Japan [22, 23]. Besides *A. phagocytophilum*, *A. centrale* and *A. bovis* were detected from deer and *Haemaphysalis* ticks [22]. *A. platys* was identified from dog in Japan [24].

NEOEhrlichia sp.

Candidatus Neoehrlichia mikurensis and its genetic variants have firstly discovered from wild rodents (*Rattus norvegicus*) and *I. ovatus* ticks in Japan in 2004 [2]. Later, we and the others were also detected from wild mice of *A. argenteus*, *A. speciosus*, and *E. smithi* [25, 26]. Recently, the human cases of *Candidatus N. mikurensis* infection have been reported in Europe [27-29]. In the most cases, the disease developed in immunocompromised individuals. The vector candidates are *Ixodes* ticks such as *I. ricinus*, *I. persulcatus*, and *I. ovatus* in Europe and Asia [2, 30, 31].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001, Nov. — Vol. 51 (Pt 6). — P. 2145–2465.
2. Kawahara M., Rikihisa Y., Isogai E., Takahashi M. et al. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in

- Ixodes ovatus* ticks // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2004, Sep. — Vol. 54 (Pt 5). — P. 1837–1843.
3. Mahara F., Koga K., Sawada S., Taniguchi T. et al. The first report of the rickettsial infections of spotted fever group in Japan: three clinical cases // Kansenshogaku Zasshi. — 1985. — Vol. 59. — P. 1165–1171.
4. Uchida T., Uchiyama T., Kumano K., Walker D.H. *Rickettsia japonica* sp. nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1992, Apr. — Vol. 42 (2). — P. 303–305.
5. Fournier P.E., Fujita H., Takada N., Raoult D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan // J. Clin. Microbiol. — 2002, Jun. — Vol. 40 (6). — P. 2176–2181.
6. Fournier P.E., Takada N., Fujita H., Raoult D. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006, Jul. — Vol. 56 (Pt. 7). — P. 1673–1675.
7. Fujita H., Fournier P.E., Takada N., Saito T. et al. *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2006, Oct. — Vol. 56 (Pt. 10). — P. 2365–2368.
8. Inokuma H., Ohashi M., Jilintai, Tanabe S. et al. Prevalence of tick-borne *Rickettsia* and *Ehrlichia* in *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* in Tokachi district, Eastern Hokkaido, Japan // J. Vet. Med. Sci. — 2007, Jun. — Vol. 69 (6). — P. 661–664.
9. Ando S., Kurosawa M., Sakata A., Fujita H. et al. Human *Rickettsia heilongjiangensis* infection, Japan // Emerg. Infect. Dis. — 2010, Aug. — Vol. 16 (8). — P. 1306–1308.
10. Fujita H. Cell culture system for isolation of disease agents: 15 years of experience in Ohara Research Laboratory // Annual Report of Ohara General Hospital. Fukushima (Japan); Ohara General Hospital. — 2008. — P. 21–42.
11. Inokuma H., Seino N., Suzuki M., Kaji K. et al. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) in Japan // J. Wildl. Dis. — 2008, Jan. — Vol. 44 (1). — P. 164–167.
12. National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare. Scrub typhs and Japanese spotted fever in Japan, as of December 2006 // Infectious Agents Surveillance Rept. — 2006. — P. 27–32.
13. Imaoka K., Kaneko S., Tabara K., Kusatake K. et al. The First Human Case of *Rickettsia tamurae* infection in Japan // Case Rep. Dermatol. — 2011. — Vol. 3 (1). — P. 68–73.
14. Wen B., Rikihisa Y., Mott J., Fuerst P.A. et al. *Ehrlichia muris* sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and serological, morphological, and biological characteristics // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1995, Apr. — Vol. 45 (2). — P. 250–254.
15. Shibata S., Kawahara M., Rikihisa Y., Fujita H. et al. New *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* isolated from *Ixodes ovatus* ticks in Japan // J. Clin. Microbiol. — 2000, Apr. — Vol. 38 (4). — P. 1331–1338.

16. Naitou H., Kawaguchi D., Nishimura Y., Inayoshi M. et al. Molecular identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan // Microbiol. Immunol. — 2006. — Vol. 50 (1). — P. 45–51.
17. Inokuma H., Ohno K., Onishi T., Raoult D. et al. Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamaguchi and Okinawa Prefectures, Japan // J. Vet. Med. Sci. — 2001, Jul. — Vol. 63 (7). — P. 815–817.
18. Matsumoto K., Takeuchi T., Yokoyama N., Katagiri Y. et al. Detection of the new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia ewingii* from *Haemaphysalis longicornis* in Yonaguni Island, Okinawa, Japan // J. Vet. Med. Sci. — 2011, Nov. — Vol. 73 (11). — P. 1485–1488.
19. Kawahara M., Tajima T., Torii H., Yabutani M. et al. *Ehrlichia chaffeensis* infection of sika deer, Japan // Emerg. Infect. Dis. — 2009, Dec. — Vol. 15 (12). — P. 1991–1993.
20. Ohashi N., Inayoshi M., Kitamura K., Kawamori F. et al. *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks // Emerg. Infect. Dis. — 2005, Nov. — Vol. 11 (11). — P. 1780–1783.
21. Gaowa, Wuritu, Wu D., Yoshikawa Y. et al. Detection and characterization of *p44/msp2* transcript variants of *Anaplasma phagocytophilum* from naturally infected ticks and wild deer in Japan // Jpn J. Infect. Dis. — 2012. — Vol. 65 (1). — P. 79–83.
22. Kawahara M., Rikihisa Y., Lin Q., Isogai E. et al. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan // Appl. Environ. Microbiol. — 2006, Feb. — Vol. 72 (2). — P. 1102–1109.
23. Masuzawa T., Uchishima Y., Fukui T., Okamoto Y. et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Boars and Deer in Japan // Jpn J. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 64 (4). — P. 333–336.
24. Inokuma H., Fujii K., Matsumoto K., Okuda M. et al. Demonstration of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan // Vet. Parasitol. — 2002, Dec. — Vol. 110 (1–2). — P. 145–152.
25. Naitou H., Kawaguchi D., Nishimura Y., Inayoshi M. et al. Molecular identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan // Microbiol. Immunol. — 2006. — Vol. 50 (1). — P. 45–51.
26. Tabara K., Arai S., Kawabuchi T., Itagaki A. et al. Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in wild rodents from Shimane Prefecture, Japan // Microbiol. Immunol. — 2007. — Vol. 51 (4). — P. 359–367.
27. Welinder-Olsson C., Kjellin E., Vaht K., Jacobsson S. et al. First case of human "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia // J. Clin. Microbiol. — 2010, May. — Vol. 48 (5). — P. 1956–1959.
28. von Loewenich F.D., Geissdörfer W., Disqué C., Matten J. et al. Detection of "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant // J. Clin. Microbiol. — 2010, Jul. — Vol. 48 (7). — P. 2630–2635.
29. Fehr J.S., Bloemberg G.V., Ritter C., Hombach M. et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis // Emerg. Infect. Dis. — 2010, Jul. — Vol. 16 (7). — P. 1127–1129.
30. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N., Panov V.V. et al. Study of the heterogeneity of 16S rRNA gene and *groESL* operone in the dna samples of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, and "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" determined in the *Ixodes persulcatus* ticks in the area of Urals, Siberia, and far east of Russia // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. — 2011. — Vol. 2. — P. 17–23.
31. Carpi G., Cagnacci F., Wittekindt N.E., Zhao F. et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks // PLoS One. — 2011. — Vol. 6 (10). — e25604.

Сведения об авторах

Ohashi N. — PhD, профессор, зам. декана School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, Shizuoka, Japan (ohashi@u-shizuoka-ken.ac.jp)

Yoshikawa Y. — PhD, научный сотрудник University of Shizuoka, Shizuoka, Japan

Masuzawa T. — PhD, профессор Chiba Institute of Science (CIS), Choshi, Japan

В.М. Лахтин, А.В. Алешкин, М.В. Лахтин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

БАКТЕРИОФАГИ И МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ. ОБЗОР

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского (Москва)

В обзоре литературных и собственных данных рассмотрен потенциал использования бактериофагов в медицинской микробиологии (особенно в случаях множественной лекарственной устойчивости патогенов) и промышленной биотехнологии (в связи с необходимостью деконтаминации и стабилизации пищевых продуктов). Отмечены перспективы бактериофагов в энзимотерапии.

Ключевые слова: бактериофаги, молочнокислые бактерии, антипатогенное действие

BACTERIOPHAGES AND LACTIC ACID BACTERIA. LITERATURE REVIEW

V.M. Lakhtin, A.V. Aleshkin, M.V. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow

The review of literature and own data analysis describe bacteriophages application for medical microbiology (especially in cases of multiple drug resistance of pathogens) and industrial biotechnology (the problems of decontamination and stabilization of foods). Prospects of bacteriophages for enzyme therapy are underlined.

Key words: bacteriophages, lactic acid bacteria, anti-pathogen action

Для молочнокислых бактерий (МКБ) характерны коммуникативные связи в направлениях «Микроб — Микроб» и «Микроб — Хозяин» [1]. Многие коммуникационные взаимосвязи между бактериями опосредуются участием бактериофагов (далее — фагов). Все больше привлекают внимание исследователей фаговая или лизинговая терапия в отношении грамположительных инфекций, фаговые стратегии в синтетической биологии лекарственных препаратов [10, 13, 22, 30, 32]. Фаговые препараты рассматриваются как пробиотики и энзимбиотики, а цитоэндолизины — как новый класс антибактериальных агентов [13, 24, 30].

Особенно хорошо исследованы фаги лактококков и лактобацилл. Накоплен большой опыт по модельным взаимоотношениям между фагами и пробиотическими бактериями. Существующие базы данных о фагах, как стандартизированных носителях генетической информации, упрощают возможности направленного их использования [10]. Среди описанных фагов лактобацилл большинство принадлежит к семействам *Siphoviridae* и *Myoviridae* [37]. При этом наиболее изучены фаги, инфицирующие *Lactobacillus delbrueckii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* и/или *L. gasseri*. В настоящее время доступны 9 полных геномов фагов лактобацилл [37].

Лактобациллы стали моделью взаимоотношений фагов и пробиотических бактерий в связи с имеющими место при ферментации молочных продуктов лизогенными процессами, когда бактерии несут индуцируемые профаги [1, 23]. Стартовые культуры и изолированные МКБ часто используются как естественные источники фагов [23]. Фаги являются универсальным доставочным резервуаром генетического материала: генов протеогликангидролизующих ферментов (селективных лизинов патогенов), вакцинных и других антигенов

патогенов (как усилителей иммунного ответа), лекарственных белковых ингредиентов (антительных фрагментов с выбранным типом действия, например антиротавирусных в составе *L. paracasei* [25]). Многие умеренные фаги лактобацилл и других МКБ индуцируются митомицином-С, что позволяет получать фаги в необходимых количествах, а также управлять клеточным лизисом [28]. Фаги могут иметь важное значение и для таксономического положения бактерий, благодаря их коэволюции с геномом, например, лактобацилл [11]. Для лактобацилл и ряда других МКБ характерны лямбда-подобные фаги [14].

Проблема недопущения переключения лизогенного штамма МКБ на путь автолиза пробиотической культуры является актуальной в молочной промышленности. Штаммы *L. casei*, *L. paracasei* и *L. rhamnosus*, содержащие индуцируемые профаги, обычно исключаются из состава коммерческих продуктов [23]. В связи с этим важными являются: а) выявление МКБ как носителей фагов; б) создание физических (ультрафиолетовое облучение, пастеризация и другие варианты прогрева) и химических условий инактивации фагов в культуре. Например, фаги *L. paracasei* и *L. helveticus* и других КМБ инактивируются при гомогенизации в условиях высокого давления, специальных температурных режимов, в присутствии надуксусной кислоты или химических биоцидов групп А (хлорид четвертичного аммония), С (щелочная хлоридная пена) и Е (этоксигированный нонифенол и фосфорная кислота) [31, 34]. Достигается инактивация цитолиза варьированием внесенного в среду углевода (снижение лизиса лактококков при замене глюкозы на галактозу) [33]. Деацетилирование N-ацетилглюкозамина в пептидогликане деацетилазой снижает автолиз у *Lactococcus lactis* в связи с нарушением сорбции фара [29].

Возможности управления фагами обусловлены, в первую очередь, особенностями их узнавания бактериями. Имеет место двухэтапное начальное взаимодействие фага с протеогликаном грамположительных бактерий (обратимое узнавание хвостом фага в процессе сорбции с последующим необратимым каталитическим связыванием) [35]. Подобно паттерновым взаимодействиям между углеводраспознающими агентами (лектинами) и гликоконъюгатными мишенями [4], в случае распознавания фагами важен рецепторный паттерн (декоративная комбинация химических элементов) для эффективной сорбции [27]. Далее могут наблюдаться литическое действие фагов на клетки или интеграция фаговых генов в хромосому бактерий с последующей возможной мультипликацией фага. В случае цитоллиза важна нативность протеогликана как субстрата фаговых муреин-гидролаз [35].

В фаговых технологиях используются детерминанты и факторы лектин-гликоконъюгатных взаимодействий. Например, лактобациллы с фагообусловленной экспрессией фрагмента-С столбнячного токсина (лектина) позволяют усиливать иммунный ответ [19]. Glc-специфичные лектины могут служить ингибиторами сорбции фага LL-N на липотейхоевую кислоту *L. delbrueckii* [27]. Гликозилирование липотейхоевой кислоты позволяет регулировать сорбцию фага (Gal-содержащая липотейхоевая кислота лактококков действует как ингибитор сорбции фага на лактококки) [18]. Сиалидаза (распознающая сиаловые последовательности) используется как ключевой элемент фаговой терапии против штаммов *E. coli* с полисиаловой капсулой типа K1 (необходимой для сорбции фага) [15].

Фаги перспективны против патогенов, например, вызывающих урогенитальные патологии [36]. Фаготерапия возможна и в условиях сформированных биопленок патогенов. Эффективность фагов обусловлена проникновением в глубокие слои биопленок с помощью кодируемых фагами деполимераз [10]. Нашло также применение фага, кодирующего полисахарид-лиазу, для обработки биопленок *P. aeruginosa* [10]. Литические фаги рассматриваются как новый класс антибиопленочных агентов [21].

Ферментам в фаговом цитоллизе отводится главная роль. К цитолизинным ферментам относятся пептидогликан-гидролазы, муреин-гидролазы, различные амидазы, лизоцимы, деполимеразы и другие [5]. Специфичность лизиса бактерий фаговыми лизинами является ключевой характеристикой препарата. Характерна видовая селективность инфицирования лактобацилл фагом. Например, MLC-A инфицирует *L. paracasei* and *L. casei*, но не *L. rhamnosus* или *L. gasseri* [17]. Это может быть связано с особенностями клеточных площадок МКБ для сорбции фага. Максимальная сорбция фагов на лактобациллы обычно достигается в присутствии катионов Ca и Mg (5–10 мМ), 30 °C при pH 5–7 [17]. Катионы Ca (5 мМ) требуются и для нормального ростового цикла фагов *L. casei*. Некоторые лизины обладают широкой специфичностью. Так,

L. helveticus CNRZ 303, например, продуцирует эндолизин Mur-LH (N-ацетилмурамидазу, 40 кД) с литической активностью в отношении термофильных лактобацилл, лактококков, педиококков, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium linens* и *Enterococcus faecium* [28].

Наибольшее внимание исследователей уделено разработке синергидных содержащих фаги комбинаций в антимикробных препаратах: а) фаговых лизинов, синергидных с бактерицинами и антимикробными пептидами, б) химерных рекомбинантных фаговых лизинов, их комбинаций, расширяющих ряд мишеней бактериальных патогенов. Примером может служить синергизм фагового рекомбинантного лизина LysK и лизостафина (бактериоцина *Staphylococcus simulans*), который используется для лизиса метициллин-резистентных *S. aureus* [12]. Интересно, что и литические фаги лактобацилл йогурта, и бактериоцины лактобацилл (как синергидная пара) способны одновременно индуцироваться митомицином-С [8]. Индуцируемые митомицином-С фаги и бактериоцины лактобацилл ингибируют вагинальные лактобациллы [9]. Перспективны антибиотик-заменяющие сочетания фагов с бактериоцинами (в том числе низином лактококка) и антимикробными пептидами [26]. Для фаговой терапии удобны комбинации двух и более типов фагов для достижения эффекта при большем варьировании условий [16]. Например, фаговый коктейль для лизиса *Klebsiella pneumoniae* содержит фаги GH-K1, GH-K2 and GH-K3 [4]. Пневмококковый (*Streptococcus pneumoniae*) автолизин LytA (N-ацетилмурамоил-L-Ala-амидаза) в сочетании с фаговыми лизоцимами Cpl-1 and Cpl-7 проявляли кооперативный эффект в дезинтеграции биопленок *Streptococcus pneumoniae* [20].

В целом, к преимуществам использования фаготерапии относятся: а) селективное устранение патогена без существенного нарушения прочего микробного пейзажа в организме; б) альтернативное заместительное или синергидное применение в сочетании с прочими антимикробными агентами. Многие умеренные фаги лактобацилл и других МКБ индуцируются простыми способами, что позволяет получать их в препаративных количествах [28].

Новые направления и инновационные подходы в биотехнологии и медицине, развивающиеся на основе фаговых вирусных технологий включают конструирование химерных высокоселективных фагов, их комбинаций с учетом конструкций доставки и реализации необходимых активностей. Проводятся работы по инженерии дизайна пробиотиков как средств доставки лекарств [7], осуществляется стратегия рецепторной мимикрии для создания пробиотиков узнавания мишеней — специфических патогенов и токсинов для усиления иммунного ответа [19]. Использование мукозных вакцин на основе фагов обладает функциональными преимуществами (неинвазивностью и легкостью введения в организм). Разрабатываются фаговые препараты в сочетании с пробиотиче-

скими и непровиотическими лактобациллами и бифидобактериями в направлениях противоллергенного, нормализующего микрофлору организма эффектов, устранения грибковых инфекций [2, 3, 6]. Фаговые цитолитины перспективны для генерирования любых внутриклеточных ферментов МКБ, например, ответственных за ароматизацию продуктов [8]. Развивается аспект персонализации лечения с использованием фаготерапии.

В целом на основании вышесказанного можно заключить, что фаговые цитолитические технологии имеют обоснованные долгосрочные перспективы применения и развития в медицинской и промышленной биотехнологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунобиологические препараты, перспективы применения в инфектологии / под ред. Г.Г. Онищенко [и др.]. — М., ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ. — 2002. — 608 с.
2. Иммунобиологическое противоллергическое средство (варианты) и штамм *Lactobacillus acidophilus* 100 аш ПА, используемый для производства иммунобиологического противоллергического средства / В.А. Алешкин [и др.] // Патент RU(11) 2 431 663. Опубликовано: 20.10.2011 Бюл. № 29.
3. Композиция для перорального применения, содержащая непатогенные микроорганизмы, обладающая способностью нормализовать микрофлору кишечника (варианты) / В.В. Чалов [и др.] // Патент RU(11) 2008 131 894. Опубликовано: 10.02.2010 Бюл. № 4.
4. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека / М.В. Лахтин [et al.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. — 2012. — № 1. — С. 27—36.
5. Лектины и ферменты в биологии и медицине / М.В. Лахтин [и др.]. — М.: Династия, 2010. — 496 с.
6. Препарат, содержащий стафилококковый бактериофаг в качестве препарата для лечения кандидоза / Ю.В. Несвижский [и др.] // Патент RU(11) 2 377 006. Опубликовано: 27.12.2009 Бюл. № 36.
7. Стратегические аспекты конструирования пробиотиков будущего / В.М. Лахтин [и др.] // Вестник РАМН. — 2008. — № 2. — С. 33—44.
8. A.O. Kilig [et al.] Analysis of *Lactobacillus* phages and bacteriocins in american dairy products and characterization of a phage isolated from yogurt // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1996. — Vol. 62. — P. 2111—2116.
9. Analysis of *Lactobacillus* products for phages and bacteriocins that inhibit vaginal lactobacilli / L. Tao [et al.] // *Infect. Dis in Obstetrics & Gynecol.* — 1997. — Vol. 5. — P. 244—251.
10. Azeredo J., Sutherland I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 261—266.
11. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens / B. Burrowes [et al.] // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* — 2011. — Vol. 9. — P. 775—785.
12. Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2008. — Vol. 287. — P. 185—191.
13. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. Bacteriophage Endolysins as a Novel Class of Antibacterial Agents // *Experimental Biology and Medicine.* — 2006. — Vol. 231. — P. 366—377.
14. Brussow H. Phages of dairy bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2001. — Vol. 55. — P. 283—303.
15. Bull J.J., Vimr E.R., Molineux I.J. A tale of tails: sialidase is key to success in a model of phage therapy against K1-capsulated *Escherichia coli* // *Virology.* — 2010. — Vol. 398. — P. 79—86.
16. Chan B.K., Abedon S.T. Phage therapy pharmacology phage cocktails // *Adv. Appl. Microbiol.* — 2012. — Vol. 78. — P. 1—23.
17. Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei* / M.L. Capra [et al.] // *J. Dairy Sci.* — 2006. — Vol. 89. — P. 2414—2423.
18. Characterization of lipoteichoic acids as *Lactobacillus delbrueckii* phage receptor components / L. Raisanen [et al.] // *J. Bacteriol.* — 2004. — Vol. 186. — P. 5529—5532.
19. Culligan E.P., Hill C., Sleator R.D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects // *Gut Pathogens.* — 2009. — 1:19 (12 pages). doi:10.1186/1757-4749-1-19. <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/19>
20. Domenech M., García E., Moscoso M. In Vitro Destruction of *Streptococcus pneumoniae* Biofilms with Bacterial and Phage Peptidoglycan Hydrolases // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2011. — Vol. 55. — P. 4144—4148.
21. Donlan R.M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage // *Trends Microbiol.* — 2009. — Vol. 17. — P. 66—72.
22. Fischetti V.A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens // *Int. J. Med. Microbiol.* — 2010. — Vol. 300. — P. 357—362.
23. Garneau J.E., Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories.* — 2011. — Vol. 10 (Suppl 1). — P. 20. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S20. <http://www.microbialcellfactories.com/content/10/S1/S20>
24. Hermoso J.A., García J.L., García P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 10. — P. 461—472.
25. Integrative expression system for delivery of antibody fragments by lactobacilli / M.C. Martín [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2011. — Vol. 77. — P. 2174—2179.
26. Joerge R.D. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages // *Poultry Science.* — 2003. — Vol. 82. — P. 640—647.
27. Molecular interaction between lipoteichoic acids and *lactobacillus delbrueckii* phages

depends on D-Alanyl and -Glucose substitution of poly(glycerophosphate) backbones / L. Raisanen [et al.] // J. Bacteriol. — 2007. — Vol. 189. — P. 4135–4140.

28. Mur-LH, the Broad-Spectrum Endolysin of *Lactobacillus helveticus* Temperate Bacteriophage -0303 / S.-M. Deutsch [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — Vol. 70. — P. 96–103.

29. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis* / M. Meyrand [et al.] // Microbiology. — 2007. — Vol. 153. — P. 3275–3285.

30. Phage treatment of human infections / S.T. Abedon [et al.] // Bacteriophage. — 2011. — Vol. 1, N 2. — P. 66–85.

31. Quiberon A., Suárez V.B., Reinheimer J.A. Inactivation of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by thermal and chemical treatments // J. Food Prot. — 1999. — Vol. 62. — P. 894–898.

32. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials / M. Fenton [et al.] // Bioengineered Bugs. — 2010. — Vol. 1. — P. 9–16.

33. Reduced lysis upon growth of *Lactococcus lactis* on galactose is a consequence of decreased binding of the autolysin AcmA / A. Steen [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2008. — Vol. 74. — P. 4671–4679.

34. Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application / D.J. Mercanti [et al.] // Food Microbiol. — 2012. — Vol. 29. — P. 99–104.

35. Studies of the receptor for phage $\alpha 25$ in group A streptococci: the role of peptidoglycan in reversible adsorption / P.P. Cleary [et al.] // J. Exp. Med. — 1977. — Vol. 145. — P. 578–593.

36. The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis / S. Letkiewicz [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2010. — Vol. 60. — P. 99–112.

37. Villion M., Moineau S. Bacteriophages of *Lactobacillus* // Front Biosci. — 2009. — Vol. 1. — P. 1661–1683.

Сведения об авторах

Лахтин Владимир Михайлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com, e-mail: lakhtinv@yandex.ru)

Алешкин Андрей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Лахтин Михаил Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Афанасьев Станислав Степанович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заместитель директора ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Алешкин Владимир Андрианович – заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор биологических наук, директор ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, (125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, тел.: 8 (495) 708-02-62, e-mail: info@gabrich.com)

Е.В. Миндолина

ЗАНОС И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ H5N1 В МИРЕ

Сибирский федеральный университет (Красноярск)

За последние 45 лет описано более 30 эпизодов возникновения эпизоотий среди птиц, в ряде случаев сопровождающихся заболеванием людей, подчас с высокой смертностью. Наиболее значительны случаи вспышек гриппа в европейских странах и США.

Разновидности вируса гриппа птиц подтипа H5, являющиеся источником для вируса гриппа птиц субтипа H5N1, циркулирующих в настоящее время, были впервые выделены от гуся в 1996 г. и от погибшего человека в 1997 г. в Гонконге.

Сезонные вспышки гриппа, как правило, вначале появляются на Востоке, а затем перемещаются на Запад. По этой причине вирусы, обнаруженные на раннем этапе в Азии, анализируются и используются для прогнозирования компонентов, применяемых при подготовке вакцин для следующего сезона гриппа. На протяжении последних 50 лет генетическую информацию о постоянно изменяющихся штаммах циркулирующих вирусов гриппа, получаемую в результате безвозмездной передачи и обмена образцами вирусов между странами, об эпидемиологических тенденциях распространения гриппозной инфекции собирала обширная сеть эпиднадзора (Глобальная сеть по эпиднадзору за гриппом), действующая под руководством ВОЗ.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, эпизоотия, сезонные вспышки гриппа

MOLE AND SPREADING OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 IN THE WORLD

E. Mindolina

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

Over the past 45 years, more than 30 episodes of epizootic diseases among birds were described. Some of them caused human diseases, often with high mortality rate. The most crucial cases of influenza outbreaks appeared in Europe and in the USA.

Avian influenza virus types of subtype H5, which are the source for the avian influenza virus subtype H5N1 presented nowadays were first isolated from a goose in 1996 and from the deceased person in 1997 in Hong Kong.

Seasonal flu outbreaks usually appear firstly in the East, and then move to the West. Viruses, therefore, detected at early stages in Asia are analyzed and used to predict the components, which are applicable in the vaccine preparation for the next flu season. Over the past 50 years, genetic information about constantly changing circulating influenza strains, gratuitously received through viruses data communications and exchange between countries, and about epidemiological tendency to infection spreading has been gathered by the wide surveillance network (Global Influenza Surveillance Network), under the guidance of WHO.

Key words: avian influenza virus, epizootic diseases, seasonal flu outbreaks

Многие вирусы попадают на территорию нашей страны с перелетными птицами, которые транспортируют их из южно-азиатских и африканских очагов. Миграционные потоки во многих местах сходятся, так они связались с Юго-Восточной Азией, где был зафиксирован первоначальный очаг возбудителя птичьего гриппа. Из-за отсутствия барьеров для птиц, их роль в переносе арбовирусных инфекций является ведущей. На зимовках и в местах массового гнездования птиц из-за жаркого влажного климата и тесной скученности, для распространения вируса и существования стойких очагов созданы идеальные условия. Перекрестками миграционных путей являются: побережье охотского моря, Командорские и Курильские острова, Сахалин, Западный и Восточный Каспий.

Вирус гриппа относится к ортомиксовирусам. Вирус имеет три антигенно обособленных серологических типа А, В, С. Из них патогенны для человека А, В, С, а для животных — только А. Среди них патогенными для птиц являются штаммы H5N1 и H7N1. Под названием «птичий грипп» подразумевают штамм H5N1, наиболее выделяемый

в последнее время от заболевших птиц и людей и демонстрирующий наибольшую скорость распространения. Грипп птиц — это контагиозная болезнь, варьирующая от летальной чумоподобной до респираторной бессимптомной скрытой форм. Это зависит от вирулентности и тропности вируса, а также от возраста, вида, резистентности организма и сопутствующей инфекции (рис. 1).

По информации ВОЗ, география птичьего гриппа быстро расширяется. Так, только в феврале 2007 года 13 стран сообщили штабквартире ВОЗ в Женеве о том, что на их территории впервые найден опасный вирус H5N1. Среди них Австралия, Азербайджан, Болгария, Германия, Греция, Египет, Индия, Ирак, Иран, Италия, Нигерия, Словения и Франция. Птичий грипп в этих странах сразу же стал приводить к тяжелым последствиям. Кроме прочего, в информации ВОЗ содержится указание на то, что ситуация в различных странах существенно различается.

Высоко патогенный вирус птичьего гриппа H5N1 появился в Гонконге в 1996 — 1997 гг. и в октябре 2006 г. вызвал вспышки заболевания

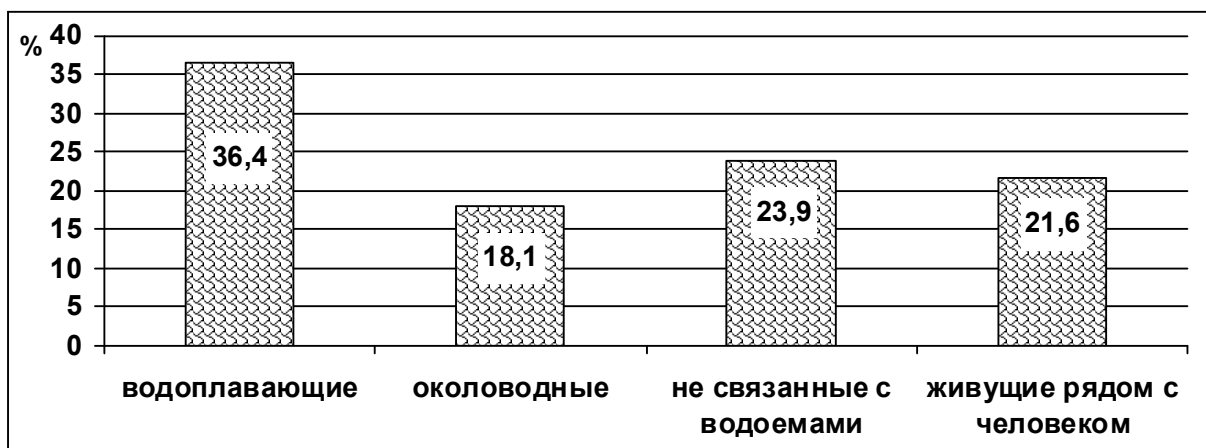


Рис. 1. Распределение долей видов диких птиц с подтвержденным наличием вируса гриппа птиц (H5N1) по экологическим группам (общемировая статистика).

птиц в 53 странах, а также 256 случаев заражения человека, из них 151 — летальные случаи. Сотни миллионов птиц умерли или были отбракованы в целях предотвращения распространения вируса. Несмотря на попытки устранить вирус H5N1, из юго-восточной Азии он распространился в центральную Азию, Европу и Африку. В 2005—2006 гг. в ряде европейских стран пытались предотвратить дальнейшие вспышки заболевания за счет исключения контактов между дикой и домашней птицами. Филогенетические отношения штаммов H5N1 в настоящее время сильно способствуют осуществлению модели распространения вируса в Японию, Россию, Монголию, Турцию, Италию и Францию, что может объяснить случаи проникновения вируса, которые не могли быть классифицированы на основе данных о торговле. Недавние штаммы из Южной Кореи и Японии (Восточная группа), а также Цинхая (Китай), России, Монголии, Европы и Африки (Западная группа) формируют устойчивые группы, что указывает на наличие общих предков для каждой из этих групп штаммов. Таким образом, проникновение вируса в Японию было, скорее всего, миграцией птиц из Южной Кореи, а не из Китая (ни одна из тех стран не экспортировала домашнюю птицу в Японию в 2003 г.), в то время как в Россию и Монголию, вероятно, птичий грипп проник из Китая. При отсутствии торговых запретов, H5N1 может быть ввезен через домашнюю птицу в остальные страны Европы, в большинство стран Африки, а также в Северную и Южную Америку в ближайшем будущем. Однако, даже если страны, в которых домашняя птица заражена, прекращают экспорт домашней птицы, опасность распространения H5N1 по всей Европе, Африке, и в Америку сохраняется за счет экспорта домашней птицы из стран, где вирус наблюдается у диких птиц. Несмотря на то, что риск проникновения патогенного вируса на континентальную часть США относительно низок, риск проникновения с домашней птицей в другие страны северной и Южной Америки, в

том числе Канаду, Мексику и Бразилию, является существенным, если не будут введены ограничения на импорт. Последующее распространение с более чем 4 миллионами мигрирующих уток, гусей и лебедей с юга сделает возможным проникновение вируса в США. Таким образом, нынешние наблюдения американских специалистов, которые сфокусированы на птицах, мигрирующих через Аляску (на пути миграции и стоянка птиц), могут оказаться не в состоянии обнаружить проникновение H5N1 в США вовремя и не допустить распространение вируса на домашнюю птицу.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что:

- в настоящее время самую сильную угрозу проникновения вируса H5N1 представляет собой торговля птицей, а не миграции перелетных птиц;
- по причине синергизма путей проникновения вируса через домашних диких птиц, страны импортеры, включая США, подвергаются высокому риску проникновения вируса;
- наиболее эффективной стратегией предотвращения проникновения H5N1 в страны западного полушария будет строгий контроль или запрет на импорт домашней птицы, а также усиление мер по пресечению незаконной торговли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ибрагимов А.А. Патологоанатомические изменения при гриппе птиц // Ветеринария. — 2006. — № 4. — С. 26—27.
2. Каверин Н.В., Смирнов Ю.А. Межвидовая трансмиссия вирусов гриппа А и проблема пандемий // Вопросы вирусологии. — 2003. — № 3. — С. 4—10.
3. Львов Д.К., Ямникова С.С. О природной очаговости гриппа // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 1986. — № 2. — С. 27—29.
4. Львов Д.К., Жданов В.М. Персистенция генов эпидем. вирусов гриппа в природных популяциях // Вopr. вирусол. — 1982. — № 4. — С. 17—20.

5. Межпопуляционные взаимодействия в системе вирусы гриппа А-животные-человек / Д.К. Львов [и др.]. — М.: Медицина, 2005. — С. 50.

6. Савченко А.П. О вероятности заноса и распространения гриппа птиц (H5N1) на территории Средней Сибири // Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки. — 2006. — № 5. — С. 113—117.

Сведения об авторах

Миндолина Евгения Владимировна – студентка 4 курса Сибирского федерального университета (660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79; тел.: 8 (923) 304-29-77, e-mail: 3922317@mail.ru)

М.Б. Шаракшанов, Н.В. Бренева, А.К. Носков, Е.Ю. Киселева, С.А. Косилко,
Т.Т. Шкаруба, М.В. Чеснокова

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЛЕПТОСПИРОЗА ЗА РУБЕЖОМ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

При анализе эпидемиологической ситуации по лептоспирозу в мире выявлена тенденция к увеличению числа завозных случаев заболеваний из эндемичных стран и к возникновению заболеваний в ранее не известных природных очагах лептоспироза. Определены новые группы риска лиц, подверженных инфицированию — путешественники, участники экстремальных соревнований, военных действий.

Ключевые слова: лептоспирозы, эпидемиологическая ситуация

MODERN TRENDS OF THE SPREADING LEPTOSPIROSIS OVERSEAS

M.B. Sharakshanov, N.V. Breneva, A.K. Noskov, E.Yu. Kiseliova, S.A. Kosilko,
T.T. Shkaruba, M.V. Chesnokova

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

In this study the increased number of the imported cases from endemic countries or occurring of the disease in earlier unknown natural leptospirosis foci in the world among participants of various extreme competitions, hostilities and travelers was revealed at analysis of the epidemiological leptospirosis situation. New human risk groups subjected to infection were determined.

Key words: leptospirosis, epidemiological situation

Лептоспироз — группа природно-очаговых не-трансмиссивных зоонозов сходных, но не идентичных по патогенезу, эпидемиологии и клиническим проявлениям. Возбудители лептоспироза — спирохеты, относящиеся к виду *Leptospira interrogans* семейства *Leptospiraceae* порядка *Spirochaetales*. Идентифицированные к настоящему моменту патогенные лептоспиры отнесены к 25 серогруппам, 250 сероварам и 17 геномным видам [1].

В развивающихся странах заболевания людей обусловлены низким уровнем жизни, занятием сельским хозяйством, контактами с животными, обильными осадками и наводнениями. В развитых странах лептоспироз — это традиционно профессиональная болезнь лиц, работающих на животноводческих комплексах и мясоперерабатывающих предприятиях. Наиболее высокий уровень заболеваемости лептоспирозом характерен для регионов с влажным субтропическим и тропическим климатом (Латинская Америка, Юго-Восточная Азия).

В последние годы увеличилось число завозных случаев лептоспироза из эндемичных регионов. В большинстве случаев заражение людей происходит в странах Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америки, на Карибских островах. Это обусловлено интенсивной миграцией населения, в том числе связанной с активным отдыхом и экологическим туризмом, а так же с соревнованиями по экстремальным видам спорта (ультрамарафоны, триатлон и т.п.). Кроме того, существенное влияние на рост заболеваемости лептоспирозом оказывают вооруженные конфликты и широкомасштабные военные учения на эндемичных территориях в экстремальных погодных условиях. Ранняя диагностика болезни затруднена разнообразием клинических симптомов и недостаточным уровнем

развития на эндемичной территории лабораторной сети, способной в короткие сроки и с высокой вероятностью подтвердить диагноз [7].

Лептоспироз в мире распространен достаточно широко, однако состав основных хозяев среди животных и серологический пейзаж патогенных лептоспир, циркулирующих в природных очагах, имеют некоторые отличия в отдельных странах мира. Установлено, что основными источниками и резервуарами инфекции в мире являются крысы, мыши, свиньи, собаки, КРС, овцы, еноты, козы, лошади, буйволы. Наряду с этим отмечается циркуляция возбудителя среди домашних кошек, оленей, кабанов, бандикотов, ежей, а также описаны случаи носительства патогенных лептоспир у летучих мышей, верблюдов, скунсов, лис, землероек, опоссумов, ослов, кроликов, а также обезьян (капуцинов) [17].

По уровню заболеваемости населения заметно выделяются небольшие островные государства, расположенные в тропических и субтропических поясах, и территории с низким социальным уровнем, где чаще всего возникают крупные вспышки лептоспироза [4, 11]. Степень пораженности населения лептоспирозом этих стран значительно колеблется и в годы эпидемических осложнений достигает показателей 98 — 101 на 100 тыс. населения ($^{\circ}/_{0000}$) (рис. 1) [17].

Для лептоспироза характерно неравномерное распространение по административным территориям, что объясняется эколого-биологическими особенностями источников и резервуаров инфекции, а также свойствами возбудителя. Так заболеваемость в отдельные годы по различным округам Китая составляла 2,43 $^{\circ}/_{0000}$ — округ Beijing, 2,31 — Chengdu, 204,0 — Fuzhou, 19,5 — Wuhan [17]

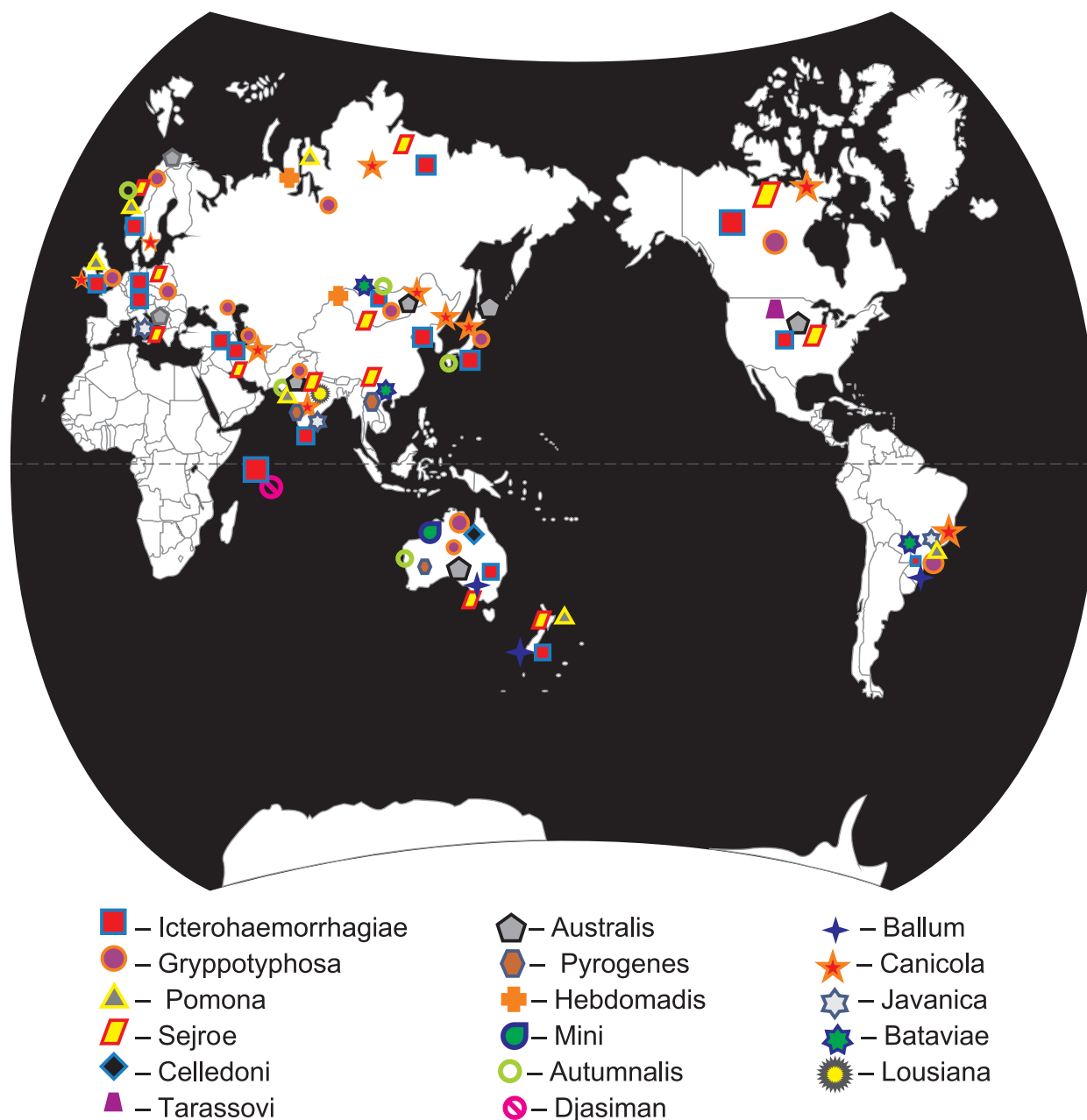


Рис. 1. Распространение серогрупп лептоспироза в мире.

при среднемноголетнем показателе за 1991 – 2010 гг. $0,7 \text{ ‰}$ [19]. Такая же закономерность проявлялась и в Индии, где заболеваемость, за аналогичный период, составляла в округах Chennai – 0,4, Kerala – 2,54, Madras – 8,25, Mumbai – 0,17, Tamil Nadu – $7,3 \text{ ‰}$ [17].

По заболеваемости лептоспирозом государства можно разделить на страны с очень высоким уровнем: Сейшель, Малайзия, Новая Каледония, Суринам ($20,0\text{--}100,0 \text{ ‰}$); с высоким: Тринидад и Тобаго, Барбадос, Бразилия ($10,0\text{--}20,0 \text{ ‰}$); со средним: Ямайка, Коста-Рика, Шри-Ланка, Таиланд, Сальвадор, Новая Зеландия ($2,5\text{--}10,0 \text{ ‰}$); с низким: Уругвай, Куба, Никарагуа, Хорватия, Россия, Украина, Доминиканская Республика, Эквадор ($1,0\text{--}2,5 \text{ ‰}$); и очень низким: Арген-

тина, Румыния, Австралия, Португалия, Дания, Латвия, Словения, Филиппины, Словакия, Тайвань ($0,4\text{--}1,0 \text{ ‰}$). Единичные случаи заболеваний лептоспирозами характерны для таких стран, как США, Канада, Великобритания, Италия, Испания, Германия ($0,01\text{--}0,1 \text{ ‰}$) [15].

В последнее десятилетие для неэндемичных по лептоспирозу стран характерно увеличение завозных случаев вследствие возросшей популярности экологического туризма и интенсификации экономических связей со странами «третьего мира», которые стали доступнее в связи с развитием транспорта, позволяющего попасть в отдаленные точки мира за считанные часы. Так, значительный процент заболеваний лептоспирозом, связанных с заражением в тропических и субтропических

Эпидемические осложнения при проведении международных соревнований

№	Место возникновения	Год	Количество заболевших	Проводимое мероприятие	Условия способствующие заражению
1.	Австрия, Лангау	2010	4	Соревнования по триатлону	Употребление сырой воды и термически не обработанных продуктов питания, длительное пребывание в воде и на заболоченной местности, повреждения кожных покровов, ношение открытой одежды
2.	США, Флорида	2005	44	Экстремальные гонки Eco-Challenge	
3.	Малайзия, Борнео	2000	80		

странах (Юго-Восточной Азии, Карибских островах, Центральной и Южной Америке), отмечается в США, Великобритании, Израиле, Германии, Нидерландах, Португалии и Болгарии [2, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 16, 18]. С целью привлечения как можно большего потока туристов проводятся различные спортивные и развлекательные мероприятия, такие, как рафтинг (сплав), катание на каноэ, рыбная ловля, охота, спелеотуризм (спортивная спелеология), пешие прогулки, маршруты которых проложены по территориям природных и антропогенных очагов, где и происходит заражение людей.

Примером служат спортивные соревнования «Eco-Challenge-Sabah» в Малайзии в 2000 г., при проведении которых среди спортсменов возникла вспышка лептоспироза. Все заболевшие принимали участие в спортивном многоборье, проходившем в Борнео с 21 августа по 1 сентября 2000 г. (табл. 1). В соревнованиях, включающих длительный пеший переход через джунгли, продолжительный сплав на байдарках (как в пресной, так и в морской воде), спелеотуризм, преодоление альпинистского маршрута и маунтин байкинг, участвовало 304 спортсмена из 27 стран. Диагноз лептоспироза был поставлен 80 (42 %) спортсменам из 189 обратившихся, 29 (36 %) больных госпитализированы [8].

В 2005 г. отмечены случаи заболевания лептоспирозом в США в результате заражения спортсменов в заболоченных окрестностях Тампа, штат Флорида во время проведения экстремальных гонок на выносливость. В соревновании участвовали 200 гонщиков из 32 штатов и двух канадских провинций, из которых 66,7 % составляли мужчины. Из 192 обратившихся за медицинской помощью спортсменов у 44 (23 %) был подтвержден диагноз лептоспироза, трое больных госпитализированы [13].

В 2010 г. впервые в Австрии зарегистрированы четыре тяжелых случая лептоспироза среди участников соревнований по триатлону в Лангау, Нижняя Австрия [14].

Заражения спортсменов лептоспирозом во всех описанных случаях связаны с употреблением сырой воды, длительным пребыванием в воде и в заболоченной местности, повреждениями кожных покровов, ношением открытой одежды.

Следует отметить, что вышеперечисленные экстремальные виды спорта часто проводятся в труднодоступной местности, на незаселенных территориях, где заболеваемость ранее не выявлялась, а природные очаги лептоспироза не установлены.

Таким образом, современная тенденция развития лептоспироза характеризуется возникновением заболеваний на территориях, где они ранее не регистрировались. Существенное влияние на особенности распространения болезни оказывают активные международные контакты, занятие экологическим туризмом и экстремальными видами спорта, которые приводят к существенному росту завозных случаев и укоренению инфекции на ранее не эндемичных территориях. В связи с этим выделяются новые группы эпидемиологического риска: путешественники, спортсмены и военнослужащие, что требует разработки комплекса профилактических и санитарно-просветительных мероприятий для этой категории лиц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов // Ветеринарная патология. — 2004. — Вып. 4. — С. 54 — 57.
2. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996 / L. Ciceroni [et al.] // Eur. J. Epidemiol. — 2000. — Vol. 16, N 1. — P. 79 — 86.
3. Fever in returned travellers presenting in the United Kingdom: recommendations for investigation and initial management / V. Johnston [et al.] // J. Infect. — 2009. — Vol. 59, N 1. — P. 1 — 18.
4. Hemoptysis associated with leptospirosis acquired in Hawaii, USA / C.A. Duplessis [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2011. — Vol. 17, N 12. — P. 2375 — 2377.
5. Human leptospirosis in Bulgaria, 1999 — 2001: epidemiological, clinical, and serological features / I. Christova [et al.] // Scand. J. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 35, N 11 — 12. — P. 869 — 872.
6. Katz A.R. Leptospirosis in Hawaii, 1974 — 1998: epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases / A.R. Katz [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2002. — Vol. 66, N 1. — P. 61 — 70.
7. Lau C., Smythe L., Weinstein P. Leptospirosis: an emerging disease in travelers // Travel. Med. Infect. Dis. — 2010. — Vol. 8. — P. 33 — 39.
8. Leptospirosis in «Eco-Challenge» athletes, Malaysian Borneo, 2000 / J. Sejvar [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 9, N 6. — P. 702 — 707.
9. Leptospirosis in Germany, 1962 — 2003 / A. Jansen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 11, N 7. — P. 1043 — 1054.

10. Leptospirosis in Netherland, 1991 – 1995 / D.P. Olszyna [et al.] // Ned. Tijdschr. – 1998. – Vol. 142, N 22. – P. 1270 – 1273.
11. Leptospirosis outbreak in Sri Lanka in 2008: lessons for assesing in global burden of disease / S.B. Agampodi [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2011. – Vol. 85, N 3. – P. 471 – 478.
12. Meites E., Jay M.T., Deresinski S. Reemerging leptospirosis, California // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10, N 3. – P. 61 – 70.
13. Outbreak of leptospirosis among Adventure Race participants in Florida, 2005 / J. Eric [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 50, N 6. – P. 843 – 849.
14. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010 / C. Radl [et al.] // Wien. Klin. Wochenschr. – 2011. – Vol. 123, N 23 – 24. – P. 751 – 755.
15. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends (review) / G. Pappas [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 12. – P. 351 – 357.
16. Travel-related leptospirosis in Israel: a nationwide study. In: 11th Conference of the International Society of Travel Medicine; May 24 – 28, 2009; Budapest, Hungary / E. Schwartz [et al.] – Available at <http://www.abstractserver.com/cistm11/Vol1final.pdf>.
17. Vieira M.L., Gama-Simoes M.J., Collares M. Pereira Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years // Int. J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 10, N 5. – P. 378 – 386.
18. Weekly. Epidemiol. Rec. WHO. – 1990 – 2011.
19. Zhang C., Wang H., Yan J. Leptospirosis prevalence in Chinese populations in the last two decades // Microbes. Infect. – 2012. – Vol. 14, N 4. – P. 317 – 323.

Сведения об авторах

Шаракшанов Мунко Баярович – лаборант-исследователь отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел.: 8 (3952) 22-01-43, факс: 8 (3952) 22-01-40; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru)

Бренева Н.В. – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Носков А.К. – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Киселева Евгения Юрьевна – младший научный сотрудник ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Косилко Сергей Александрович – кандидат медицинских наук, заведующий отделом эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Шкаруба Т.Т. – научный сотрудник информационно-аналитического сектора ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Чеснокова Маргарита Валентиновна – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной и противоэпидемической работе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

К.А. Шаршов, В.Ю. Марченко, А.К. Юрлов*, А.М. Шестопапов

**ЭКОЛОГИЯ И ЭВОЛЮЦИЯ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА H5N1
В РОССИИ (2005–2012 ГГ.)**

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирская область,
р.п. Кольцово)
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Новосибирск)
* Институт систематики и экологии животных СО РАН (Новосибирск)

Россия охватывает большую часть Евразии и представляет особый интерес для экологии вирусов гриппа и их эволюции. Важность этого региона была подтверждена вспышками птичьего гриппа H5N1, зафиксированными среди диких птиц с 2005 по 2010 годы. В статье содержится подробный сравнительный анализ вирусологических, молекулярно-биологических и патогенетических характеристик вирусов H5N1-субтипа, изолированных в России. Это исследование свидетельствует о необходимости постоянного наблюдения для обнаружения новых вариантов вирусов гриппа, чтобы способствовать предотвращению новых вспышек.

Ключевые слова: высокопатогенный вирус гриппа птиц, эволюция, вспышки

**ECOLOGY AND EVOLUTION OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA H5N1
IN RUSSIA (2005–2012)**

К.А. Sharshov, V.Yu. Marchenko, A.K. Yurlov, A.M. Shestopalov

State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Koltsovo
Novosibirsk State University, Novosibirsk
Institute of Systematic and Ecology of Animals SB RAMS, Novosibirsk

Russia covering a large part of Eurasia is of special interest for influenza virus ecology and evolution. The importance of this region has been confirmed by the previous outbreaks of HPAI H5N1 among wild birds from 2005 to 2010. Avian influenza virus surveillance is an important task prior the fundamental study and introduction these data in practice. The article contains detailed comparative virological, molecular, pathogenic characteristics of H5N1 viruses isolated in Russia. Some molecular-epidemiological aspects are discussed. This study demonstrates the need for ongoing surveillance to detect new variants of influenza viruses and facilitate prevention of outbreaks.

Key words: highly pathogenic avian influenza, evolution, outbreaks

Грипп птиц — болезнь, отнесенная Всемирной организацией здоровья животных (ОИЕ) к наиболее важным инфекционным болезням человека и животных. До недавнего времени грипп птиц рассматривался как зоонозное заболевание птиц локального значения. Однако появление и распространение HPAI H5N1 (Highly Pathogenic Avian Influenza) азиатского происхождения изменило ситуацию: вместе с вызванной вирусом гибелью миллионов диких и домашних птиц HPAI H5N1 оказался способным инфицировать широкий спектр хозяев, включая человека.

В течение 2010–2012 гг. эпизоотии среди диких и домашних птиц были зарегистрированы в большинстве стран Юго-Восточной Азии, Китае, Японии, Корее, Индии, Бангладеш, Монголии, Румынии, Болгарии и России [5]. Помимо огромного ущерба экономике и природным ресурсам, на **7 июля 2012 г.** в мире было документировано 606 случаев инфицирования людей, из которых 357 окончились летальным исходом [1].

Вирус гриппа птиц H5N1-субтипа впервые был выделен от кур в 1959 г. в Шотландии. Позднее вирусы гриппа этого субтипа выделялись в 1975, 1981, 1983 гг. в Северной Америке и в 1991 г. — в Англии и Шотландии [25]. Вплоть до 1996 г. ничто не указыва-

ло на возможность того, что H5-вирус гриппа может приобрести способность инфицировать людей, приводя к летальным случаям. Предшественник вируса гриппа H5N1-субтипа, который инфицировал людей, был вначале обнаружен в 1996 г. в провинции Гуандон (Guangdong), Китай. В 1996 г. там была зарегистрирована вспышка гриппа птиц с летальными случаями среди домашних гусей, которая не привлекла большого внимания [9]. Было показано, что выделенный во время эпизоотии штамм приобрел гены внутренних белков (NS, PB1, PB2, NP) от варианта вируса гриппа, позже обнаруженного у перепела (A/Quail/HK/G1/97, H9N2), и ген NA от вируса утки (A/Teal/HK/W312/97, H6N1), прежде чем стал широко распространенным на рынках живой домашней птицы в Гонконге [12]. Штамм A/Goose/Guangdong/1/96 является самым ранним известным предком циркулирующего сегодня вируса. Вся домашняя птица, инфицированная этим вариантом в Гонконге, была уничтожена, и позднее данный генотип не обнаруживался среди циркулирующих вариантов. Вместе с тем, различные реассортанты, которые содержали тот же самый ген гемагглютинаина H5, но имели различные внутренние гены, продолжали выявляться среди гусей и уток [16]. Вирусы H5N1 продолжали эво-

люционировать, и в конце 2002 г. стали причиной гибели большого числа диких, домашних и экзотических птиц в природных парках Гонконга [22, 27], а также смогли преодолеть межвидовой барьер и инфицировать людей [26]. Считается, что с 2003 г., вирус H5N1 стал доминирующим повсеместно в Юго-Восточной Азии, включая Вьетнам, Таиланд, Индонезию, Камбоджу, Лаос, Корею, Японию, Китай и Малайзию [9, 13]. В дальнейшем, продолжая эволюционировать, этот вариант H5N1 дал начало новым генетическим ветвям. Так, показано, что вирус гриппа H5N1, который вызвал эпизоотии среди домашних птиц в Японии и Корее, генетически отличен от всех остальных [17, 14]. Филогенетический анализ более поздних штаммов высокопатогенного вируса гриппа птиц H5N1 показал, что штаммы, изолированные во Вьетнаме и Таиланде, сформировали группу, которая оказалась отличной от индонезийской группы.

Несмотря на генетические отличия вируса H5N1, выделенного в различных регионах, разные варианты этого вируса оставались высокопатогенными для домашних птиц и вызывали летальные случаи инфекции у человека. До настоящего времени более 140 млн. домашних птиц в мире погибло от H5N1 или было уничтожено как потенциально инфицированных им [5, 9].

В 2008 г. три крупнейшие международные организации (ВОЗ (WHO), Международное эпизоотическое бюро (OIE) и Организация по сельскому хозяйству и продовольствию ООН (FAO)) опубликовали универсальную систему классификации вируса гриппа H5N1-субтипа, созданную на основе филогенетического анализа гена НА. Согласно этой системе выделяют несколько групп — клад и субклад, имеющих происхождение от единого предка. Выделено 10 клад (0 — 9 clades), представители которых преимущественно распространены в конкретных географических регионах. Классификация основана на топологии филогенетического древа известных штаммов H5N1. При этом отдельные клады должны генетически отличаться более чем на 1,5 % [31].

Наибольшее распространение в мире получил вирус клады 2.2. По этой причине 2009 году ее структура была детализирована [30]. При дальнейшей диверсификации были выделены субклада 2.2.1 и три сублинии (I, II и III).

Эволюция азиатского варианта H5N1 шла, главным образом, в результате появления точечных мутаций в гене PB2, инсерций в гене НА и делеций в генах НА и NS [17]. Таким образом, H5N1-вирусы продолжают эволюционировать посредством мутирования с последующей реассортацией мутированных геномов [15, 20]. В то время как большинство штаммов H5N1, изолированных от птиц в Азии, начиная с 1997 г., являются высокопатогенными для домашних кур, они проявляют различную патогенность для других видов птиц и млекопитающих. Так, у домашних уток уровень патогенности штаммов H5N1 варьирует от высокопатогенного до непатогенного. У хорьков большинство штаммов, полу-

ченных от птиц, вызывают инфекции дыхательных путей, либо обладают нейротропными свойствами, вызывая параличи конечностей [23]. Все штаммы H5N1, выделенные от человека, являются высокопатогенными для хорьков [23].

Существующие в настоящее время данные позволяют судить о различиях в патогенном потенциале выделяемых в мире вариантов H5N1 для млекопитающих [9, 23]. Вместе с тем, информации об этом важнейшем свойстве вируса А/H5N1, циркулировавшего в России, крайне мало. Поэтому актуальным являлось проведение сравнительного изучения основных патогенных свойств штаммов вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенных в России.

В настоящее время ряд исследователей считает, что ведущая роль в распространении в мире высокопатогенного H5- и H7-гриппа принадлежит людям [19]. Тем не менее, не исключается механизм распространения гриппа через перемещение инфицированной домашней птицы. Это подтверждается тем, что впервые вспышки высокопатогенного гриппа H5N1 были зафиксированы на фермах промышленного сельского хозяйства. Крупнейшее в мире производство домашней птицы находится в Китае, Вьетнаме, Таиланде и Индонезии. Рынки живой птицы играют роль своеобразного резервуара и, вероятно, поддерживают циркуляцию и распространение вируса гриппа H5N1 в конкретном регионе [29]. Поэтому важной мерой защиты и контроля заболевания является вопрос биобезопасности в сельском хозяйстве. Множество других факторов делают контроль над этой инфекцией затруднительным. Например, содержание домашних птиц на частном подворье обычно не сопровождается выполнением требований биобезопасности. Помимо этого, следует отметить, что, многие из стран, подверженных эпизоотии, имеют слабую ветеринарную инфраструктуру [19].

Другим мощным фактором, играющим важную роль в распространении инфекции, является миграция уток, концентрирующихся на зимовках в Юго-Восточной Азии и часто контактирующие с домашними птицами и человеком [28, 19]. Вместе с тем, в литературе встречается крайне мало данных об этом важнейшем факторе распространения гриппа H5N1-субтипа на территории России.

Следует отметить, что в целом патогенные свойства в отношении млекопитающих и птиц на протяжении 5 лет распространения вируса в России существенно не изменились. В ряде работ показано незначительные отличия в степени патогенности [4, 7, 11, 12, 21].

Важно, что в отличие от многих стран Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока в России не было зарегистрировано случаев инфекции H5N1 у людей [1].

Анализ литературных данных показывает, что эпизоотия гриппа H5N1 распространилась в осенне-зимний период 2005 — 2006 гг. на территории большинства стран Европы и Передней Азии, а впоследствии и в Африке [9, 21]. Анализ

полученных нами результатов и данных ряда исследователей [4, 7, 9, 11, 12, 19, 21] позволяют с наибольшей вероятностью говорить о ведущей роли диких птиц в распространении высокопатогенного варианта вируса гриппа H5N1-субтипа, начиная с весны 2005 г.

Полученные нами штаммы, которые составляют основу организованной коллекции ВГА, были идентифицированы как относящиеся к различным систематическим группам вируса гриппа. К настоящему времени описано множество линий и штаммов вируса H5N1 [9, 30, 31]. Изучение изолятов, выделенных в России, дополняет общую картину эволюции вируса гриппа H5N1. Гетерогенность вируса гриппа по различным биологическим свойствам была показана и в целом ряде работ по изучению штаммов, выделенных в России [4, 7, 9, 11, 12, 19, 21].

Так, штаммы H5N1-субтипа гетерогенны по значению индекса патогенности (Intravenous pathogenicity index, IVPI). Существование штаммов с различным IVPI, значение которого варьирует в зависимости от нуклеотидных замен в генах структурных и неструктурных белков, было показано ранее [28]. Для различных штаммов IVPI (Intravenous pathogenicity index) имел значение от 1,50 до 3,00 [28]. За исключением одного штамма, выделенного от сизой чайки, все выделенные нами штаммы H5N1-субтипа характеризовались значением IVPI > 2,7 и были отнесены к высокопатогенным [7, 11, 18]. При экспериментальной инфекции они вызывали гибель развивающихся куриных эмбрионов и лабораторных животных (куры, мыши).

Многочисленные исследования позволили определить место штаммов, циркулирующих на территории России, в систематической номенклатуре ВГА. Было показано, что вирусы субклады 2.2, которые получили широкое распространение осенью 2005 г. на территории Евразии и Африки, начали свое движение летом 2005 г. именно с территории юга Западной Сибири. До 2009 г. представители вируса гриппа субклады 2.2 вызывали вспышки на территории Евразии и Африки. В 2009–2010 гг. было документировано появление на юге Западной Сибири генотипа 2.3.2, циркулировавшего ранее, в основном, в южных провинциях Китая, Гонконге и Вьетнаме [22, 31]. Следует отметить, что ВГА других клад на территории России не было выявлено. Этот факт согласуется с данными литературы о преимущественном локальном географическом существовании большинства клад в Юго-Восточной Азии [9, 17, 31].

Возвращаясь к вопросу о роли мутационного процесса в эволюции ВГА, следует отметить, что вирус гриппа А динамически изменяется, чтобы уклониться от действия популяционного иммунитета. При этом постоянный мутационный процесс поверхностных белков (антигенный дрейф) или их полная замена путем реассортации соответствующих генов (антигенный сдвиг) приводит к усововершенствованию способности вируса гриппа А уклоняться от иммунного ответа [13, 15]. Анти-

генный сдвиг значительно увеличивает число случаев заболевания гриппа (развитие пандемии) и уровень смертности в популяции. Вместе с тем, гибель животных или людей, инфицированных высокопатогенными вариантами вируса, равно как и давление иммунного ответа, способствуют преимущественной селекции вирусных изолятов, обладающих сниженным патогенным потенциалом. Действительно, для ряда вирусных заболеваний было показано, что в процессе эволюции инфекционного агента наблюдается переход от острого течения заболевания, вызываемого ими, к хроническим формам, что непосредственно связано с патогенностью вируса [28].

Таким образом, продолжающаяся эволюция в высокопатогенный вирус H5N1-субтипа является важным аспектом для эпидемиологии и эпизоотологии как в России, так и в мире в целом. Постоянно выявляемые эпизоотии гриппа H5N1 диких и домашних птиц, а также гибель людей, свидетельствуют о возможности возникновения новой пандемии и панзоотии гриппа этого субтипа и требуют пристального внимания общества к этой проблеме.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 12.741.12.0153, № 16.740.11.0179, № 02.740.11.0709, № 11.519.11.2014) и грантом по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации НШ-65387.2010.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Доступно на http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_08_12/en/index.html
2. Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1-вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-Восточной Азии в 2003–2005 гг. / Г.Г. Онищенко [и др.] // Доклады РАН. — 2006. — Т. 406, № 2. — С. 278–280.
3. Изоляция высокопатогенных (HPAI) штаммов вируса гриппа А/H5N1 от диких птиц в очаге эпизоотии на озере Убсу-Нур (июнь 2006 г.) и их депонирование в Государственную Коллекцию вирусов РФ (03 июля 2006 г.) / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2006. — Т. 51. — № 6. — С. 14–18.
4. Изучение патогенности штаммов вируса гриппа птиц H5N1-субтипа, выделенных на территории Российской Федерации, на мышинной модели / А.М. Шестопалов [и др.] // Бюл. эксп. биологии и медицины. — 2008. — Т. 146, № 9. — С. 317–319.
5. Международное эпизоотическое бюро (World Organisation for Animal Health) Доступно на http://www.oie.int/eng/info_ev/en_AI_factoids_H5N1_Timeline.htm
6. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге европейской части России в декабре 2007 г. / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2008. — № 4. — С. 18–22.

7. Характеристика высокопатогенного штамма вируса гриппа H5N1-субтипа, выделенного от сизой чайки (*Larus canus*) / К.А. Шаршов [и др.] // Журн. Микробиол. — 2010. — № 1. — С. 29–32.
8. Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа A/H5N1 генотипа 2.2 (Цинхай-сибирский), на пути осенних миграций в северо-восточной части бассейна Азовского моря (Краснодарский край) / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. — 2008. — № 2. — С. 14–18.
9. Alexander D.J., Brown I.H. History of highly pathogenic avian influenza // *Rev Sci Tech.* — 2009. — Apr; 28 (1). — P. 19–38.
10. Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* / Chen H. [et al.]. — 2005. — Jul 14. — Vol. 436 (7048). — P. 191–192.
11. Avian influenza (H5N1) outbreak among wild birds, Russia, 2009 / K. Sharshov [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2010. — Feb; Vol. 16 (2). — P. 349–351.
12. Avian influenza in Hong Kong 1997–2002 / L.D. Sims [et al.] // *Avian Dis.* — 2003; Vol. 47 (3). — P. 832–838.
13. Capua I., Alexander D.J. Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data? // *Zoonoses Public Health.* — 2008. N 55 (1). — P. 2–15.
14. Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan / M. Mase [et al.] // *Virology.* — 2005. — Feb. 5; Vol. 332 (1). — P. 167–176.
15. Chen J., Deng Y.M. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics // *Virol J.* — 2009. — N 6. — P. 30.
16. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR / Y. Guan [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — Jun 25; Vol. 99 (13). — P. 8950–8955.
17. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern / K.S. Li [et al.] // *Asia. Nature.* — 2004. — Jul 8; Vol. 430 (6996). — P. 209–213.
18. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia / K. Sharshov [et al.] // *Arch Virol.* — 2010. — Jul; Vol. 155 (7). — P. 1145–1150.
19. H5N1 outbreaks and enzootic influenza / R.G. Webster [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2006. — Jan; 12 (1). — P. 3–8.
20. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds / J. Liu [et al.] // *Science.* — 2005. — Aug 19; 309 (5738). — P. 1206.
21. Influenza (H5N1) viruses in poultry, Russian Federation, 2005–2006 / A.S. Lipatov [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2007. — Apr; Vol. 13 (4). — P. 539–546.
22. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002 / T.M. Ellis [et al.] // *Avian Pathol.* — 2004. — Oct; Vol. 33(5). — P. 492–505.
23. Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004 / E.A. Govorkova [et al.] // *J. Virol.* — 2005. — Feb; Vol. 79 (4). — P. 2191–2198.
24. Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens / D.J. Hulse [et al.] // *J. Virol.* — 2004. — Sep; Vol. 78 (18). — P. 9954–9964.
25. Perdue ML. Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America / M. Garcia [et al.] // *Virus Res.* — 1997. — Oct; 51 (2). — P. 115–124.
26. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease / J.S. Peiris [et al.] // *Lancet.* — 2004. — Feb 21; Vol. 363 (9409). — P. 617–619.
27. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks / K.M. Sturm-Ramirez [et al.] // *J. Virol.* — 2004. — May; 78 (9). — P. 4892–4901.
28. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia / D.J. Hulse-Post [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2005. — Jul 26; Vol. 102 (30). — P. 10682–10687.
29. The impact of a monthly rest day on avian influenza virus isolation rates in retail live poultry markets in Hong Kong / N.Y. Kung [et al.] // *Avian Dis.* — 2003. — Vol. 47 (3 Suppl). — P. 1037–1041.
30. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. 2009. Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 3. — P. 59–62
31. WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group. Toward a unified nomenclature system for highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) / WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group // *Emerg Infect Dis.* — 2008. — N 14 (7). — P. 1.
32. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) / J. Keawcharoen [et al.] // *Emerg Infect Dis.* — 2008. — Apr; Vol. 14 (4). — P. 600–607.

Сведения об авторах

Шаршов Кирилл Александрович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово; тел./факс: 8 (383) 336-75-40, e-mail: Sharshov_ka@vector.nsc.ru)

Марченко Василий Юрьевич – научный сотрудник Новосибирского национального исследовательского государственного университета

Юрлов Александр Константинович – кандидат биологических наук, заведующий отделом ФГБУН Института систематики и экологии животных СО РАН (630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11)

Шестопалов Александр Михайлович – доктор биологических наук, заведующий отделом Новосибирского национального исследовательского государственного университета

ИНФОРМАЦИЯ

**VIII БАЙКАЛЬСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
«ПСИХОСОМАТИЧЕСКИЕ И СОМАТОФОРМНЫЕ РАССТРОЙСТВА
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ»****25 сентября 2012 г., г. Иркутск**

25 сентября 2012 года в Иркутске прошла ежегодная VIII Байкальская научно-практическая конференция «Психосоматические и соматоформные расстройства в клинической практике».

Организаторами, как всегда, выступили Министерство здравоохранения Иркутской области и ведущие научные и образовательные учреждения Восточной Сибири, занимающиеся данной проблемой: Научно-исследовательский институт психического здоровья СО РАМН, Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН, Иркутский государственный медицинский институт, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования.

В этом году ученые, психологи, практические врачи собрались на базе ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН для обсуждения актуальных вопросов классификации, диагностики, лечения пациентов с различными психосоматическими расстройствами. Важными оказались вопросы преемственности между педиатрическим и терапевтическим звеньями здравоохранения для улучшения качества оказания медицинской помощи таким пациентам. В то же время в стране практически отсутствует организационно оформленная система выявления и профилактики указанных нарушений в детском возрасте. Не согласованы единые подходы к лечению данной патологии у детей и подростков. Особенно это касается целесообразности использования и определения возможностей различных диагностических методов и лекарственных средств, число которых возрастает с каждым годом.

В работе Конференции приняли участие ведущие российские ученые, научные сотрудники, работники практического здравоохранения. Мероприятие получилось представительным (свыше 200 человек из Иркутской, Новосибирской, Томской областей, Забайкальского края и Республики Бурятия) и интересным. В рамках форума прошли мастер-классы, круглые столы для психологов и врачей.

Несомненно, проведение VIII Байкальской научно-практической конференции «Психосоматические и соматоформные расстройства в клинической практике» в очередной раз сыграло консолидирующую и организующую роль в обмене научными достижениями, во взаимодействии науки и практического здравоохранения. Участники Конференции имели возможность познакомиться с опытом мировой и отечественной медицины в области профилактики, диагностики и лечения психосоматических расстройств у детей и взрослых. Выработана стратегия и тактика развития данного направления в будущем.

Оргкомитет

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ В «БЮЛЛЕТЕНЬ ВСНЦ СО РАМН»

Настоящие Правила разработаны на основании требований Гражданского кодекса РФ, Закона РФ «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.1993 г. № 5351-1 с изменениями от 19 июля 1995 г. и 20 июля 2004 г., Закона РФ «О средствах массовой информации» от 27.12.1991 г. № 2124-I с последующими изменениями, и регулируют взаимоотношения между издательством в лице редакционной коллегии «Бюллетеня ВСНЦ СО РАМН», в дальнейшем именуемой «Редколлегия», и автором, передавшим свою статью для публикации в журнал, в дальнейшем именуемый «Автор». Правила утверждены решением Президиума ВСНЦ СО РАМН № 6 от 29 ноября 2011 г.

Редколлегия «Бюллетеня ВСНЦ СО РАМН» просит внимательно ознакомиться с нижеследующими инструкциями по подготовке рукописей для публикации.

«Бюллетень ВСНЦ СО РАМН» публикует статьи по проблемам медико-биологической науки и практического здравоохранения, а также по смежным проблемам.

В журнале публикуются обзоры, оригинальные статьи, сообщения из практики, лекции, информационные сообщения. Все представленные материалы рецензируются и обсуждаются редакционной коллегией.

Рукопись статьи должна быть представлена в 2-х экземплярах, напечатана на одной стороне стандартного листа (шрифт Times New Roman 12 пт, межстрочный интервал «полуторный»). Размеры полей: левое — 30 мм, правое — 10 мм, верхнее и нижнее — каждое не менее 20 мм. В электронном виде статья представляется на CD или направляется прикрепленным файлом по электронной почте на адрес: scrrs.irk@gmail.ru в форматах doc, docx или rtf.

Образец оформления рукописи статьи см. на сайтах http://www.vsnr.ru/bulleten_pravila.htm; http://www.scrrs.ru/byulleten_vsnts_so_ramn.

Таблиц должно быть не более 3 — 4-х. При построении таблиц необходимо все пункты представлять отдельными строками. Буквы греческого алфавита в печатном варианте статьи должны быть подчеркнуты красным.

Иллюстрации выполняют в графических редакторах в виде чёрно-белых чётких файлов формата *.tif, *.jpg с разрешением не менее 300 × 300 dpi. Если необходима печать в цветном формате, это указывается в ходатайстве.

Рисунки следует выполнять компактно в целях экономии места. Наиболее удобны для типографского воспроизведения рисунки шириной в одну колонку (до 8 см), две колонки (до 16,5 см) или во весь лист (16,5 × 22 см). Рисунки необходимо представлять в отдельных файлах.

Графики и диаграммы следует представлять отдельными файлами в программах, в которых они были построены (Excel, Statistica, StatGraph и т.д.).

К статье должно быть приложено официальное направление учреждения, в котором проведена работа. На первой странице статьи должна быть подпись руководителя учреждения, заверенная круглой печатью учреждения. На последней странице статьи должны быть подписи всех авторов. К статье прилагаются сведения об авторе, ответственном за контакты с редакцией (фамилия, имя, отчество, полный почтовый адрес, контактные телефоны, адрес электронной почты). При необходимости прилагается почтовый конверт с маркой.

Первая страница включает: УДК, инициалы и фамилии авторов, название статьи, полное название учреждения, а также резюме.

Резюме должно кратко отражать цель, методы, результаты исследования. Объем резюме не более 12 строк. Резюме завершают «ключевые слова» (от 3 до 10), способствующие индексированию статьи в информационно-поисковых системах. Далее следует перевод на английский язык предыдущей информации.

Обычно объем оригинальных статей — 8 страниц, научного обзора литературы — 12 — 15 страниц, кратких сообщений — 1,5 страницы.

Структура оригинальной статьи включает: введение — в нем формулируются цель и необходимость проведения исследования, кратко освещается состояние вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации; материалы и методы — приводятся количественные и качественные характеристики исследованных (объектов исследования), а также упоминаются все методы исследований, применявшиеся в работе, включая методы статистической обработки данных. Результаты следует представлять в логической последовательности в тексте, таблицах и на рисунках. В обсуждении выделяются новые и важные аспекты результатов исследования, могут быть включены обоснованные рекомендации и краткое заключение.

Все аббревиатуры расшифровываются при первом упоминании в тексте.

Библиография. Список литературы составляется в алфавитном порядке (начала работы отечественных авторов, затем — иностранных), печатается на отдельном листе. В тексте статьи библиографические ссылки обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках, в соответствии с нумерацией в списке литературы. При упоминании отдельных фамилий авторов в тексте им должны предшествовать инициалы

(фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции). Рекомендуется в оригинальных статьях цитировать не более 15, а в обзорах — 50 источников. Пример составления списка литературы приводится ниже.

Статья должна быть написана грамотно, текст, таблицы и другие материалы тщательно выверены. Рукописи, оформленные не в соответствии с указанными правилами, к рассмотрению не принимаются и возвращаются авторам на доработку. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать статьи.

Правила рецензирования рукописей. Все поступившие работы рецензируются специалистами в области, соответствующей профилю поступившей статьи. При необходимости осуществляется научное рецензирование с участием нескольких специалистов. По результатам рецензирования авторам направляются отзывы рецензентов и просьба внести в работы исправления. После исправления работы рецензируются повторно, при несогласии автора с мнением рецензента — направляются на рецензию независимому специалисту. Результаты рецензирования обсуждаются на заседаниях редакционной коллегии, где принимается окончательное решение о публикации работы. Рецензии в обязательном порядке предоставляются авторам рукописей и по запросам экспертных советов в ВАК.

Авторские права и ответственность. Редакция не несет ответственность за достоверность информации, приводимой авторами. Автор, направляя рукопись в Редакцию, поручает Редакции издавать произведение посредством его опубликования в печати.

Редакция при использовании рукописи вправе снабжать ее любым иллюстрированным материалом, рекламой и разрешать это делать третьим лицам. Автор, направляя рукопись в Редакцию, соглашается с тем, что Редакция переходит исключительные имущественные права на использование рукописи (переданного в редакцию журнала материала, в т.ч. такие охраняемые объекты авторского права как фотографии автора, рисунки, схемы, таблицы и т.п.), в том числе на воспроизведение в печати и в сети Интернет; на распространение; на перевод рукописи (материалов) на любые языки народов мира; экспорта и импорта экземпляров журнала со статьями Автора в целях распространения, на переработку, на доведение до всеобщего сведения. Указанные выше права Автор передает Редакции без ограничения срока их действия и на территории всех стран мира без ограничения, в т.ч. на территории Российской Федерации.

Редакция вправе переуступить полученные от Автора права третьим лицам и вправе запрещать третьим лицам любое использование опубликованных в журнале материалов. Автор гарантирует наличие у него исключительных прав на использование переданного Редакции материала. В случае нарушения данной гарантии и предъявления в связи с этим претензий к Редакции Автор самостоятельно и за свой счет обязуется урегулировать все претензии.

Редакция не несет ответственности перед третьими лицами за нарушение данных Автором гарантий. За Автором сохраняется право использования его опубликованного материала, его фрагментов и частей в личных, в том числе научных, преподавательских, целях. Права на рукопись считаются переданными Автором Редакции с момента подписания в печать номера журнала, в котором она публикуется. Перепечатка материалов, опубликованных в журнале, другими физическими и юридическими лицами возможна только с письменного согласия Редакции, с обязательным указанием номера журнала (года издания), в котором был опубликован материал.

Правила публикации. Публикация статьи платная и составляет в 2012 году 1300 рублей (до 8 страниц включительно), свыше — производится доплата 150 рублей за каждую страницу. Бесплатная публикация статьи предоставляется аспирантам, если аспирант является единственным автором научной статьи.

В обязательном порядке при направлении статьи в редакцию журнала просим Вас подписывать у каждого автора договор на передачу исключительных прав на произведение в соответствии с Частью 4 Гражданского кодекса РФ. Без подписания этого документа статьи не рассматриваются и к публикации не принимаются.

Договор автора с издательством (заполняется и подписывается всеми авторами и отправляется письмом, даты в договоре и акте указываются с интервалом в 10 дней).

Формат 60×84/8. Бумага офсетная. Сдано в набор 14.08.2012. Подписано в печать 21.09.2012.
Печ. л. 50. Усл. печ. л. 46,5. Уч. изд. л. 41,4. Зак. 079-12. Тир. 500.

РИО НЦРВХ СО РАМН
(664003, Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37, 29-03-70. E-mail: arleon58@gmail.com)