

## НОВАЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩАЯ СУБСТАНЦИЯ НА ОСНОВЕ ЙОДА С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ И МОЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

*С.В. Андреев, Е.А. Клочко, Э.А. Новикова*

*ФБУН «Научно-исследовательский институт Дезинфектологии»  
г.Москва, Россия.*

**Аннотация.** Разработана новая дезинфицирующая субстанция на основе йода и полиэтоксилированных алкилфенолов. Разработана технология её получения. Исследована активность в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов, микобактерий. Доказана возможность применения синтезированной субстанции в качестве действующего вещества в составе дезинфицирующих средств.

**Ключевые слова:** йод; йодофор; дезинфицирующая субстанция; дезинфицирующее средство

В настоящее время в качестве действующих веществ в дезинфицирующих средствах нашли широкое применение перекисные соединения, хлорсодержащие вещества, глутаровый альдегид и глиоксаль, спирты, четвертичные аммониевые соединения, третичные амины и производные гуанидина.

При этом постоянно ведется поиск новых действующих веществ, обладающих высокой антимикробной активностью и проявляющих низкую токсичность.

Перспективным в этом плане является молекулярный йод, который имеет ряд преимуществ по сравнению с другими ДВ:

- Высокая биологическая активность йода в достаточно малых концентрациях [1];
- Высокая скорость воздействия на патогенные микроорганизмы [2];
- Отсутствие влияния органических загрязнений на биоцидное действие йода;
- Возможность визуально оценивать дезинфицирующую активность йодсодержащих препаратов.

Среди всех форм йода наибольшим бактерицидным действием обладает молекулярный йод  $I_2$ , который обладает активностью в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий, вирусов, грибов, микобактерий [3].

В разное время исследовалась возможность использования некоторых соединений йода в медицине и дезинфекции. Недостатком неорганических соединений йода, несмотря на то, что они обладают антимикробной активностью, является их высокая токсичность по отношению к теплокровным организмам.

Практика применения органических соединений йода в дезинфекции и медицине показала, что алкильные соединения (например,  $CN_3$ ,  $C_2H_5I$  и др.) слишком токсичны, чтобы применять их в целях дезинфекции [4]. Для дезинфекции ран из этой группы соединений ранее применялся йодоформ  $CN_3$  [4], однако он обладает очень низкой растворимостью в воде и спирте.

Наиболее перспективными оказались йодофоры – комплексные соединения йода с органическими полимерами и поверхностно-активными веществами. Как правило, такие комплексы содержат йод в наиболее активной форме – молекулярной. Носитель йода определяет наиболее важные свойства комплекса: растворимость в воде и других растворителях, стабильность,

агрегатное состояние при комнатной температуре, токсичность и такое потребительское свойство как способность окрашивать обрабатываемые поверхности. Токсичность подобных комплексов при ингаляционном воздействии невысока, так как давление паров йода над комплексными соединениями существенно ниже, чем над водными и спиртовыми растворами йода [5].

Нами синтезирован новый йодофор, который представляет собой комплекс йода и полиэтоксилированных нонилфенолов. Комплекс образуется за счет окисления йодом концевой гидроксильной группы в нонилфенолах с образованием дийодойодат-ион, который и участвует в комплексообразовании. Стабильность полученного комплекса исследована методом ускоренного старения и составляет не менее 4-х лет.

Синтезированный йодофор обладает моющими свойствами, не обладает корродирующим действием в отношении нержавеющей стали, окрашенного металла, алюминия различных марок и различных пластиков.

Йодофор является перспективной субстанцией для разработки дезинфицирующих средств. Методом батистовых тест-объектов определена его активность в отношении грамположительных, грамотрицательных бактерий, микобактерий, вирусов, грибов. Полученные результаты, а также отсутствие окрашивания поверхностей при обработке, позволяют рассматривать новый йодофор как основу для дезинфицирующих средств с широкой областью применения.

Была исследована совместимость йодофора с типовыми компонентами рецептурного состава ДС. Выяснилось, что йодофор совместим с большинством амфотерных и неионогенных ПАВ, и с некоторыми ЧАС. Полученный комплекс устойчив в кислой и сильнокислой среде, однако разрушается в щелочной.

В результате проведенных исследований разработано несколько рецептур дезинфицирующих средств для применения в ЛПУ, в мясоперерабатывающей и пивной промышленности, в быту и на предприятиях коммунально-бытового хозяйства. Разработаны также рецептуры кожного антисептика и дезинфицирующего мыла на основе нового йодофора.

#### **Литература:**

1. Lelieveld H.L.M., Mostert M.A., Holah J.T. Handbook of Hygiene Control in the Food Industry. CRC Press, 2005. - 714 p.
2. Мойка и дезинфекция в молочном деле под ред. Г.А. Титова. М.: Пищепромиздат, 1957, 163 с.
3. Микробиология пива. – 3-е изд. под ред. Фергюса Дж. Приста и Йена Кэмпбелла. – СПб.: Профессия, 2003
4. Г. Привэ, П. Дидрих, Я. Губер Органические соединения йода. Научно-техническая информация, 1963 г.
5. US pat. №4,668,510

УДК 616-92/.93(470.57)

### **О СЛУЧАЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЛИХОРАДКОЙ ДЕНГЕ**

*Р.И. Асылгузина*

*Территориальный отдел Роспотребнадзора в г. Салават и Ишимбайском районе,  
г.Салават, Россия*

**Аннотация.** Впервые в апреле 2013 г. в г. Салават Республики Башкортостан был

зарегистрирован завозный случай лихорадки денге. Проведены эпидрасследование случая и противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение распространения опасного инфекционного заболевания.

**Ключевые слова:** лихорадка Денге, геморрагический синдром, ареал, вспышка, завозной случай, эпиданамнез.

Лихорадка Денге - антропонозная (комариная) вирусная инфекционная болезнь. Протекает с лихорадкой, интоксикацией, миалгией, артралгией, сыпью и увеличением лимфатических узлов. При некоторых вариантах лихорадки Денге развивается геморрагический синдром.

Лихорадка Денге - самое быстро распространяющееся тропическое заболевание, которое представляет реальную эпидемическую угрозу и является ведущей причиной заболеваний и смерти населения в странах с тропическим и субтропическим климатом.

Ареал лихорадки Денге составляют страны Центральной и Южной Америки, Африки, Южной и Юго-Восточной Азии, Австралии, Южной Европы. По данным ВОЗ за последние 50 лет в 30 раз возросла заболеваемость лихорадкой Денге, которая регистрируется в 125 странах мира.

С начала 2013 года эпидемические вспышки лихорадки Денге отмечаются в Перу, Парагвае, Венесуэле, Бразилии, Мексике, Никарагуа, Колумбии, Каймановых островах, Таиланде, Вьетнаме, Шри-Ланке, Малайзии, где уже зарегистрированы тысячи случаев заболеваний людей, в том числе с летальным исходом.

Данное заболевание не является эндемичным для территории Российской Федерации. Тем не менее все чаще и чаще отмечаются завозные случаи данного заболевания на территорию Российской Федерации, так с 2010-2013 гг. наблюдалось 172 завозных случая.

В РФ в 2013 году зарегистрировано 49 завозных случаев в: Красноярском, Приморском, Хабаровском краях, Кемеровской, Московской, Новосибирской, Оренбургской, Сахалинской, Томской, Челябинской областях, г. Москве, Республике Башкортостан, связанных с пребыванием в Таиланде.

Впервые в апреле 2013 г. в Республике Башкортостан г. Салават был зарегистрирован завозный случай Лихорадки Денге.

Больная В., 29.06.1960 г.р., проживает в г. Салават, не работает. Больна с 05.04.2013: высокая температура до 40, озноб, ломота в теле, тошнота, с 06.04.13 появилась сыпь. К 10.04.2013 была высокая температура до 40, озноб, небольшие судороги мышц, боли в суставах, гнилостный привкус во рту. За медицинской помощью не обращалась.

Состояние больной В. 11.04.13 ухудшилось, 11.04.2013 в 14.00 по скорой помощи доставлена в инфекционное отделение Государственного бюджетного учреждения здравоохранения РБ «Городская больница г. Салават» с подозрением на кишечную инфекцию. При поступлении в инфекционное отделение поставлен диагноз: Лихорадка неясной этиологии. После сбора эпиданамнеза 12.04.2013 выставлен предварительный диагноз: Лихорадка Денге?

Из эпиданамнеза следует, что больная с 28.03.13 по 05.04.13 находилась в гостях у родственников в Таиланде. В время пребывания в Таиланде проживала в доме у родственников, экскурсий и поездок по стране не совершала. Больная подтверждает факт укусов комаров (отмечает на правом предплечье небольшую язвочку – след от укуса комара). Вылетела из Таиланда 05.04.13, с 05.04.13 по 07.04.13 проживала у знакомых в Москве. Выехала из Москвы 07.04.13, вернулась в г. Салават 09.04.13.

Лихорадкой Денге 01.04.13 в Таиланде заболел зять, 05.04.13 заболела и

дочь.

Филиалом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Салават, Ишимбай и Ишимбайском районе по РБ» 12.04.2013 г. в 11 часов 45 минут было получено экстренное извещение из инфекционного отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения РБ «Городская больница г. Салават» на больную В. с диагнозом: Лихорадка Денге?.

Государственным бюджетным учреждением здравоохранения РБ «Городская больница г. Салават» был отобран материал (сыворотка крови) у больной 12.04.13 года в 17 часов, 15.04.13 г был отправлен в вирусологическую лабораторию ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РБ».

Кровь исследована в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора 17.04.2013. В пробах обнаружена РНК вируса Денге III типа.

Больная проходит курс лечения и наблюдается в поликлинике по месту жительства, динамика положительная, состояние больной удовлетворительное.

Лихорадка Денге относится к инфекционным болезням, которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации.

Учитывая сложившуюся в мире эпидемическую ситуацию по лихорадке Денге и в целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия российских граждан, необходимо обеспечить контроль за проведением юридическими лицами и индивидуальными предпринимателями, осуществляющими туроператорскую и турагентскую деятельность, обязательного информирования граждан, планирующих выезд в неблагополучные в эпидемическом отношении страны о рисках, связанных с болезнями, ассоциируемыми с чрезвычайными ситуациями в области общественного здравоохранения, имеющими международное значение и обеспечения выезжающих памятками. Организовать проведение подготовки персонала туристических фирм по вопросам профилактики инфекционных болезней. Усилить контроль за готовностью лечебно-профилактических организаций к своевременному выявлению, госпитализации, проведению диагностических обследований больных опасными инфекционными болезнями, в том числе геморрагическими лихорадками. Совместно с органами исполнительной власти в сфере охраны здоровья граждан в субъектах Российской Федерации провести обучение персонала лечебно-профилактических организаций по вопросам диагностики и профилактики лихорадки Денге. Усилить санитарно-карантинный контроль в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации за лицами, возвращающимися из неблагополучных по инфекционным болезням стран.

#### **Литература:**

1. Письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 25 февраля 2013 г. N 01/2020-13-32.
2. Санитарно-эпидемиологические требования СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (с изменениями, утв. Постановлением Главного государственного врача РФ от 25.04.2008 г. № 29)//Российская газета. - 2008. - № 82.
3. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 11.05.2007 N 27 "О реализации Международных медико-санитарных правил (2005)" (Зарегистрировано в Минюсте РФ 31.05.2007 N 9575)//Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти. - 2007. - № 24. УДК 615. 45:544.77.051.64:636.028

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА ОФЛОКСАЦИНА В СВОБОДНОЙ И НИОСОМНОЙ ФОРМАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА БЕЛЫХ МЫШАХ ПРИ ВВЕДЕНИИ *PER OS*

М.А. Ашихмина, Д.А. Ковалев, О.В. Бобрышева, С.В. Писаренко,  
Л.В. Ляпустина

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»  
г. Ставрополь, Россия

**Аннотация.** Создание эффективных композиций биопрепаратов является одним из современных направлений биотехнологии. В ходе исследования была изучена фармакокинетика офлоксацина в составе анионных ПЭГ-содержащих ниосом на основе сорбитана моностеарата. Эффективность включения офлоксацина в ниосомы составила  $76,1 \pm 2$  %. В ходе исследования было установлено, что использование ниосомной формы позволяет увеличить пиковую концентрацию офлоксацина в сыворотке крови в среднем на 23,6 % в течение 1 ч. после введения и время выведения (до 24 ч.) по сравнению со свободной формой антибиотика.

**Ключевые слова:** ниосомы, офлоксацин, микрокапсулирование.

**Введение.** Ниосомы – это микроскопические везикулы на основе неионных ПАВ, отличающиеся высокой физической и химической устойчивостью к повреждающим факторам [1]. Спектр областей применения ниосомных микроконтейнеров на основе неионных поверхностно-активных веществ включает в себя разработку эффективных систем транспорта лекарств, позволяющих контролировать их высвобождение, перспективных способов доставки в клетки фрагментов ДНК с целью создания вакцин нового поколения, генной терапии и др. [2]

Офлоксацин – современный противомикробный препарат из группы фторхинолонов широкого спектра действия. Особую актуальность имеет применение офлоксацина для лечения сепсиса, туберкулеза и других опасных инфекционных болезней, связанных с внутриклеточной персистенцией возбудителей. Разработка ниосомной формы антибиотика, возможно, позволит снизить степень ферментативной деструкции при введении *per os* и токсические эффекты при его применении за счет уменьшения дозировки препарата.

**Цель** работы состояла в исследовании особенностей фармакокинетики офлоксацина, ассоциированного с анионными ПЭГ-содержащими ниосомами на основе сорбитана моностеарата.

**Материалы и методы.** В состав ниосом входили сорбитан моностеарат (Span 60) (Sigma, США), холестерин (Sigma, США), дигексадецилфосфат (Sigma, США), полиэтиленгликоль ПЭГ-115 («НеваРеактив, Россия»). В ниосомы проводили включение офлоксацина (Sigma, США) на стадии формирования микровезикул.

Для получения препаратов ниосом применяли обращенно-фазовую отгонку с последующей ультразвуковой дезинтеграцией [3]. Очистку препарата ниосом от остатка невключенного антибиотика проводили путем центрифугирования дисперсий ниосом при 13400 об/мин в течение 30 мин. Средний размер частиц ниосомных дисперсий определяли по данным зондовой микроскопии в режиме контактной АСМ (универсальная сканирующая зондовая нанолaborатория NTEGRA Prima, NT-MDT, Россия). Определение концентрации действующего вещества проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматографический комплекс Konik Q 12С, Испания).

Исследования фармакокинетики офлоксацина выполнены на 100 половозрелых нелинейных белых мышах обоего пола массой 18 – 20 г, полученных из питомника ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. В качестве образцов для ВЭЖХ использовали смесь 30 % трифторуксусной кислоты и сыворотки, полученной из проб крови объемом 300 – 500 мкл, отобранных из сердца биопробных мышей через 1, 3, 6, 24, 27 и 30 ч. после однократного введения *per os* свободной и ниосомной форм антибиотика (однократная доза 0,2 мл соответствующего препарата с общей концентрацией офлоксацина 0,8 мг/мл). Ниосомная форма содержала офлоксацин как в составе комплексов ниосома – антибиотик, так и в свободной форме.

**Результаты.** Ранее нами было установлено, что оптимальный состав ниосом для инкапсулирования антибиотика включает Span 60, холестерин, дицетилфосфат и ПЭГ-115 в соотношении 7:4:1:0,2. Препараты ниосом содержат униламеллярные сферические или овальные микровезикулы со средним размером 250 нм. Эффективность включения офлоксацина в ниосомы составила  $76,1 \pm 2$  %. Изменения фармакокинетики офлоксацина при использовании ниосомной формы при однократном введении *per os* заключаются в увеличении пиковой концентрации в сыворотке крови (в среднем на 23,6 % в течение 1 ч. после введения) и увеличении времени выведения (до 24 ч.) по сравнению со свободной формой антибиотика (см. рис.1).

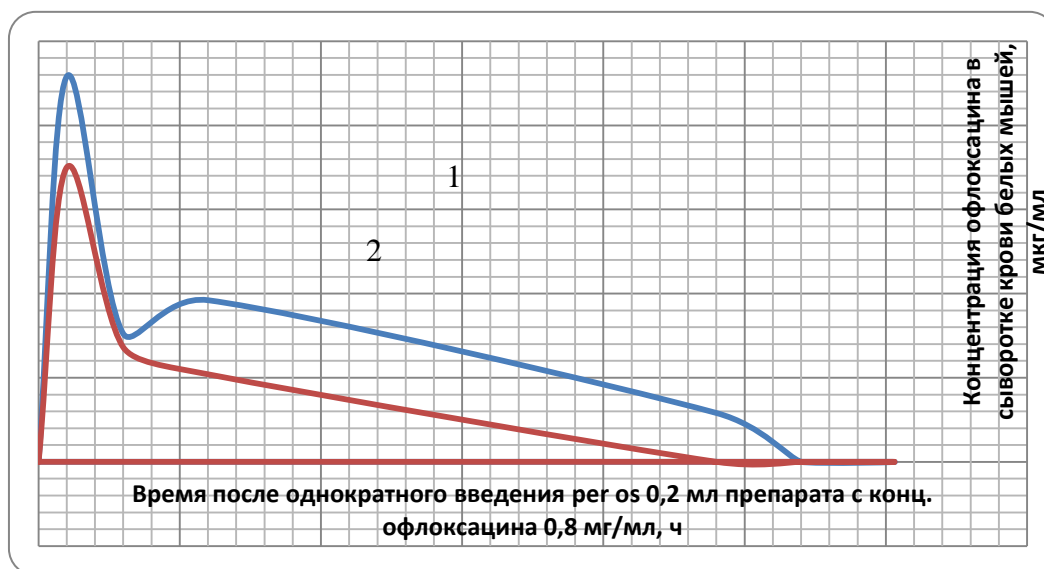


Рисунок 1 – Концентрация офлоксацина в сыворотке крови биопробных нелинейных белых мышей при введении *per os* свободной и ниосомной формы антибиотика. Кривая 1 – ниосомная форма, кривая 2 – свободная форма офлоксацина

Таким образом, полученные результаты позволяют констатировать, что анионная ПЭГ-содержащая ниосомная форма офлоксацина позволяет повысить эффективность использования антибиотика по сравнению со свободной формой, а также обеспечивает пролонгированное действие препарата.

#### Литература:

1. Baillie, A.J. The preparation and properties of niosomes-non-ionic surfactant vesicles / A.T. Florence, L.R. Hume, A. Rogerson, G.T. Muirhead // J. Pharm. Pharmacol. – 1985. – V. 37(12). – P. 863–868.
2. Mozafari, M.R. Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications – Monash University, Victoria, Australia. – 2007.

3. Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Ашихмина М.А., Куличенко А.Н. Конструирование и характеристика нисомных микровезикул для инкапсулирования офлоксацина на основе сорбитана моностеарата // Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 23 – 31.

УДК 004:613:616-036.22

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ГИГИЕНЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ

*О.Н. Барышев, А.О. Захаров*

*ФБУН «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан»  
г. Казань, Россия*

**Аннотация.** Современное государственное управление невозможно представить без применения в своей работе развитых информационных технологий (далее – ИТ), основным назначением которых является своевременная доставка, хранение и обработка информации, позволяющей принимать качественные управленческие решения. [1]

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, осуществляя функции по контролю и надзору в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, защиты прав потребителей и потребительского рынка является органом государственной власти, имеющим высокую потребность в применении ИТ в своей деятельности с целью увеличения оперативности как внутреннего информационного взаимодействия, так и взаимодействия с бизнес-сообществом путём построения информационных ресурсов, обеспечивающих достижение указанных выше целей. В данной научно-исследовательской работе рассматриваются вопросы построения централизованных информационных ресурсов на примере системы автоматизированного представления оперативных данных из филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)» (далее – Центр) и лечебно-профилактических учреждений (далее – ЛПУ) Республики Татарстан в Центр и системы учета личных медицинских книжек.

**Ключевые слова:** информационные технологии, информационный ресурс, автоматизация представления данных, система учета и печати личных медицинских книжек, MS SQL Express 2008, Visual CSharp Express, SQLServerExpress, ASP.NET, Visual WebDeveloper Express - ASP.net.

Система автоматизированного представления оперативных данных (далее – САПОД) является централизованным информационным ресурсом, обеспечивающим сбор, хранение и обработку данных по направлению эпидемиологического надзора, и реализована в виде веб-приложения, которое позволяет всем учреждениям, задействованным в предоставлении оперативных данных по обеспечению жизнедеятельности населения Республики Татарстан, предоставлять требуемые данные в Центр в параллельном режиме с осуществлением логического контроля при вводе информации. САПОД позволяет формировать отчётность в разрезе региона, города, района, ЛПУ.

САПОД разработана с использованием языка программирования CSharp и технологией создания веб-приложений ASP.NET. и позволяет осуществлять сбор, обработку и мониторинг по различным категориям инфекционных заболеваний,

иммунизации, вакцинации населения и прочих направлений «эпидемиологического блока».

Функционал данного приложения позволяет вести контроль заполнения данных сотрудниками ЛПУ за определенную дату; предусмотрен ряд проверок на наличие ошибок при вводе данных оператором (без отправки их на сервер), поля заполненные неверно отмечаются.

Для предотвращения ошибок ввода предусмотрена возможность редактирования ранее заполненных данных. С помощью редактора времени ввода отчетов сотрудник ЛПУ имеет право изменить неверно введенные данные до определенного момента времени, который устанавливается в панели администрирования. Данная функция исключает пересечение момента получения отчета сотрудником Центра и момент редактирования данных. Возможность редактирования заканчивается за 30-40 минут до начала обработки данных сотрудником Центра.

Интерфейс САПОД разработан в среде разработки Visual Web Developer Express - ASP.net.

Отличительной частью интерфейса приложения является его простота и удобство использования. На рис.1 изображен пример окна ввода и редактирования данных оператора ЛПУ.

Главная страница : Оператор стационара : Ввод и редактирование оперативных данных : Ввод и редактирование

Ф.И.О.	Название мед.уч.	Описание мед.уч.	Права доступа
Салахова Г.А 1 2	МУЗ "ГП №7"	2932995.2931862	OperatorsClinic

Ввод оперативных данных по госпитализации по Гриппу и

Если отчет предоставляется не за вчерашний день, необходимо изменить дату отчета

Май 2013						
Пн	Вт	Ср	Чт	Пт	Сб	Вс
29	30	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	1	2
3	4	5	6	7	8	9

Внимание! Новая форма отчетности. Правила заполнения смотрите тут.

Ввод данных отчета				
	Дата предоставления отчета:		2013-05-08 09:46:25	
	Дата отчета:		2013-05-07	
	Грипп	ОРЗ	H1N1 из грипп	Смерти (грипп и орз)
Всего	0	0	0	0
Легкой степени	0	0	0	0
Средней степени	0	0	0	0
Тяжелой степени	0	0	0	0
до 1 года	0	0	0	0
1-2 года всего	0	0	0	0
1-2 года орг	0	0	0	0
3-4 года всего	0	0	0	0
3-4 года орг	0	0	0	0
5-6 лет всего	0	0	0	0
5-6 лет орг	0	0	0	0

Рис. 1. Окно ввода и редактирования данных оператора ЛПУ

В верхней части экрана расположен блок, в котором отображаются данные оператора: его Ф.И.О, название медицинского учреждения, описание медицинского учреждения (в этом столбце хранятся контактные данные, адрес, телефон и т.д.) и права доступа пользователя. Ниже расположен активный календарь, с помощью которого выбирается дата заполнения отчета. Далее расположены таблица и поля ввода отчета по заболеваемости.



На рис.2 показана нижняя часть поля ввода отчетов, в крайней левой части её расположена кнопка сохранения и отправки данных на сервер.

в т.ч. Жители села 0-17 лет	0	0	0	0
Прочее 1	0	0	0	0
Прочее 2	0	0	0	0
Смерти всего	0	0	0	
Смерти 0-17 лет	0	0	0	
Смерти беременные	0	0	0	
Сохранить Отмена				

Рис.2. Нижняя часть поля ввода отчетов

Модуль мониторинга предоставления отчетов создан для контроля ввода данных операторами ЛПУ. На рис.3 показан пример мониторинга.

Главная страница : Отчеты ФБУЗ : Внебольничная пневмония : Мониторинг предоставления отчетов (Оперативные дан  
Мониторинг предоставления отчетов

Выберите дату

Май 2013						
Пн	Вт	Ср	Чт	Пт	Сб	Вс
29	30	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	1	2
3	4	5	6	7	8	9

Выберите тип учреждения:  
Все типы

Субъект РФ:  
Республика Татарстан

Областной район:  
Все области

Город:  
Область полностью

Район города:  
Все районы

Мониторинг предоставления Оперативных данных по Внебольничной пневмонии за 07.05.2013

Наименование поликлиники	Описание	Областной район	Тип взрослая/детская	Статус предоставления отчета
МУЗ "ДТП №6"	2982823,2984811 (54)	Казань	Детская	Предоставлен № отчета = 69873
МУЗ "ГП №20" (дет.отд)	2762583,2984811 (33)	Казань	Детская	Предоставлен № отчета = 69697
МУЗ "ГП №1"	295-6494,2956484	Казань	Взрослая	Предоставлен № отчета = 69810
МУЗ "ГП №6"	2795674,2795662	Казань	Взрослая	Предоставлен № отчета = 69739
МУЗ "ГП №20"	2762583,2764603 (33)	Казань	Взрослая	Предоставлен № отчета = 69698
МУЗ "ГП №8"	2342701,2342721 (41)	Казань	Взрослая	Предоставлен № отчета = 69740
МУЗ "ДТП №4"	5553183,5549071	Казань	Детская	Не предоставлен

Рис.3. Мониторинг предоставления отчетов

Также в мониторинге предоставления отчетов предусмотрен поиск среди выведенных на экран учреждений, быстрый вывод на печать и экспортирование выведенных на экран данных в следующие внешние программы: Microsoft Excel, Microsoft Word, Adobe Reader.

Система учета и печати личных медицинских книжек (далее – СУЛМК) является централизованным информационным ресурсом, обеспечивающим ввод, хранение и обработку данных по личным медицинским книжкам, выдаваемым Центром и его филиалами, и построена по «децентрализованной» технологии формирования централизованных информационных ресурсов.

СУЛМК представляет собой клиент-серверное приложение, имеющее следующие основные возможности:

1. Ввод данных о клиенте и печать на личной медицинской книжке, с возможностью изменения позиций полей печати для различных моделей принтеров.
2. Формирование централизованной базы данных региона путем автоматической (по заданному периоду времени) передачи изменений из базы данных филиала в базу данных Центра.
3. Формирование файла с данными в формате PBL 2.0 для загрузки информации о выданных личных медицинских книжках на сайт

4. <http://16.gsen.ru> в соответствии с требованиями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Данные клиента вводятся сотрудником филиала в базу данных, построенную на платформе MS SQL Express 2008, и передаются в основную базу данных Центра (рис.4).

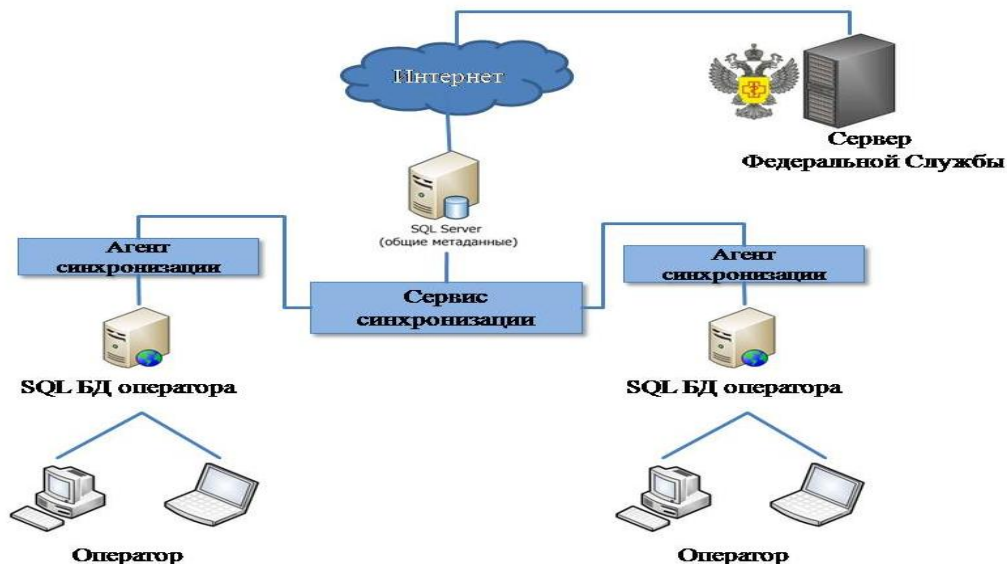


Рис.4. Схема передачи информации СУЛМК

В случае разрыва связи между региональным и районным серверами данные записываются в базу данных филиала, а в момент появления связи включаются сервис синхронизации и агенты синхронизации, которые синхронизируют базы данных, исключая дублирование записей в региональной базе данных (рис.5).

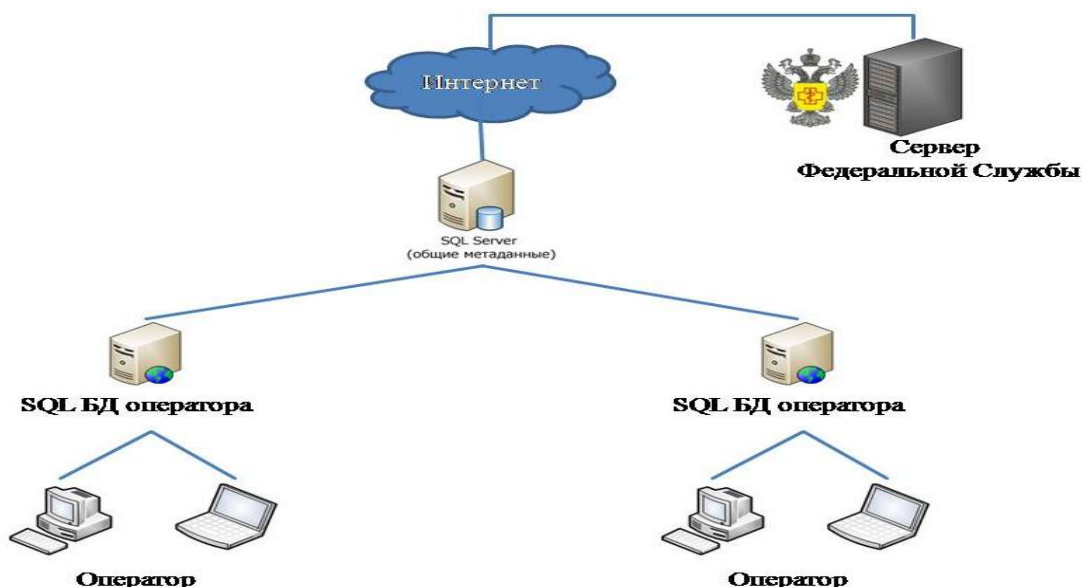


Рис.5. Схема работы сервиса синхронизации

Выбор MS SQL Express 2008 обусловлен тем, что данный программный продукт облегчает разработку управляемых данными приложений, а также обеспечивает улучшенную безопасность хранилищ и быстрое развертывание [2].

СУЛМК позволяет создавать свои собственные справочники, которые в дальнейшем могут быть использованы для заполнения данных в личных медицинских книжках клиентов.

На рис.6 приведена основная формы для работы со следующими справочниками: организации, районы медицинского обследования, профессии, сферы деятельности.

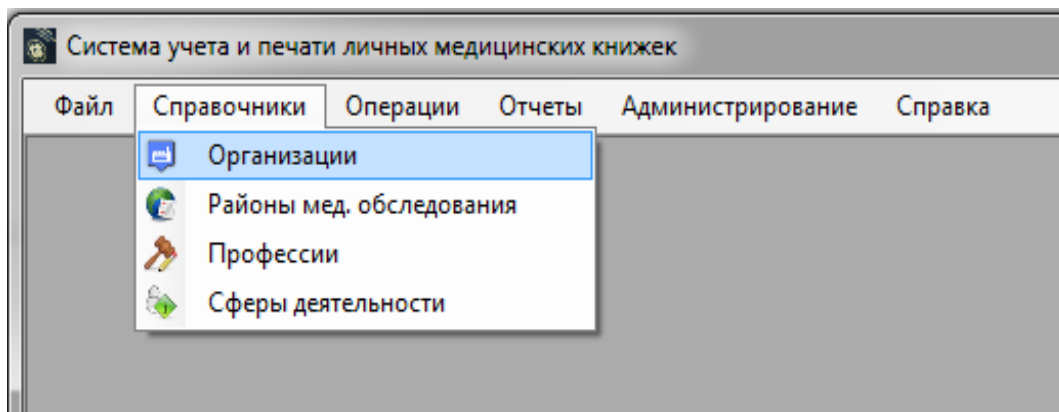


Рис.6. Окно работы со справочниками

После заполнения данных полей можно переходить к созданию новой записи личной медицинской книжки. В контекстном меню «Операции» необходимо выбрать пункт «Новая запись», после чего откроется окно заполнения данных о клиенте (рис.7).

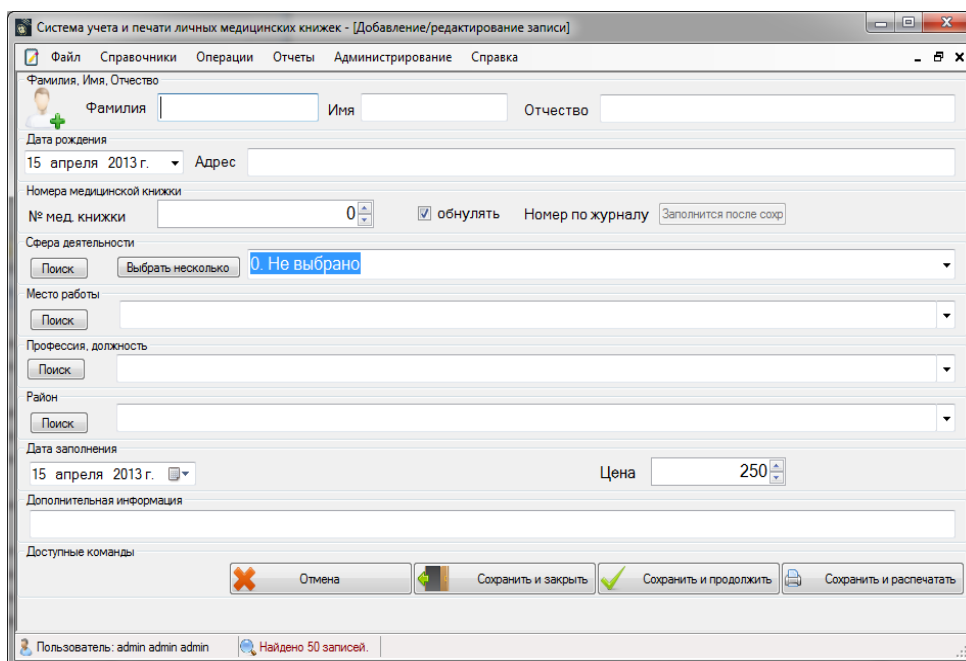


Рис. 7. Окно заполнения данных о клиенте

После заполнения необходимых данных оператор может приступить к печати личной медицинской книжки клиента, нажав на кнопку «Сохранить и распечатать», после чего откроется окно печати, показанное на рис. 8

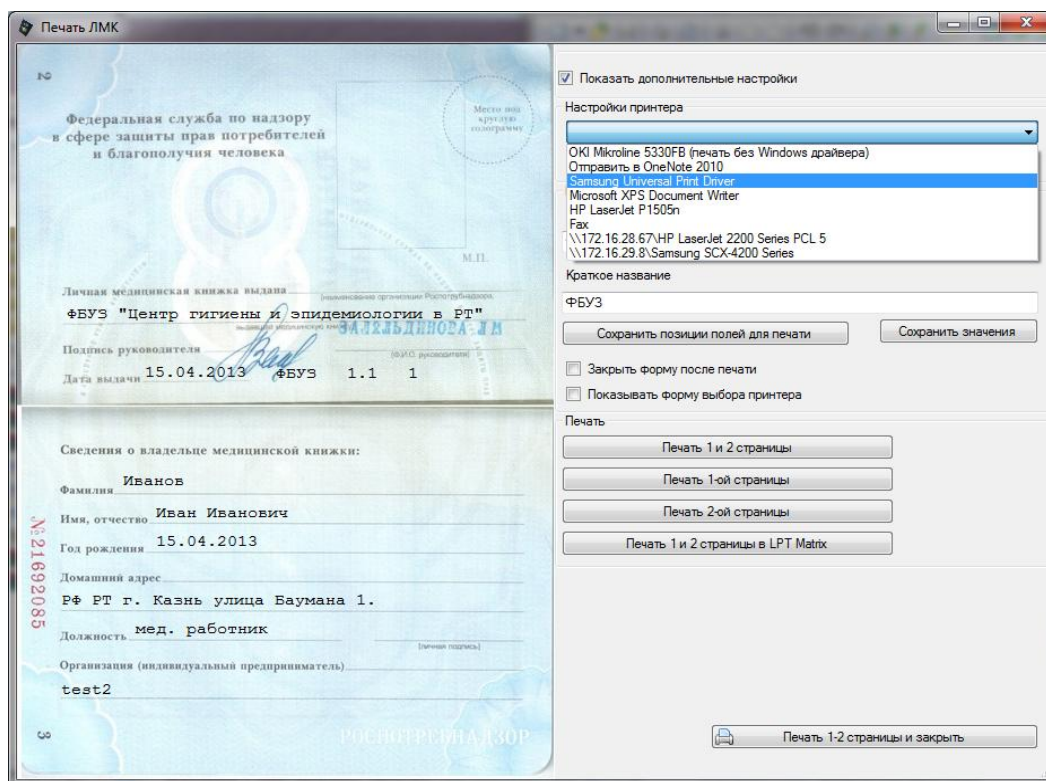


Рис. 8. Окно печати СУЛМК

Таким образом, применение централизованной («портальной») и «децентрализованной» технологий формирования централизованных информационных ресурсов позволяет успешно решать задачи автоматизации производственных процессов таких организаций, как ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, обеспечивая принятие оперативных и качественных управленческих решений.

#### Литература:

1. ББК 32.97 А22 Автоматизированные информационные технологии : Учебное пособие / Авт.кол.: Воропаева Т.В., Рудник Ф.И., Либерман В.Б. и др.; Под ред. В.Б. Либермана, А.И.Никифорова; Финансовая академия при Правительстве РФ; кафедра автоматизированных информационных технологий. - М.: ФА, 2002. - 264 с.
2. <http://www.microsoft.com/sqlserver/2008/ru/ru/express.aspx> (Спецификации SQL Server).

УДК 616.5:615.03

### ASPERGILLUS NIGER КАК ВОЗБУДИТЕЛЬ ОТОМИКОЗОВ И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С PSEUDOMONAS AERUGINOSA

*А.А. Баязитова, Е.В. Халдеева*

*ФБУН Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора  
г. Казань, Россия*

**Аннотация:** В нашей работе представлены сведения по исследованию культуральных свойств грибов рода *Aspergillus niger*

**Ключевые слова:** *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, отомикоз, аспергиллез, онихомикоз, противогрибковые препараты

Грибы рода *Aspergillus* являются причиной широкого диапазона хронических, сапрофитных и аллергических состояний. Инвазивные заболевания, вызванные грибами рода *Aspergillus*, включают инфекции нижних дыхательных путей, пазух носа и кожи как мест непосредственного проникновения возбудителя. Сапрофитические формы включают аспергиллезный отомикоз и аспергиллему легких. [1,2] Аллергические формы включают аллергический аспергиллезный синусит и аллергический бронхолегочный аспергиллез. [4]

Основными возбудителями отомикозов являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и дрожжеподобные грибы рода *Candida*. В отдельных случаях грибковые заболевания ушей могут вызывать грибы родов *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* и др. [3]

В связи с этим, целью работы являлось изучение частоты встречаемости *Aspergillus niger* у больных отомикозами и особенностей выделенных клинических штаммов, а также их взаимодействия с синегнойной палочкой.

#### **Материалы и методы.**

Проведено культуральное исследование отделяемого слуховых проходов у 252 пациентов с жалобами на зуд, болезненность, заложенность и шум в ухе, умеренные выделения. В 130 случаях (52%) выявлены плесневые грибы, что позволило подтвердить диагноз отомикоз. Культивирование проводили на чашках с модифицированной средой Сабуро и Чапека при температуре 30-37<sup>0</sup> в течение 3-5 дней.

При этом наиболее часто (в 37% случаев) выявляли *A. niger*, в том числе, в 25 случаях (19%) совместно с бактериальной микрофлорой (*Staphylococcus epidermidis* или гр(-) палочки), и в 23 анализах (18%) - в монокультуре. Следует отметить, что сопутствующая бактериальная микрофлора высевалась в количестве выше 10<sup>3</sup> КОЕ/тампон.

Для изучения взаимодействия *A. niger* и *Pseudomonas aeruginosa* использовали 8 штаммов *A. niger*, отобранных от больных отомикозами. В том числе 4 штамма *A. niger*, выделенных в монокультуре, и 4 штамма *A. niger*, выделенных в микст-культуре с кокковой флорой. В качестве контроля был использован музейный штамм *A. niger* У-1.

Определяли чувствительность штаммов *A. niger* к 13 различным противогрибковым препаратам: амфотерицин, пимафуцин, тербинафин, клотримазол, кетоконазол, флуконазол, итраконазол, нистатин – используя диско-диффузионный метод, а также местным препаратам: «Залаин» (сертаконазол 2%), «Экзодерил» (нафтифин 1%), «Травоген» (изоконазол), «Микозорал» (кетоконазол 2%), «Пимафукорт» (натамицин 2%), испытанным в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ XII-го издания.

#### **Результаты и их обсуждение:**

Изучение линейной скорости роста при различных температурах и на разных средах показало, что наиболее благоприятными условиями роста для *A. niger* являются температура 37<sup>0</sup> С и модифицированная среда Сабуро.

В ходе проведенных исследований было установлено, что клинические штаммы *A. niger* обладают разной степенью чувствительности к противогрибковым препаратам (таблица 1). Все штаммы *A. niger* были чувствительны к действию тербинафина, итраконазола и пимафуцина. В то же время, отмечена устойчивость 4 штаммов к кетоконазолу, 2 штаммов – к клотримазолу.

Среди препаратов местного применения пимафукурт, травоген и экзодерил были активны в отношении всех штаммов *A. niger*, однако у 2 (22%) штаммов в случае травогена и 5 (55%) штаммов в случае экзодерила отмечен промежуточный уровень чувствительности. Микозарал и залаин проявили меньшую активность, причем отмечена устойчивость 4 штаммов к залаину и 5 штаммов к микозаралу.

Таблица 1 - Степень чувствительности штаммов *A. niger* к противогрибковым препаратам

	Тербинафин	Нистатин	Итраканазол	Пимафуцин	Кетоконазол	Клотримазол	Флуконазол	Амфотерицин	Залаин	Экзодерил	Микозарал	Травоген	Пимафукурт
171	12	1	4	8	0	0	1	1	1	2,5	0	2	3
344	14	1	5	12	0	3	1	0	1,5	0,5	0,7	2	2,2
620	10	3	7	10	1	5	8	2	0	1,3	0,7	1,3	1,5
111	15	1	6	10	0	3	3	1	0	2,2	0	1	2
5													
181	16	2	8	10	1	5	1	2	1,6	2	0	2	2,6
321	14	1	3	14	1	1	1	1	1	1,3	1,1	2	1,2
502	23	1	3	12	2	2	3	2	0	1,5	0	2	2
846	12	1	5	10	0	0	0	2	0	1	0	2	1,7
У-1	12	3	4	10	2	5	2	2	1	1,2	0	1,5	0,9

Несмотря на то, что *A. niger* и *P. aeruginosa* являются распространенной причиной заболевания слуховых проходов, их совместное присутствие отмечается редко, что позволяет предположить наличие антагонизма между *A. niger* и *P. aeruginosa*. [8] В ходе проведенных исследований при совместном культивировании штаммов было установлено, что музейный штамм и монокультура не проявляли антагонистической активности и не подавляли рост *P. aeruginosa*. Штамм *A. niger* 344 из микст-культуры слабо подавлял рост *P. aeruginosa*. В то же время остальные три штамма из микст-культуры проявляли устойчивость к синегнойной палочке, которая выразилась в подавлении роста.

Таким образом, в ходе исследования показано существование штаммов *A. niger* отличающихся по уровню чувствительности к антимикотическим препаратам, скорости роста и характеру взаимодействия с *P. aeruginosa*, что необходимо учитывать при назначении терапии, особенно в случае микст инфекций.

#### Литература:

1. Аравийский Р. А., Климко Н. Н., Васильева Н.В. Диагностика микозов. Санкт Петербургский издательский дои СПбМАПО 2004. - 185с
2. Мюллер Э, Леффер В. Микология. Пер. с нем. М., Мир, 1995 - 343
3. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции руководство для врачей. Москва издательство Бином 2008. – 439
4. Паттерсон Р. Аллергические болезни. Пер. с англ. М.: Гэотар медицина. 2000 – 733
5. Саттон Д. и др. Определитель патогенных и условно-патогенных грибов. Пер. с англ.М. Мир. 2001 – 468с.

**МЕТОДЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ РЕПЕЛЛЕНТНЫХ, ИНСЕКТИЦИДНЫХ И АКАРИЦИДНЫХ СРЕДСТВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ДЕТЕЙ**

*О.А.Белых*

*ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора  
г. Москва, Россия*

**Аннотация.** Приведены наиболее часто используемые репеллентные, акарицидные и инсектицидные средства для детей различного возраста. Представлены методы их оценки с учетом способов применения и характера действующих веществ. Апробирована экспериментальная модель – крысы - отъемыши для выполнения токсикологических исследований.

**Ключевые слова:** защита детей, репелленты, инсектициды, токсичность, опасность, экспериментальная модель, крысы

Защита детей младшего и среднего возраста от неблагоприятных биологических факторов окружающей среды постоянно остаётся актуальной. Восприимчивость детского организма, его адаптационные возможности отличаются от взрослого человека, ввиду наличия анатомической и функциональной незрелости ряда его органов и систем, а также из-за более активного обмена веществ, в связи с чем, большинство биохимических и физиологических реакций происходит достаточно быстро.

Одним из биологических факторов, оказывающих негативное влияние на организм ребенка, являются различные виды насекомых, обитающие в природных биотопах: лесные и таежные клещи, являющиеся переносчиками возбудителей опасных заболеваний, а также гнус, комары и мошки, чьи укусы могут вызывать аллергическую реакцию немедленного типа, которая лежит в основе анафилактических реакций.

Разработано большое количество разнообразных по форме, действию и методам применения защитных средств для детей. Среди них основную массу представляют собой контактирующие с кожей репелленты, в виде кремов, эмульсий, масел и других жидких форм на основе ДЭТА, IR3535, смеси растительных и эфирных масел (растительное масло из семян макадамии, масло зародышей пшеницы, масло из семян льна, масло камфорное), а также в виде браслетов. Кроме того, используются инсектицидные средства на основе пиретроидов (праллетрин, трансфлутрин) для применения в электрофумигаторах.

Из акарицидных средств хорошо изучены и применяются для обработки костюмов циперметрин и альфациперметрин.

В проведении токсикологических исследований по оценке безопасности средств, применяемых для детей, существует ряд особенностей в связи с существенными морфофункциональными различиями развивающегося и взрослого организма.

Важными условиями для токсикологических исследований являются правильный подбор животных по виду, возрасту и определение способов исследования в зависимости от рекомендуемого режима применения средств.

Так как репеллентные средства в основном наносятся на кожу, а подкладка костюмов соприкасается с кожей, основное значение имели результаты исследований, полученные при изучении кожно-резорбтивного, местно-раздражающего и сенсibiliзирующего действия средств.

При изучении фумигирующих средств важную роль играли результаты, полученные при ингаляционном воздействии.

В качестве наиболее оптимальной экспериментальной модели детского организма были выбраны крысы белых лабораторных крыс. Определяющим в подборе животных для постановки эксперимента является соотношение количества дней от рождения животного (возраст животного) с возрастом ребенка.

По различным источникам оптимальный возраст крысят для проведения токсикологических исследований средств, предназначенных для детей в возрасте от 1 - 1,5 лет, составляет 10 - 15 дней, для детей 4 - 5 лет - 30 дней, для детей 10-11 лет - 2 месяца и для детей 13 - 15 лет - 2,5-3 месяца.

В основном эксперимент начинается с крысят в возрасте 10 - 14 дней, так как есть возможность выявить изменения уже на раннем сроке воздействия изучаемого средства на развитие организма, и заканчивается в возрасте 30 - 45 дней. Данный возраст является более информативным, ввиду того, что появляется возможность собрать больше экспериментальных данных, отражающих токсическое воздействие средства на организм.

Интегральными показателями состояния крысят раннего возраста (10 - 14 дней), являются привес массы тела, сроки опущения, открытия глаз и выхода из гнезда. Для крысят старшего возраста (30 дней) интегральным показателем является привес массы тела, специфическими - определение функционального состояния нервной системы (регистрация суммационно-порогового показателя, поведенческих реакций), функционального состояния печени, почек (определение биохимических показателей крови и мочи) и периферического состава крови.

С учётом вышеперечисленных условий были проведены исследования ряда средств на основе часто используемых действующих веществ в виде репеллентов и акарицидов для детей.

Установлено, что средства на основе IR 3535 (до 10,0%) могут быть использованы для детей младшего возраста (от 1 года), так как при проведении эксперимента на крысятах 10-14 дневного возраста (наиболее чувствительная модель) не выявлено каких-либо изменений интегрального показателя (прироста массы тела) интоксикации. В конце эксперимента (возраст крысят 30-45 дней) при сравнении функциональных показателей нервной системы, печени, и гематологической картины каких-либо изменений не выявлено.

При изучении средств на основе ДЭТА (более 8%) в результате исследования у крысят 10-14 дневного возраста выявлено снижение массы тела в конце эксперимента, у крысят в возрасте 30 дней изменений исследуемых показателей интоксикации не зарегистрированы. Средства на основе ДЭТА в концентрации 5-8% не вызывали изменений показателей интоксикации у крысят в течение всего эксперимента, в связи с чем данные средства можно рекомендовать к использованию для детей младшего возраста (от 1-1,5 лет), а средства содержащие ДЭТА в концентрации более 8% рекомендуются для детей от 3 лет.

Репеллентные средства на основе эфирных масел («Репел X», цитронелловое масло и др.) изучались на крысятах 10-12 дневного возраста. Установлено, что средства, содержащие «Репел X» и цитронелловое масло в концентрациях не более 5% и 10% соответственно, не оказывали общетоксического, раздражающего и сенсibiliзирующего действия. При использовании средств на основе эфирных масел с большей концентрацией возможно проявление местно-раздражающего эффекта.

При определении острой токсичности средств при введении в желудок, гибель животных отсутствовала, но отмечалась кратковременная



заторможенность у 10-30 дневных крысят, в связи с чем, рекомендовано нанесение репеллентных средств детям только взрослыми или в их присутствии.

При изучении токсичности средств в виде браслетов готовили вытяжку из капсулы, содержащей эфирные масла, в соответствии с ГОСТ Р 52770-2007. Расчет испытуемых доз проводили исходя из рекомендаций по применению средства. Определяли параметры острой токсичности, кожно-резорбтивное и сенсibiliзирующее действие на крысятах-отъёмышках, с исходной массой тела 40 г.

После окончания экспозиции прирост массы тела у крысят опытной группы не отличался от контроля. Суммационно-пороговый показатель и поведенческие реакции в опытной группе не изменялись по сравнению с контролем. Нарушение функции печени в опытной группе не выявлено. Периферический состав крови в опытной и контрольной группах находился в пределах физиологической нормы.

Сенсибилизирующее действие изучали на крысятах - отъёмышках методом Иевлевой с последующим тестированием: проводили реакцию специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), в периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов, эозинофилов. Каких-либо изменений регистрируемых показателей сенсибилизации в опытной группе по сравнению с контролем не обнаружено.

Использование фумигирующих средств на основе праллетрина и трансфлутрина в присутствии детей регламентировано, также исходя из результатов эксперимента на крысятах подсосного возраста и крысятах-отъёмышках (15-30 дней). Установлено, что средства с концентрацией трансфлутрина и праллетрина не более 0,8 % в жидкой форме и не более 7,5 % в виде пластин, при использовании фумигирующих средств в помещениях не менее 40 м<sup>3</sup>, не оказывают токсического действия на детский организм.

Изучалось использование пиретроидов в виде инсекто-акарицидов при обработке защитных костюмов для детей. Группой компаний «Энергоконтракт» РФ разработаны и представлены для оценки токсической безопасности комплекты летней одежды для защиты детей разных возрастов (3,7-12 лет) от вредных биологических факторов (клещей и кровососущих насекомых). Комплекты состоят из куртки и брюк, выполненных из хлопчатобумажной ткани, со вставками из ткани, пропитанной акарицидным составом.

В качестве пропитывающего состава использована водная эмульсия хорошо изученного инсекто-акарицидного средства «Цифокс», действующим веществом которого является циперметрин. Для исследования были сформированы две группы из крысят в возрасте 10-14 дней и в возрасте от 1,5 до 2 мес., что эквивалентно трехлетнему и 7-12 летнему детскому возрасту.

Установлено, что при ежедневном воздействии средства в течение месяца у крысят обеих опытных групп не выявлено каких-либо изменений регистрируемых показателей интоксикации по сравнению с контролем.

Полученные результаты позволили заключить, что в рекомендованном режиме применения костюмы не опасны для здоровья и их можно рекомендовать к производству и применению детям в возрасте 3 -12 лет.

Таким образом, проведенные, с учётом особенностей детского организма, экспериментальные исследования, подтверждают безопасное использование репеллентных, инсектицидных и акарицидных средств, предназначенных для защиты детей от насекомых, обитающих в природных биотопах.

## РАССЛЕДОВАНИЕ ВСПЫШКИ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПОСЕЛКЕ УСТЬ-УРКИМА ТЫНДИНСКОГО РАЙОНА АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ

*Л.В. Бутакова\**, *О.П. Курганова\*\**, *В.О. Котова\**, *Л.А.Балахонцева\**,  
*О.Е. Троценко\**, *Е.Ю. Сапега\**, *В.И. Резник\*\*\**

*ФБУН Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора\**;  
*Управление Роспотребнадзора в Амурской области\*\**;  
*БУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае»\*\*\**  
*г. Хабаровск, Россия.*

**Аннотация.** Ежегодно на территории ДФО (Дальневосточный федеральный округ) отмечается подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) в летне-осенний период. В мае 2013 года в поселке Усть-Уркима Тындинского района Амурской области зарегистрирована вспышка ЭВИ. При молекулярно-генетическом (секвенировании) и вирусологическом методах исследований в клинических пробах и пробах внешней среды выявлен энтеровирус ЕСНО 6.

**Ключевые слова:** энтеровирусная инфекция, энтеровирус, заболеваемость, вспышка, дети.

В последнее десятилетие во многих странах мира отмечается активизация энтеровирусной инфекции (ЭВИ). Из-за отсутствия иммунитета дети наиболее восприимчивы к инфекции энтеровирусами и являются основными их распространителями.

В Российской Федерации официальная регистрация заболеваемости энтеровирусной (неполио-) инфекцией введена с 2006 года. Наиболее напряженная обстановка отмечается в Дальневосточном Федеральном округе (ДФО), на территории которого ежегодно регистрируется подъем заболеваемости энтеровирусной инфекцией в летне-осенний период.

В период с 06.05. по 22.05.2013 года в поселке Усть-Уркима Тындинского района Амурской области было зарегистрировано 16 случаев заболеваний энтеровирусной инфекцией среди детей. Сначала заболеваемость ЭВИ регистрировалась среди детей Муниципального образовательного казенного учреждения для детей дошкольного и младшего школьного возраста «Усть-Уркимская начальная школа-детский сад» (МОКУ «Уркимская НШДС»). Всего заболело 12 человек.

В дальнейшем были выявлены 2 семейных очага инфекции, куда входили дети, посещающие школу-детский сад и 2 неорганизованных детей. Также заболевание зарегистрировано у 2-х школьников из села Первомайское.

Всего под медицинским наблюдением находился 141 человек, в том числе дети общеобразовательной школы села Первомайское.

Заболевание протекало в форме серозно-вирусного менингита (СВМ) у 8 человек и в катаральной (респираторной) форме – у 8 человек. Степень тяжести заболеваний – средне-тяжелая и легкая. Все заболевшие находились на стационарном лечении.

Муниципальное образовательное казенное учреждение для детей дошкольного и младшего школьного возраста «Усть-Уркимская начальная школа-детский сад» (МОКУ «Уркимская НШДС») – учреждение высокой гигиенической значимости. Здание учреждения одноэтажное, приспособленное, построено по индивидуальному проекту для начальной школы в 1988 г. При

эпидемиологическом расследовании было установлено, что на объекте отсутствует централизованное водоснабжение и канализация. Вода доставляется автоцистерной 2 раза в неделю, хранится в емкостях и используется для приготовления пищи, мытья посуды и уборки помещений. Установлено недостаточное количество емкостей и ветоши для уборки групповых комнат, пищеблока, туалета, маркировка отсутствует. Для организации питьевого режима используется кипяченая вода. Отсутствует механизированная подача горячей и холодной воды на пищеблоке, помещении медицинского назначения, прачечной, туалетных всех групповых. Отсутствует групповая изоляция (общая раздевальная, туалет), количество имеющихся санитарных приборов не соответствует списочному количеству детей. Внутренняя канализация с устройством выгребов или локальных очистных сооружений отсутствует. На пищеблоке выявлены нарушения несоблюдения последовательности технологических процессов, исключающих встречные потоки сырой и готовой продукции. Нарушение режима мытья кухонной и столовой посуды, использования и хранения уборочного инвентаря. Нарушения дезинфекционного режима.

По результатам исследования методом ПЦР в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Амурской области» у 13 детей были выявлены положительные результаты на энтеровирусную инфекцию.

14.05.2013 года в лабораторию Дальневосточного регионального научно-методического центра по изучению ЭВИ ФБУН Хабаровский НИИЭМ Роспотребнадзора поступило 50 проб от больных, контактных и проб из внешней среды, из них 4 сыворотки крови, 6 проб ликвора, 21 образец носоглоточных смывов, 16 проб фекалий и 3 – питьевой воды.

Весь материал был исследован методом ПЦР в реальном времени. Было получено 18 положительных результатов, РНК энтеровирусов обнаружена в 4 пробах ликвора, в 11 пробах фекалий и в 3 – носоглоточных смывов. 12 положительных образцов были пробами от больных, остальные 6 – от контактных детей.

Среди сотрудников детского дошкольного учреждения выделителей энтеровирусов не было выявлено. В пробах питьевой воды РНК энтеровирусов не обнаружено.

Положительные по ПЦР образцы были исследованы методом молекулярно-генетического типирования (секвенирования), установленные 4 нуклеотидные последовательности от 3 больных и 1 контактного ребенка, при сравнительном анализе в программе BLAST идентифицированы как энтеровирусы ЕСНО 6. Полученные нуклеотидные последовательности по данным GenBank оказались наиболее близки штаммам, которые были выделены в Екатеринбурге в 2006 г. (92%), в Нижнем Новгороде в 2011 г., во Франции в 2011 г., в Финляндии в 2007 и 2005 гг. и в Белоруссии в 2007 году.

Затем в вирусологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Хабаровском крае» из положительных по ПЦР образцов на культуре ткани RD были выделены 14 штаммов энтеровирусов (от 10 больных и 6 контактных), которые при идентификации в реакциях нейтрализации определены как энтеровирусы ЕСНО 6.

Для локализации и ликвидации вспышки были проведены санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия:

- эпидемиологическое расследование групповой заболеваемости;
- отбор проб от больных и контактных, проб из внешней среды для лабораторных исследований.
- активное выявление больных при подворном обходе населения в поселке Усть-Уркима;

- приостановлена деятельность детского учреждения;
- организована санитарная очистка территории поселка;
- экстренная профилактика противовирусными препаратами и иммуномодуляторами среди населения поселка – всех детей до 14 лет, взрослых в очагах энтеровирусной инфекции;
- дезинфекция емкостей для перевозки и хранения воды.

Таким образом, вспышка в поселке Усть-Уркима Тындинского района Амурской области протекала в двух формах: серозно-вирусный менингит и (катаральная) респираторная форма. Реализации групповой заболеваемости способствовали нарушения санитарно-эпидемиологических требований, а также тесный бытовой контакт в детском дошкольном учреждении и в семьях. Этиологическим агентом, который был установлен молекулярно-генетическим и вирусологическим методами, явился штамм ЕСНО 6. В результате проведенных санитарно-противоэпидемических мероприятий вспышка была локализована и полностью ликвидирована 22. 05.2013 года.

УДК 576.8:616-074

### **СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ПРИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ ТУЛЯРЕМИИ В ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ СТЕПНОГО ТИПА**

*О.А. Гнусарева, Н.С. Царева, Т.И. Рыбалко, А.А. Зайцев*

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»,  
г. Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** Предложен алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей (ИК) на туляремию, включающий проведение первичного скрининга суспензий клещей путем постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и системы серологических реакций РНГА-РНАт. Специфичность иммунодиагностики обеспечивается обработкой проб при температуре 95 °С в течение 20 мин в присутствии 2 % формалина. В случае одновременного обнаружения в пулах ИК видоспецифических фрагментов ДНК и антигена туляремийного микроба их обязательно исследуют биологическим методом для выделения возбудителя с высокой степенью вероятности.

**Ключевые слова:** возбудитель туляремии, лабораторная диагностика, иксодовые клещи, природный очаг туляремии степного типа

В 2012 г. на территории природного очага туляремии степного типа Ставропольского края исследовано 10312 экземпляров (экз.) кровососущих эктопаразитов (КЭ), объединенных в 1267 пулов, а из объектов внешней среды - 124 погадки хищных птиц (ПХП). Все пробы были изучены с помощью тест - системы для ПЦР «*Francisella tularensis multiplex-Eph*», разработанной в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, которая представляет собой набор в формате мультиплекс с амплификацией в одной пробирке трех ДНК- мишеней: *IS2*, *23 kDa*, *fopA*. Продуктами реакции являются ампликоны с размерами соответственно: 208 п.н., 349 п.н., 500 п.н. Чувствительность ее не менее  $1 \times 10^3$  м.к./мл [1]. Параллельно полевой материал изучен с помощью моноплексной ПЦР тест - системы «Ген *Francisella tularensis*-РЭФ», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Погодки дополнительно исследованы в РНГА-РНАт [3,4], а КЭ - иммунологическим и биологическим (бактериологическим) методами [3,4].

Для исследования КЭ к пулам добавляли 2,0 - 2,5 мл 0,9 % стерильного раствора натрия хлорида, после чего гомогенизировали. Наконечником с фильтром переносили 1,0 - 1,2 мл гомогенизированной пробы в микроцентрифужную пробирку. Отобранный материал делили на 2 части по 0,5-0,6 мл. Одну часть оставляли в холодильнике на 1-3 дня при 4-6 °С, пока не будет проведено исследование другого остатка пробы в ПЦР и РНГА-РНАт. Для более продолжительного хранения остаток пробы для бактериологического исследования замораживали при температуре минус 20 °С. Отобранный для первичного скрининга материал переносили наконечником с фильтром в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин для осветления пробы. Супернатант делили на две части. Одну часть (300 мкл) исследовали в РНГА-РНАт, а другую (100 – 200 мкл) – в ПЦР.

Перед постановкой РНГА-РНАт 100 - 300 мкл осветленной пробы переносили в пробирку с завинчивающейся крышкой, добавляли - равный объем 4 % -ного формалина на забуференном физиологическом растворе (ЗФР) pH 7,2, и выдерживали при температуре 95 °С в течение 20 мин. После отстаивания в течение 2 ч при комнатной температуре, обеззараженную и осветленную суспензию КЭ исследовали на наличие антигена.

После первичного скрининга, в зависимости от полученных результатов, пулы ИК дополнительно группировали для постановки биологического метода (БМ) или - прямого посева. Материал из пулов ИК с положительными результатами одновременно в ПЦР и РНГА-РНАт исследовали индивидуально биологическим и бактериологическим методами. Для постановки индивидуальной биопробы 0,4 мл взвеси оставленного нативного материала набирали в шприц через небольшой кусочек стерильной ваты и вводили по 0,2 мл 2 белым мышам под кожу паховой области правой ноги.

Пулы ИК, в которых не была обнаружена ДНК туляремийного микроба в ПЦР или обнаружена ДНК, но не выявлен антиген, исследовали индивидуально или группировали из расчета по 0,1 мл нативного материала из каждого пула, но не более 50 экз. ИК на одну биопробу. Для постановки БМ суспензии ИК из 2-10 пулов набирали в шприц через небольшой кусочек стерильной ваты и вводили по 0,2 мл -1,0 мл белой мыши под кожу паховой области правой ноги.

В период весеннего эпизоотологического мониторинга 2012 г. на территориях Грачевского, Андроповского, Изобильненского, Красногвардейского, Шпаковского и Предгорного районов Ставропольского края в 11 пулах иксодовых клещей обнаружены фрагменты ДНК туляремийного микроба. Результаты, полученные с помощью обеих ПЦР тест-систем, совпали.

В пулах *Dermacentor marginatus*, собранных на флаг в Грачевском районе в 6 км западнее с. Красное 06.04.2012 г. и - *D. marginatus*, собранных на флаг в Андроповском районе на территории лесополосы около ст. Дубовая балка 19.04.2012 г. был обнаружен туляремийный антиген, а биологическим методом из них выделен возбудитель туляремии. Оба штамма идентифицированы как *Francisella tularensis holarctica*, biovar II.

Определение генотипа проводили по методу Farlow J. et al. [5]. Установлено, что выделенные штаммы имеют разные генотипы. Штамм *F.tularensis* № 373 из Грачевского района имел генотип 13, а штамм *F.tularensis* № 407 из Андроповского района - генотип 2. С аналогичным генотипом в Грачевском районе нами был выделен от иксодовых клещей в 2010 г.

При исследовании погодок хищных птиц параллельно в ПЦР и РНГА - РНАт не удалось обнаружить туляремийный антиген или фрагменты ДНК.

Всего на территории природного очага туляремии степного типа Ставропольского края было исследовано методом ПЦР, РНГА-РНАт и БМ на туляремию 10312 экземпляров кровососущих эктопаразитов. Из них 1821 экз. в Андроповском районе, где преобладали иксодовые клещи *D. marginatus* – 1362 экз. и *D. reticulatus* – 406 экз., обнаружено 2 пула *D. marginatus* с положительным результатом ПЦР, а из одного из них выделен возбудитель туляремии; - 2713 экз. в Изобильненском районе, где преобладали иксодовые клещи *D. marginatus* – 579 экз. и *D. reticulatus* – 2065 экз., обнаружено 2 пула *D. marginatus* с положительными результатами ПЦР; - 1194 экз. в Шпаковском районе, где преобладали иксодовые клещи *D. marginatus* – 484 экз. и *D. reticulatus* – 549 экз., обнаружены 1 пул *D. marginatus* и 1 пул *D. reticulatus* с положительными результатами ПЦР; - 453 экз. в Красногвардейском районе, где преобладали иксодовые клещи *D. marginatus* – 323 экз. и *D. reticulatus* – 128 экз., обнаружены 2 пула *D. marginatus* с положительными результатами ПЦР; - 847 экз. в Предгорном районе, где преобладали иксодовые клещи *D. marginatus* – 321 экз. и *D. reticulatus* – 476 экз., обнаружено 2 пула *D. marginatus* с положительными результатами ПЦР. Напротив в Грачевском районе, где иксодовые клещи *D. marginatus* – 130 экз. и *D. reticulatus* – 42 экз. из общего количества 498 экз. занимали по численности соответственно 2 и 3 место, обнаружен 1 пул *D. marginatus* с положительным результатом ПЦР, из которого выделен возбудитель туляремии.

Не были обнаружены видоспецифические фрагменты ДНК туляремийного микроба в иксодовых клещах на территории Новоалександровского района, хотя там преобладали клещи *D. marginatus* – 27 экз. и *D. reticulatus* – 46 экз., но их сборы были малочисленны. Отрицательные результаты ПЦР получены при исследовании сборов клещей на территориях Нефтекумского, Апанасенковского, Ипатовского, Петровского, Левокумского и Труновского районов, где доминировали клещи других видов.

Таким образом, основными переносчиками туляремии в природном очаге степного типа на территории Ставропольского края в период 2012 г. были иксодовые клещи видов: *D. marginatus* и *D. reticulatus*. Только в этих видах обнаружены фрагменты ДНК туляремийного микроба, его антиген и сам возбудитель. Важная роль этим видам ИК принадлежала и ранее [2]. Но прямой зависимости выделения культур от количества *D. marginatus* и *D. reticulatus* в пулах не выявлено.

Применение ПЦР при эпизоотологическом мониторинге туляремии позволяет повысить достоверность лабораторной диагностики. Тест-система для ПЦР в формате мультиплекс «*Francisella tularensis multiplex-Eph*», разработанная в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, не уступает по чувствительности и специфичности моноплексной ПЦР тест-системе «Ген *Francisella tularensis*- РЭФ», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Использование ПЦР и РНГА-РНАт для проведения первичного скрининга суспензий эктопаразитов позволяет сократить объем постановки биопроб за счет максимального объединения пулов в пробу для биологического метода и сконцентрировать внимание на исследовании пулов, содержащих ДНК и антиген туляремийного микроба. Такая тактика позволила выделить 2 штамма возбудителя туляремии в период эпизоотологического мониторинга в 2012 г.

Выделение культур туляремии на территории природного очага степного типа в Ставропольском крае убедительно свидетельствует о непрекращающемся эпизоотологическом процессе и активности природного очага. В то же время изоляция единичных штаммов на фоне значительного количества отрицательных результатов лабораторной диагностики, свидетельствует о протекании локальных эпизоотий. В связи с тем, что выделенные весной 2012 г. культуры туляремии имеют разный генотип, можно утверждать о существовании отдельных микроочагов на территориях Андроповского и Грачевского районов Ставропольского края.

## Литература:

1. Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Солодовников Б.В., Царева Н.С., Остапович В.В., Куличенко А.Н. Алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей на туляремию // Пробл. особо опасных инф. 2012; 3(113):79-81.
2. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Эпизоотология (природная очаговость) туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 136-206.
3. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУ 4.2.2939-11. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2012. 59 с.
4. Эпидемиологический надзор за туляремией. МУ 3.1.2007-05. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2005. 24 с.
5. Farlow, J. Francisella tularensis strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis / K. L. Smith, J. Wong, M. Abrams, M. Lytle, and P. Keim // J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3186-3192.

УДК 616.981.42

## ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БРУЦЕЛЛ

*С.И. Головнева, Г.И. Лямкин, Л.С. Катунина, А.А. Курилова*

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
г.Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** Разработана рецептура плотной питательной среды для культивирования бруцеллезного микроба с использованием в качестве питательной основы вторичного продукта (отхода) свеклосахарного производства – патоки рафинадной. Приведены результаты тестирования питательной среды по биологическим показателям в сравнении с коммерческой питательной средой для выделения и культивирования бруцелл (эритрит-агаром) производства НПО «Питательные среды» (г. Махачкала).

**Ключевые слова:** бруцеллез, бруцеллы, питательная среда, культивирование

Бруцеллез – острое инфекционно-аллергическое, зоонозное заболевание с высокой потенциальной возможностью перехода в хроническую форму с нередкой последующей инвалидностью больного [3].

Диагноз бруцеллеза у людей устанавливается при наличии клинических проявлений, эпидемиологического анамнеза, положительных данных лабораторных исследований. Среди лабораторных методов диагностики бруцеллеза наиболее точным является бактериологический, так как только выделение культуры бруцелл служит достоверным доказательством бруцеллезной инфекции.

Для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза используются следующие среды: сывороточно-декстрозный агар, агар из картофельного настоя с сывороткой, кровяной агар, Альбими-агар, среда «Д», печеночные и мясопептонные агары и бульоны, эритрит агар и др. [3,4].

Следует отметить, что перечисленные среды имеют высокую себестоимость из-за дороговизны входящих в их состав продуктов животного происхождения (основой большинства из них являются гидролизаты казеина, мяса крупного рогатого скота и рыбопродуктов), а использование крови связано с определенными трудностями. В связи с изложенным, нами проведены

исследования по получению питательных основ и питательных сред для культивирования бруцеллезного микроба из непивевого растительного сыра.

В результате проведенных исследований нами разработана рецептура плотной питательной среды, содержащей, (г/л): патоку рафинадную – 20,0, дрожжевой экстракт – 5,0, натрия хлорид – 5,0, натрий фосфорнокислый двузамещенный – 4,0, натрия метабисульфит – 0,3, агар микробиологический – 2,0, воду питьевую – до литра.

Выбор патоки рафинадной (мелассы свекловичной) в качестве сырья для приготовления плотных питательных сред основывался на данных о ее определенной биологической ценности, состоящей в наличии аминокислот, витаминов и микроэлементов [1].

Способ приготовления питательной основы предлагаемой среды для культивирования бруцеллезного микроба заключается в следующем: патоку рафинадную (ГОСТ Р 52304-2005) растворяют в питьевой воде (ГОСТ 51232-98), добавляют хлорид натрия, натрий фосфорнокислый двузамещенный, дрожжевой экстракт, нагревают до кипения, доводят рН до  $7,2 \pm 0,1$  гидроокисью натрия 20%. Осадок фильтруют через тканевый фильтр с фильтровальной бумагой. В фильтрат добавляют агар микробиологический, варят в течение  $10 \pm 1$  мин до полного его растворения. Корректируют рН до  $7,2 \pm 0,1$ , добавляют метабисульфит натрия. Готовую среду разливают по  $400 \pm 0,1$  мл в стерильные градуированные флаконы, закупоривают стерильными резиновыми пробками, накрывают алюминиевыми колпачками, вальцуют, стерилизуют при 1 атм. 30 мин.

Контроль предлагаемой среды по биологическим показателям проводили с помощью тест-штаммов *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 и *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19 ВА, *B. suis* 61 в соответствии с методическими указаниями «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [2].

Было установлено, что по показателям чувствительности, прорастания, скорости роста разработанная среда не уступала контрольной (эритрит-агар) в отношении всех использованных в работе тест-штаммов (Таблица 1).

Таблица 1 – Биологические свойства питательной среды на основе патоки рафинадной

Тест-штаммы	Чувствительность, м.к.		Количество выросших колоний				Показатель прорастания при посеве 100 м.к., %	Скорость роста, ч	
			при посеве 10 м.к., (X±m)		при посеве 100 м.к., (X±m)				
	О	К	О	К	О	К	О	К	
<i>B. melitensis</i> 16 М	10,0	10,0	18±1,4	17±0,9	160±1,5	158±2,3	101,0±1,9	72	72
<i>B. abortus</i> 544	10,0	10,0	14±0,6	11±0,1	117±1,4	104±0,5	112,0±1,0	72	72
<i>B. suis</i> 1330	10,0	10,0	10±0,2	12±1,3	134±1,2	137±1,8	98,0±1,5	72	72
<i>B. melitensis</i> Rev-1,	10,0	10,0	15±0,9	14±0,7	164±2,7	160±4,2	102,0±3,5	72	72
<i>B. abortus</i> 19	10,0	10,0	10±0,8	11±0,1	122±1,2	124±1,4	98,0±1,3	72	72
<i>B. suis</i> 61	10,0	10,0	10±0,9	10±0,7	106±0,8	106±0,9	100,0±0,8	72	72

Примечание: X±m – число выросших колоний; где m – величина ошибки средней арифметической;

О – опытная среда;

К – контрольная среда.



Предлагаемая питательная среда проста в приготовлении (отсутствует этап предварительной подготовки основы), имеет более низкую себестоимость, так как в основу берется дешевое растительное сырье (отход свеклосахарного производства). Рецептура питательной среды защищена патентом Российской Федерации на изобретение № 2299238 «Питательная среда для культивирования бруцелл».

Таким образом, разработанная питательная среда на основе патоки рафинадной может адекватно заменить эритрит-агар.

#### Литература:

1. Болотов, Н.А. Производство хлебопекарных дрожжей /Н.А. Болотов, Е.Д. Фараджаева. - М.: Профессия, 2002. – 167 с.
2. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза: метод. указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 35 с.
3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М., 2009. – 472 с.
4. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: Методические указания. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 59 с.

УДК 616.932:616-074

### MALDI МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ЭЛЬТОР

*Е.В. Гончаренко, Н.Р. Телесманич, С.О. Сеина, В.В. Агафонова*

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
г.Ростов-на-Дону, Россия*

**Аннотация.** Возможности прямого белкового профилирования могут распространяться значительно шире, чем идентификация микроорганизмов бактериального и грибкового происхождения. Измерение стабильного спектра белкового объекта и его деградация может сослужить прекрасную службу в изучении вирусов бактерий (фагов) и их взаимоотношений с бактериальной клеткой, этому и было посвящено одно из направлений изучения возможностей применения масс-спектрометрического анализа

**Ключевые слова:** MALDI масс-спектрометрическое профилирование, протеомный профиль, Biotyper, MSP – peak list, *Vibrio cholerae eltor*, бактериофаг диагностический холерный эльтор.

Среди бактериальных инфекций в мире самое широкое распространение в настоящее время имеет холера. Этому способствовала седьмая пандемия, когда холера вышла за пределы своих исторических очагов в Индии, поразив многие страны мира. Эпидемиологическая обстановка по холере в современный период продолжает оставаться неблагоприятной и напряженной. Одним из важнейших мероприятий в системе эпиднадзора за холерой является постоянный мониторинг окружающей среды на контаминацию холерными вибрионами [1]. Немаловажную роль в изменчивости и выживаемости холерных вибрионов в водоемах играют фаги [2]. Бактериофаги являются постоянным спутником патогенных вибрионов,

а их присутствие в клетках бактерий приводит к появлению новых свойств [3] и обеспечивает эволюционную приспособляемость микроорганизмов к меняющимся условиям окружающей среды за счет переноса генетического материала. Обнаружение холерных бактериофагов является мерой дополнительного контроля природной среды [4]. Трудности широкого применения бактериофагов в качестве диагностических препаратов, в основном, связаны с проблемой формирования фагорезистентности микроорганизмов. С научной точки зрения проблема расшифровки механизмов фагорезистентности, с которой сталкиваются исследователи в последние двадцать лет, при оценке эпидзначимости не утратила своей актуальности [5]. Одним из возможных методов изучения образования фагорезистентности является изучение углевод-специфических рецепторов фагов, участвующих во взаимодействии с поверхностными структурами клеток-мишеней холерного вибриона. Проведение таких исследований помогло бы изучить новые стороны во взаимодействии фаг-бактерия. Детальное изучение механизмов взаимоотношения бактериофагов с клеткой хозяина имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение.

Целью данной работы явилось изучение роли углевод-специфических рецепторов бактериофага эльтор во взаимодействии с чувствительным к нему штаммом *V.cholerae* eltor 18507 с помощью прямого белкового профилирования, идентификация константных и переменных белков, участвующих во взаимодействии фага и клетки.

Бактериофаг диагностический холерный эльтор представляет собой стерильный фильтрат фаголизатов бульонных культур холерных вибрионов, содержащий взвесь частиц фагов эльтор.

Методикой прямого МАЛДИ масс-спектрометрического профилирования были исследованы профили бактериофага эльтор, фага провзаимодействовавшего с культурой холерного вибриона, а также исследовано изменение данного профиля при инкубации с сахарозой.

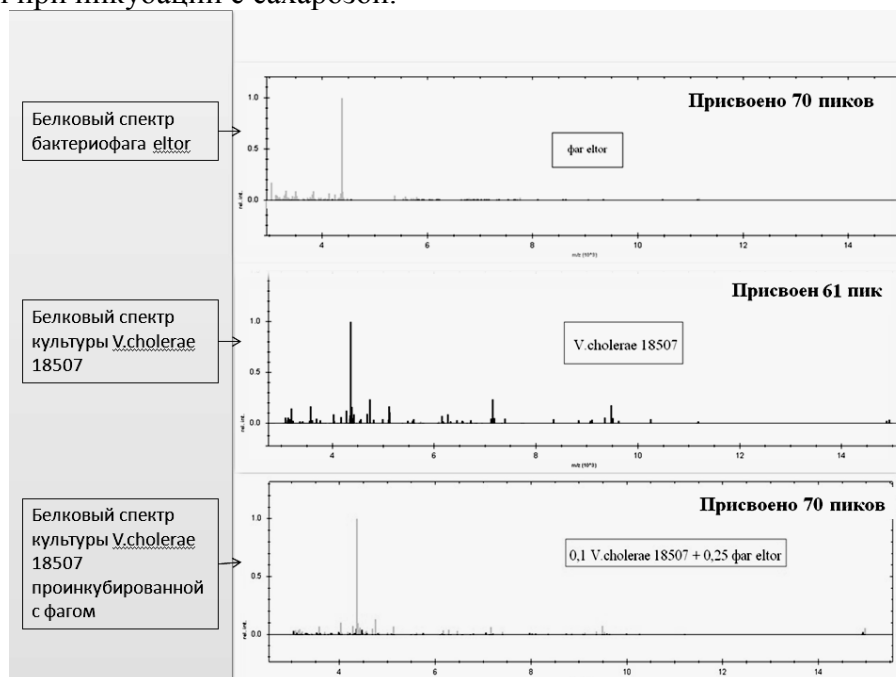


Рис.1 Основные спектры бактериофага и холерного вибриона

При изучении основных спектров исследуемых объектов было выяснено, что масс-спектры фага eltor содержали 70 пиков, культуре *V.cholerae* 18507 был присвоен 61 пик. У проинкубированной смеси фага с холерным вибрионом

сохранялось 70 пиков (рис.1). MALDI масс-спектрометрическое профилирование бактериофага эльтор показало, что у данного фага можно выделить из всех 70 пиков один доминантный, с молекулярной массой 4373 Да, характеризующийся 100% интенсивностью. В то время как интенсивность остальных пиков фага составила 1 – 20 %. Это свидетельствует о том, что комплекс белков с молекулярной массой 4373 Да является основным для фага. При сравнительном анализе протеомных профилей исследуемых образцов было выяснено, что основной спектр холерного вибриона при инкубации с фагом имел практически аналогичную картину с исходным образцом *V.cholerae*. Молекулярная масса доминантного пика белкового спектра смеси составила 4367,2 Да (100% интенсивность). Все основные пики сохранились, но снизилась их интенсивность. И появились новые пики с очень низкой интенсивностью.

При постановке пробы с фагом двухслойным методом на чашках нами было установлено, что сахароза ингибирует литическую активность бактериофага. Фаг, проинкубированный с сахарозой, по сравнению с контролем не давал сплошной зоны лизиса в месте нанесения. Образовывались лишь единичные негативные колонии.

Фаг эльтор был нами внесен в базу данных, в дальнейшем данный фаг был идентифицирован программой Biotyper с высоким показателем Score 2,845. В то время как фаг проинкубированный с сахарозой при сравнении с фагом внесенным в базу данных выдавался с более низким показателем Score, равным 0,973.

Проведя сравнительный анализ основного спектра фага эльтор и проинкубированного с сахарозой фага (рис.2) было выяснено, что при взаимодействии сахарозы с фагом происходит ингибирование основных белков (с массой 4373 Да). И в процессе каскада реакций взаимодействия образуется большое количество новых белков с невысокой интенсивностью (в диапазоне 7000-14500) и возрастает интенсивность (количество белка) уже имеющихся белков в диапазоне от 3 до 4,5 тысяч Да. При инкубации исследуемого штамма *V.cholerae* 18507 с 1% сахарозой (1час) не наблюдалось значимого изменения картины основного спектра. Таким образом, можно предположить, что сахароза в смеси культура-фаг вступает во взаимодействие именно с белковыми рецепторами фага, блокируя специфичные к холерному вибриону рецепторы, что в дальнейшем проявляется в резком снижении активности фага по отношению к чувствительному штамму. Что было нами показано ранее в микробиологических опытах.

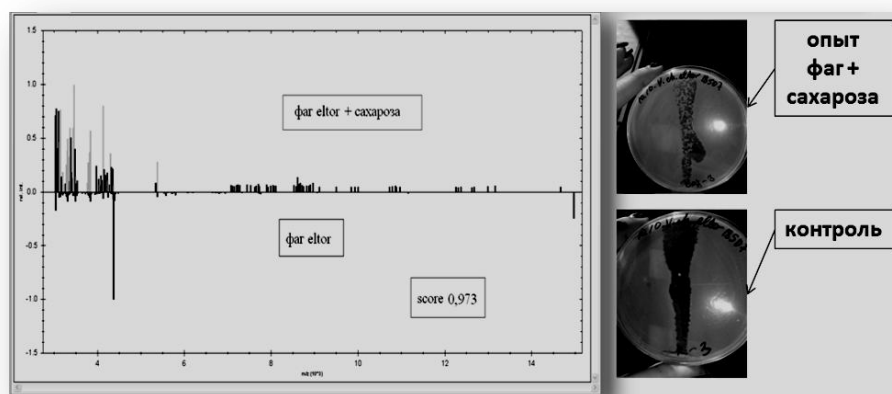


Рис.2 Сравнительный анализ основного спектра фага эльтор и проинкубированного с сахарозой фага эльтор

Программа Biotyper позволяет провести оценку молекулярных масс, выдавая информацию об основных спектрах изучаемого объекта в виде таблицы MSP – peaklist. Масс-спектр, состоящий из пиков разной интенсивности, является графическим отображением масс-пик листа (MSP Peaklist), который представляет собой таблицу всех молекулярных масс полученных профилей каждого изучаемого объекта.

Были проанализированы полученные нами данные MSP-peaklist бактериофага, холерного вибриона и проинкубированной смеси. Далее определялись принадлежности каждого пика либо спектру культуры, либо спектру фага, а также новые спектры, возникающие при взаимодействии фага с культурой и при добавлении сахарозы.

Анализируя пики при помощи MSP-peaklist видно, что у фага эльтор 6 пиков, которые при инкубировании с культурой холерного вибриона не исчезают (3116,6; 3213,5; 33316; 3834,9; 3983,2 и 6194,8±1,5). Однако при добавлении сахарозы пик белкового спектра с молекулярной массой 6149,8 Да исчезает. Таким образом, у фага эльтор выявлено 5 константных белков и один переменный.

Аналогичным образом мы сравнили протеомный профиль *V.cholerae* 18507 до и после инкубирования с фагом. Нами выявлено, что после инкубации сохраняется 33 пика из 61, которые при добавлении сахарозы также остаются константными, помимо одного переменного.

Помимо константных и переменных белков, были выявлены пики, появляющиеся при совместном инкубировании фага с микроорганизмом, которых не было ни у фага, ни у культуры до инкубирования. Таковых оказалось 31 пик. Однако в присутствии сахарозы эти пики (белки) вели себя по-разному. 8 пиков исчезает из таблицы, однако 23 пика остаются неизменными, и при этом появляется 10 спектров с совершенно новыми значениями масс.

Изучение механизмов фагорезистентности имеет важное научно-прикладное значение. В результате проведенных исследований было выяснено, что при инкубации штамма холерного вибриона эльтор с бактериофагом холерным эльтор в присутствии сахарозы наблюдается ингибирование доминантного по интенсивности пика фага. Что, по всей видимости, свидетельствует о том, что рецепторы фага специфичные сахарозе участвуют в механизме взаимодействия с микробной клеткой холерного вибриона. Также были изучены протеомные профили исследуемых образцов и проведена их сравнительная характеристика. Были выявлены основные, константные и переменные белки, участвующих в процессе взаимодействия фаг-клетка посредством MALDI масс-спектрометрии.

#### **Литература:**

1. Ю.М. Ломов. Холера как постоянная угроза эпидемических осложнений//«Холера и патогенные для человека вибрионы»:Матер.пробл.комиссии.-Ростов-на-Дону,2008.-вып.№21.-С.8-13.
2. И.Т. Андрусенко, Э.А. Москвитина, И.Д. Бардых. Факторы, способствующие выживанию холерных вибрионов в окружающей среде //«Холера и патогенные для человека вибрионы»:Матер.пробл.комиссии.-Ростов-на-Дону,2008.- Вып.№21.-С.49-52.
3. Н.М. Остроумова, А.Ф. Мельникова, С.П. Царева //Проблемы ООИ - Саратов, 1971 - Вып.6 - с.4-10
4. Ю.М. Ломов, Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина, С.Р. Саямов, Н.Е. Гаевская. Применение набора индикаторных штаммов для выделения бактериофагов холерных вибрионов из водных объектов окружающей среды

г.Ростова-на-Дону//«Холера и патогенные для человека вибрионы»:Матер.пробл.комиссии.-Ростов-на-Дону,2008.- Вып.№21.-С.91-93.  
5. Н.Р. Телесманич. Лабораторная диагностика холеры (проблемы и пути усовершенствования)//«Холера и патогенные для человека вибрионы»:Матер.пробл.комиссии.-Ростов-на-Дону,2008.- Вып.№21.-С.18-24.

УДК 615.371

## **РАЗРАБОТКА БЕЗОПАСНЫХ ПРОТИВООСПЕННЫХ ВАКЦИН И СХЕМ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

*Д.О. Горбатовская\*, Е.В. Шевцова\*, А.А. Сергеев\*, О.С. Таранов\*,  
В.В. Омигов\*, И.В. Колосова\*, С.Н. Якубицкий\*, Р.А. Максютков\*,  
С.Н. Щелкунов\*, В.Н. Подкуйко\*\*, А.П. Пирожков\*\*, А.В. Ковальчук\*\*,  
С.В. Борисевич\*\*, А.Н. Сергеев\*\**

*\*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор»*

*п. Кольцово. Новосибирской обл., Россия*

*\*\*ФКУЗ «Центральный научно-исследовательский испытательный институт  
МО РФ»*

*г. Сергиев Посад, Россия*

**Аннотация.** Угроза возникновения натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций предполагает разработку безопасных и эффективных вакцинных препаратов для массового их использования. Существующие противооспенные вакцины с учетом вероятности развития поствакцинальных осложнений не могут быть применены для массовой вакцинации населения. В данной работе проведено изучение влияния генетических модификаций и противовирусных препаратов на вирулентные свойства штаммов вируса осповакцины (ВОВ). Установили, что штаммы ВОВ, несущие делеции в генах вирулентности, а также некоторые противовирусные препараты существенно снижают воспалительно-некротическую активность ВОВ.  
**Ключевые слова:** ортопоксвирус, вирус осповакцины, первичное оспопрививание, вирус натуральной оспы, поствакцинальное осложнение, противовирусный препарат, иммуномодулирующий препарат, генетически модифицированный штамм.

Прекращение программы глобальной вакцинации населения против натуральной оспы привело к тому, что большая часть населения планеты в настоящее время не имеет противооспенного иммунитета. Данная ситуация создает серьезную обеспокоенность у экспертов, полагающих, что вирус натуральной оспы может быть использован в качестве биологического оружия в террористических целях. Кроме того, существует предположение, что вирус натуральной оспы может тайно храниться в лабораториях стран, поддерживающих террористические организации [2]. По мнению ученых, эпидемиологическую опасность также может представлять вирус оспы обезьян. В ряде стран Африки периодически происходят вспышки оспы обезьян. В связи с растущим мировым рынком и транспортным сообщением между странами возрастает риск завоза этого заболевания в другие страны. Так, в США в 2003 году в результате случайного завоза вируса оспы обезьян с инфицированными экзотическими животными из Западной Африки произошла вспышка оспы

обезьян среди жителей штата Висконсин. Заражение произошло от больных оспой обезьян луговых собачек, приобретенных в качестве домашних питомцев, которые оказались чувствительными к данному вирусу [4]. В дополнение к выше изложенным фактам, в Европе периодически возникают случаи заражения людей оспой коров от ручных крыс [3].

Известно, что единственным проверенным и эффективным способом защиты людей от натуральной оспы и других ортопоксвируных инфекций является вакцинопрофилактика. Используемые в России противооспенные вакцины, как для накожного, так и для перорального введения, обладают существенным недостатком, вызывая в ряде случаев развитие нежелательных поствакцинальных реакций и осложнений, особенно у лиц с ослабленной иммунной системой. Развитие подобных реакций и осложнений обусловлено наличием патогенного потенциала у штаммов вируса осповакцины, входящих в состав данных препаратов. Использование таких вакцин, а также традиционных схем их применения для массовой вакцинопрофилактики в случае эпидемиологической необходимости крайне нежелательно [5].

В связи с этим целью работы являлось изучение влияния генетических модификаций и противовирусных и иммуномодулирующих препаратов на вирулентные свойства штаммов вируса осповакцины (ВОВ) для разработки безопасного первичного оспопрививания.

#### **Материалы и методы.**

*Вирус.* В работе использовали следующие штаммы вируса осповакцины: нейровирулентный для кроликов штамм НВ-92 ВОВ; вирулентный для морских свинок штамм GPA ВОВ; штамм b7,5S2s ВОВ, несущий встройку фрагмента preS2S области генома вируса гепатита В в гене тимидинкиназы ВОВ; штамм Л-ИВП, входящий в состав традиционной живой накожной противооспенной вакцины (пр-ва НПО Микроген) и штамм Б-51, входящий в состав таблетированной противооспенной вакцины ТЭОВак (НИЦ «33 ЦНИИИ МО РФ»). Все штаммы ВОВ получены из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Делецию генов ВОВ проводили при использовании клонового варианта штамма Л-ИВП ВОВ. Было разработано 3 генетически измененных варианта штамма Л-ИВП вируса осповакцины, с делециями в 2-х (B8R; C3L), 3-х (A56R; B8R; C3L) и 4-х (A56R; B8R; C3L; NIL) генах вирулентности ВОВ.

*Животные.* Использовали белых разнополых мышей линии ICR, разнополых морских свинок и разнополых кроликов породы шиншилла. Все животные были получены из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». Животных содержали с соблюдением требований ветеринарного законодательства РФ.

*Культура клеток.* В работе использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор».

*Препараты.* В исследовании использовали следующие зарегистрированные в РФ коммерческие препараты: Ингавирин, Арбидол, Амиксин, Реаферон-ЕС-липид, Рибомунил, Ликопид, Иммунал, Имудон, ТЭОВак. Кроме того, исследовали следующие не зарегистрированные в РФ препараты: Метисазон, НИОХ-14 и лошадиный противооспенный иммуноглобулин.

*Методы.* Оценку купирования патогенных свойств вируса вакцины с помощью препаратов у животных проводили на основе данных выживаемости в сравнении с группой контроля. Оценку иммуногенных свойств штаммов ВОВ и схем их применения с противовирусными и иммуномодулирующими препаратами проводили на основе значений уровней накопления противооспенных антител в сыворотке крови иммунизированных животных, а также при определении % сероконверсии в группах вакцинированных животных.

*Сравнение данных.* Анализ полученных данных проводили при использовании общепринятых статистических методов оценки на 95% уровне значимости [1].

**Результаты исследований.** Исследования воспалительно-некротической активности штаммов вируса осповакцины с использованием морских свинок показали, что генетически модифицированные штаммы по мере увеличения числа делеций снижают воспалительно-некротическую активность относительно дикого штамма-предшественника Л-ИВП. Наиболее низкая воспалительно-некротическая реакция наблюдается у штамма с делециями в 4-х генах патогенности вируса осповакцины и штамма b7,5S2s, имеющего встройку фрагмента генома вируса гепатита В, в результате которой была утрачена функция гена тимидинкиназы ВОВ. У кроликов воспалительная активность в ответ на внутрикожное введение всех штаммов вируса осповакцины достоверно не отличалась между собой, в то же время так же, как и у морских свинок, наблюдалось достоверное снижение некротической активности у штамма с делециями в 4-х генах патогенности вируса осповакцины и штамма b7,5S2s ВОВ. Сохранение воспалительной реакции у штамма с делециями в 4-х генах патогенности вируса осповакцины и штамма b7,5S2s ВОВ в сочетании со снижением некротической активности является дополнительным преимуществом с точки зрения разработки безопасных и эффективных противооспенных вакцин, так как воспаление является важным звеном в формировании гуморального и клеточного противооспенного иммунитета.

По результатам исследований на мышах установили, что препараты Ликопид и НИОХ-14, а также введение штамма вируса вакцины Б-51 за 2, 4, 8, 16 суток до инфицирования штаммом НВ-92 ВОВ значимо защищали мышей от летальной инфекции ( $p < 0,05$ ). Также определили, что совместное применение со штаммом Б-51 ВОВ в описанных схемах следующих препаратов: Рибомунил, Иммудон, Ингавирин и НИОХ-14 значимо повышало уровень накопления противооспенных антител по сравнению с контролем. Кроме того, препараты Рибомунил, Иммудон, Ингавирин достоверно влияли на увеличение % сероконверсии у мышей в сравнении с контролем. Как показали исследования, другие препараты значимо не влияли на иммуногенность штамма Б-51 в организме мышей.

В результате применения описанных препаратов у морских свинок, иммунизированных штаммом Б-51 ВОВ и через 7 суток инфицированных штаммом GPA ВОВ, установили, что применение препарата НИОХ-14 в день инфицирования и в течение двух суток после инфицирования достоверно снижает чувствительность морских свинок к штамму GPA ВОВ.

По результатам применения различных схем введения вакцины и препаратов у кроликов определили, что достоверно снижает чувствительность кроликов к штамму НВ-92 схема применения противооспенного иммуноглобулина, а также схема введения штамма Б-51 ВОВ за 2 или 4 суток до заражения штаммом НВ-92 ВОВ. Кроме того, наблюдается некоторая тенденция к снижению чувствительности кроликов к штамму НВ-92 ВОВ при использовании препаратов Ингавирин, Метисазон, Реаферон-ЕС-липид. Выбранные препараты не снижали иммуногенность применяемой вакцины.

Таким образом, установили, что штамм b7,5S2s за счет выключения гена тимидинкиназы существенно уменьшил свою воспалительную активность в сравнении с диким штаммом-предшественником Л-ИВП. Штамм с делециями в 4-х генах патогенности по некротической активности был сравним со штаммом b7,5S2s. Вероятно, что делеция в гене тимидинкиназы у штамма с делециями в 4-х генах патогенности позволит еще более эффективно снизить воспалительно-

некротическую активность штамма вируса осповакцины. Чувствительность интраназально инфицированных мышей, морских свинок и кроликов к вирулентным для них штаммам ВОВ достоверно снижают следующие препараты Ликопид, НИОХ-14, двукратные схемы иммунизации, а также применение лошадиного противооспенного иммуноглобулина. Ни один из использованных препаратов не влияет на иммуногенные свойства исследованных штаммов ВОВ.

#### **Литература:**

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика, 1976. – 598 с.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. // Вестник Российской Академии наук. – 2003. – Т. 73. – № 3 – С. 195-204.
3. Elsendoorn A., Agius G., Le Moal G. et al. Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat // Journal of Infection.- 2011.- Vol. 63, N 5.- P. 391–393.
4. Reed K.D., Melski J.W., Graham M.B., Regnery R.L., Sotir M.J., Wegner M.V., et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. // N Engl J Med. – 2004. - 350:342–50.
5. Verardi P.H., Titong A., C.J. Hagen. A vaccinia virus renaissance .New vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication // Hum Vaccin Immunother. – 2012. – P. 961–970

УДК 616.993:616-074

### **КОПРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОКАРОЗА**

*Д.А. Долбин, Ю.А. Тюрин*

*ФБУН Казанский НИИ Эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора  
г. Казань, Россия*

**Аннотация.** Ведущим в диагностике тканевого токсокароза способом диагностики является иммунологический. Существенное значение в постановке диагноза токсокароза имеет эпидемический анамнез. Нами предложен и проверен на практике гельминтовооскопический комбинированный метод диагностики токсокароза плотоядных, значительно превосходящий предложенные ранее.

**Ключевые слова:** токсокароз, гельминтовооскопия, комбинированные методы, флотация.

Прижизненный паразитологический диагноз токсокароза человека практически невозможен, поскольку обнаружить мигрирующие личинки трудно. Даже «самый надежный способ диагностики» – идентификация личинки по гистологическим срезам весьма неэффективен [1].

Существенное значение в постановке диагноза токсокароза имеет эпидемический анамнез. Указание на содержание в семье собак или тесный контакт с ними, геофагия свидетельствуют о высоком риске заражения токсокароза. При токсокарозе часто наблюдается аллергия на шерсть животных [1].

Надежного метода диагностики глазного токсокароза нет. Часто диагноз выясняется только при гистологическом исследовании. Дополнительными методами диагностики токсокароза являются ультразвуковые и рентгенографические исследования. Рекомендуется в сомнительных случаях ретинобластомы проводить серологическое исследование на токсокароз пунктата передней камеры глаза и биоптата стекловидного тела.



В связи с этим, как уже отмечено выше при диагностике токсокароза большую значимость имеют эпидпоказания.

В литературе для диагностики токсокароза собак рекомендуют (в том числе и современные зарубежные авторы) копроскопические методы, такие как флотационные методы Фюллеборна и Котельникова-Хренова [3].

Заметим, что оба этих метода относятся к группе флотационных методов, т. е. основанные на всплытии яиц гельминтов и ооцист простейших в насыщенных или высокой плотности растворах различных солей или других жидкостей, удельный вес которых выше, чем удельный вес яиц паразитов и ооцист кокцидий.

Эти методы наряду с простотой и известностью имеют и ряд неоднократно упоминаемых в литературе недостатков, таких как серьезные трудности при определении низкой степени инвазии. В настоящий момент времени приходится констатировать, что проблема эффективной прижизненной диагностики инвазии токсокарами собак является не решенной. Используемые же методы копроскопической диагностики можно уверенно отнести к морально устаревшим и не удовлетворяющим современным требованиям, как к диагностической эффективности, так и стандартизации и унификации процедур и оборудования, диктуемых научной и практической целесообразностью.

Наибольшего эффекта можно было бы ожидать от применения методов сочетающих седиментацию осадка с последующей флотацией яиц в растворах с высокой удельной плотностью [5], так называемые комбинированные методы). Но как неоднократно указывалось в литературе между количеством выявляемых яиц и плотностью растворов нет строгого соответствия. Кроме плотности, на эффективность диагностики влияет значительное количество других факторов. Среди них скорость кристаллизации раствора (один из главных недостатков всех однокомпонентных солевых флотационных растворов), большое количество детрита затрудняющего поиск при использовании очень плотных растворов и др. Выход можно найти в использовании флотационных растворов состоящих из нескольких ингредиентов, каждый из которых выполняет определенную функцию, замедляет время кристаллизации капли на предметном стекле, удешевляет стоимость проводимого анализа, увеличивает удельную плотность смеси и т. д.

К сожалению, хороший результат можно получить лишь, проведя довольно масштабную эмпирическую работу с целью усовершенствования копроскопической диагностики.

Разработанный нами несколько компонентный комбинированный метод выявления яиц токсокар в пробах фекалий собак позволял в 7 раз увеличить процент выявления оплодотворенных яиц по сравнению с альтернативным методом Фюллеборна, а также позволил выявлять неоплодотворенные яйца данных паразитов, что обычно чрезвычайно затруднительно при прочих гельминтоовоскопических методах.

Для гельминтоовоскопической диагностики кишечных гельминтозов плотоядных применяются следующие методы:

1. Метод Фюллеборна. Недостатком метода является то, что флотация яиц происходит длительно (40 – 60 минут) и метод является не достаточно эффективным.

2. Метод Котельникова–Хренова. Недостатком данного метода является сильная насыщенность флотационного раствора, вследствие чего происходит быстрая кристаллизация капель на предметном стекле, что препятствует исследованию материала и отрицательно сказывается на эффективности исследований.

В связи с этим был разработан более эффективный способ копроскопической диагностики гельминтозов плотоядных в целях определения истинной гельминтологической ситуации для проведения соответствующих лечебно-профилактических мероприятий в исследуемых объектах.

Способ диагностики гельминтозов плотоядных проводили по следующей схеме: вначале готовят комбинированную флотационную смесь из трех ингредиентов:

- 1) насыщенный раствор цинка хлорида (2 кг  $ZnCl_2$  на 1 л воды);
- 2) насыщенный раствор натрия хлорида (0,42 кг  $NaCl$  на 1 л воды);
- 3) сахара (1,67 кг на 1 л воды).

Далее эти три компонента смешивают в соотношении 1,75 : 1 : 1.

Пробу фекалий весом 3 – 5 г помещали в стакан, заливали небольшим количеством воды, тщательно размешивали до появления равномерной взвеси, затем добавляли еще 50 – 100 мл воды и процеживали через металлическое сито или марлю в сухой, чистый стакан. После 5 минутного отстаивания надосадочную жидкость сливали. На дне стакана оставляли такое количество взвеси, которое бы уместилось в центрифужную пробирку. Затем проводили 3-х минутное центрифугирование при 3000 g, после всю жидкость до осадка сливали, а к осадку добавляли трехкомпонентный флотационный раствор. Осадок взбалтывали до получения взвеси и снова центрифугировали 3 минуты при 1500 g. После металлической петлей снимали поверхностную пленку, переносят на предметное стекло и исследовали под микроскопом.

В МУ «СОБЖ» г. Казани (пункт приема и передержки безнадзорных животных) в летнее время проводили обследование собак и отбор проб кала (10 взрослых и 25 щенков) на инвазированность кишечными нематодами (*Toxocara canis* и *Toxoascaris leonine*).

Гельминтовооскопическое обследование проводили методами Фюллеборна и патентуемым методом. Исследования проводили на базе кафедры паразитологии и радиобиологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. Исследования проб фекалий по методу Фюллеборна проводили следующим образом: 3 г фекалий заливали небольшим количеством насыщенного раствора поваренной соли (в 1 л кипяченой воды растворяют 400 г соли), тщательно перемешивали, затем добавляли 50 – 100 мл этого раствора. Взвесь процеживали через металлическое сито или марлю в коническую колбу и оставляли для отстаивания. Через 30 – 45 мин. основная часть яиц в силу меньшего удельного веса по сравнению с насыщенным раствором поваренной соли всплывала на поверхность.

Приготовление флотационного раствора для патентуемого способа исследования проб фекалий: используется трехингредиентная флотационная смесь, включающая в себя насыщенные водные растворы хлористого цинка ( $ZnCl_2$ ,  $\rho - 1,82$ ), хлористого натрия ( $NaCl$ ,  $\rho - 1,19$ ) и сахарозы ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ,  $\rho - 1,28$ ) в соотношении 1,75 : 1 : 1 (объем / объем / объем). Удельный вес приготовленных флотационных растворов определяют с помощью денсиметра при  $t 25^{\circ}C$ .

Результаты исследований представлены в таблице 1.

В результате обследования разработанный способ позволил выявить почти на порядок большее количество яиц гельминтов. Этот метод показал 100%-ю инвазированность обследованных животных. Кроме того, патентуемый метод позволил выявить неоплодотворенные яйца *Toxoascaris leonine*. Метод Фюллеборна оказался гораздо менее эффективен.

Таблица 1 -Исследование проб фекалий собак, принадлежащих МУ «СОБЖ» г. Казани пос. «Мирный»

№ п/п	Группы животных	Количество яиц в 1 г фекалий	
		Фюллеборна	Авторский
1	1 группа	34± 1,5	203 ± 3,5
2	2 группа	45± 4,1	300 ± 10,5
3	3 группа	50 ± 2,5	315 ± 1,51
4	4 группа	75 ± 3,8	424 ± 11,7
5	5 группа	100 ± 7,55	185 ± 8,68
6	6 группа	56 ± 3,5	125 ± 5,2

Примечание: 1 – 5 группы – щенки;

6 – группа – взрослые собаки

Таким образом, разработанный нами способ диагностики гельминтозов у плотоядных обладает гораздо более выраженной диагностической эффективностью по сравнению с используемым аналогом (метод Фюллеборна).

#### Литература:

- 1) Поляков, В. Е. Гельминтозы у детей и подростков / В.Е. Поляков, А.Я. Лысенко // - М, «Медицина». – 2003. – С. 64 – 76.
- 2) Сергиев, В. П. Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы). / В.П. Сергиев, Ю.В. Лобзин и др.// – С.-Петербург, «Фолиант».– 2008. – С. 124 – 616.
- 3) Уркхарт, Г. Ветеринарная паразитология. / Г. Уркхарт, Дж. Эрмур, Дж. Дункан, А. Данн, Ф. Дженнингс // – М., «Аквариум». С. 87 – 92.
- 4) Акбаев, М. Ш. Паразитология и инвазионные болезни животных. М.Ш. Акбаев, А.А. Водянов и др. – М. Издат. Колос, 2002.– С. 173 – 268.
- 5) Сафиуллин, Р. Т. Сравнительная эффективность копроскопических методов диагностики гельминтозов свиней и их усовершенствование на основе стандартизации. / Р. Т. Сафиуллин // Тр. ВИГИСа. – 2001. – Т. 37. – С. 149 – 159.

УДК 616.9:616-074

### ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОГО МЕЛИОИДОЗНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА

*И.А. Дубина, А.А. Будченко, И.В. Новицкая, А.М. Куделина, М.Я. Кулаков, А.С. Куликова*

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский институт» Роспотребнадзора г.Волгоград, Россия*

**Аннотация.** Был получен клеточный антигенный комплекс *Burkholderia pseudomallei* 107. Произведена оценка его аналитических характеристик в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и встречном иммуноэлектрофорезе. Показана возможность изготовления эритроцитарного диагностикума на основе данного антигенного комплекса для выявления сывороточных антител к близкородственным возбудителям мелиоидоза и сапа в РНГА.

**Ключевые слова:** реакция непрямой гемагглютинации, встречный иммуноэлектрофорез, эритроцитарный диагностикум, *Burkholderia pseudomallei*.

Сап и мелиоидоз—особо опасные инфекционные заболевания, вызываемые близкородственным возбудителям II группы патогенности *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* соответственно. В настоящее время, в условиях развития туризма и увеличивающихся миграционных потоков населения, а также с учетом того, что данные микроорганизмы являются потенциальными агентами биотерроризма, особую актуальность приобретают экспресс-методы, направленные на своевременную и точную диагностику этих инфекций. Несмотря на то, что разрабатываются различные культуральные методы, методы детекции антигенов и антител, молекулярные методы, в клинической практике используются только методы, основанные на определении антител, такие как реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), латекс-агглютинация и иммунофлуоресценция[1].

Целью настоящего исследования была оценка возможности использования *B. pseudomallei* 107 для получения эритроцитарного диагностикума, способного выявлять сывороточные антитела к близкородственным возбудителям мелиоидоза и сапа в РНГА. Выбор данного штамма обусловлен его авирулентными свойствами, что существенно упрощает методические этапы работы, исключая риск внутрилабораторного заражения сотрудников, работающих с патогенными биологическими агентами.

Препарат был изготовлен на основе клеточного комплекса, полученного путем осаждения сульфатом аммония при 40% насыщении из водно-солевого экстракта *B. pseudomallei* 107.

Аналитические характеристики антигенного комплекса были изучены в реакции встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) и РНГА. Результаты ВИЭФ представлены на иммуноэлектрофореграмме (рис.1). Полученный в ходе высаливания комплекс антигенов *B. pseudomallei* 107 формирует с козьей мелиоидозной иммунной сывороткой в электронейтральной зоне линию преципитата, соответствующую преимущественно антигенам б и d по классификации Пивня Н.Н. [2].

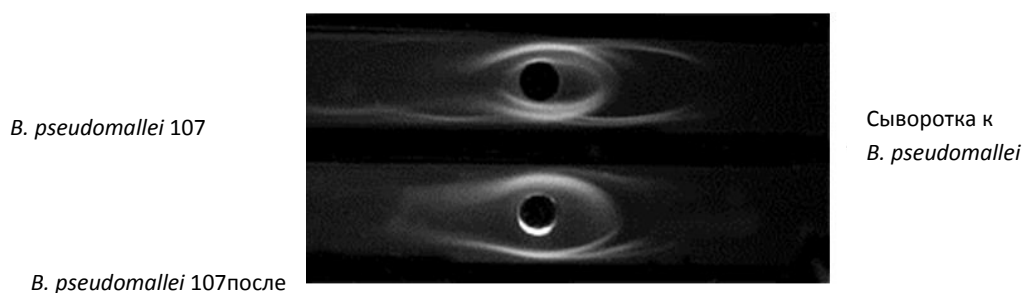


Рис. 1. Иммуноэлектрофореграмма клеточного антигена штамма *B. pseudomallei* 107

Для определения активности полученного антигенного комплекса *B. pseudomallei* 107 проводили РНГА с диагностикумом эритроцитарным сапным и мелиоидозным иммуноглобулиновым сухим, разработанным на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Антигенный комплекс брали в пяти рабочих разведениях 1; 2,5; 5; 10; 20 мг/мл. В качестве контроля иммуноглобулинового диагностикума использовали мелиоидозную гипериммунную козью сыворотку в разведении 1:100. По результатам РНГА было установлено, что оптимальная активность антигенного комплекса наблюдается при содержании белка не менее 10 мг/мл.

При исследовании оптимальных условий связывания полученного клеточного комплекса предварительно формализированными и

тонизированными эритроцитами барана оценивался температурный режим (температура 25, 35, 40, 45 и 50°C) и продолжительность инкубации (60, 90, 120 и 150 мин). Было выявлено, что наибольшая специфическая активность наблюдается после инкубации 10% взвеси тонизированных эритроцитов с мелиоидозным антигенным комплексом при 45°C в течение 90 минут в 0,01М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 5,9). Эти условия оказались наиболее благоприятными для связывания антигенов с эритроцитарными рецепторами. При более низких температурных режимах снижались аналитические и диагностические характеристики получаемого препарата, в то время как дальнейшее повышение температуры сенсibilизации приводило к росту вероятности спонтанной агглютинации эритроцитов в РНГА. Сенсibilизация более 90 минут оказалась нецелесообразной, так как увеличение времени сенсibilизации существенно не изменяло ее уровень, в то время как при уменьшении продолжительности инкубации сенсibilизация протекала не полностью. Последующая оценка качества полученного при таких условиях диагностикума в РНГА с иммунными сыворотками показала, что его рабочий титр составляет 1:25600 – 1: 51200.

Таким образом, в ходе исследования из штамма *B. pseudomallei* 107 нами был получен мелиоидозный антигенный комплекс, обладающий высокой специфичностью, и, согласно результатам РНГА и ВИЭФ, пригодный для конструирования эритроцитарного мелиоидозного антигенного диагностикума. Благоприятными условиями сенсibilизации эритроцитов антигенным комплексом с содержанием белка не менее 10 мг/мл является инкубация при 45° в течение 90 минут в фосфатно-солевом буфере с рН 5,9. Такая методика изготовления позволяет получить эритроцитарный диагностикум с рабочим титром до 1:51200.

#### **Литература:**

1. Trivedi P., Tuteja U., Khushiramani R., Jain Reena, Batra H.V. Development of a diagnostic system for *Burkholderia pseudomallei* infections // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2012; Vol. 28, №7 – P. 2465-2471.
2. Пивень Н.Н. Антигенная структура возбудителя мелиоидоза // Мелиоидоз. Сб. науч. тр. Под ред. Тихонова Н.Г. - Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во - 1995 - С. 47-57.

УДК 616.912-085.371

### **АНАЛИЗ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ПРОТИВ ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ**

*О.С. Ермилова, З.И. Гинько\*, В.И. Кузубов\*, М.И. Воевода\*\*, В.А. Белявская*

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор»,*

*\*МСЧ 163 ФМБА, \*\*НИИ терапии СО РАМН, Россия*

**Аннотация.** Наиболее эффективным способом борьбы с вирусными инфекциями является вакцинация. Но возможные осложнения, включая самые тяжелые последствия, могут нивелировать возможности применения даже самых эффективных и качественных вакцин. В данной работе проводится оценка клинического состояния вакцинированных лиц против вируса натуральной оспы, выделение по тяжести состояния и выявление зависимости выраженности клинических проявлений, тяжести поствакцинального периода и предполагаемой эффективностью вакцинации.

**Ключевые слова:** натуральная оспа, вакцинация, поствакцинальные кожные элементы.

В 1980г. ВОЗ объявила о полной ликвидации натуральной оспы в глобальном масштабе (1). С этого времени была отменена массовая вакцинация среди населения, но угроза локальных вспышек и использования оспы в качестве оружия биотерроризма (2) остается. В настоящее время, вакцинация как единственный способ предотвращения заражения, проводится только лицам, работающим в контакте с вирусом оспы или направляемым для работы в потенциальные очаги (3). Несмотря на многолетний опыт применения противооспенных вакцин, число серьезных поствакцинальных осложнений часто остается сравнимым по своей численности с летальным исходом при естественной локальной вспышке инфекции (4).

Образцы штаммов вирус оспы хранятся в двух лабораториях мира: в США (Центр контроля за инфекционными заболеваниями, штат Алабама) России (ГНЦ ВБ «Вектор»). Помимо сохранения образцов вируса, в этих лабораториях проводится работа по повышению эффективности и безопасности вакцинации, разрабатываются вакцины нового поколения с использованием достижений современной науки. Наряду с этим, вполне обоснованным представляется подход по выявлению групп лиц с высоким риском поствакцинальных осложнений. Наличие серьезных осложнений после вакцинации против натуральной оспы и против многих других социально-значимых инфекций, является серьезным препятствием к их массовому применению (5). Поэтому выявление причинных факторов, вызывающих поствакцинальные осложнения, позволит определить часть популяции, в которой вакцинация не будет являться адекватным способом профилактики инфекции, и в дальнейшем избежать социальных и экономических затрат на ликвидацию последствий заведомо нерациональной вакцинации.

**Цель работы:** анализ поствакцинальных клинических реакций у лиц, вакцинированных против вируса натуральной оспы при разных схемах иммунизации.

#### **Материалы и методы исследования.**

Для проведения исследования были взяты информационный банк данных МСЧ 163 ФМБА о вакцинированных против натуральной оспы, за период с 2010 по 2013гг. Всего 217 человек, 150 мужчин и 67 женщины. Возраст от 20 до 69 лет: 20-29-летних 47 человек, 30-39-летних 94 человека, 40-49-летних 50 человек, 50-59-летних 14 человек, 60-69-летних – 3человека. У 9 человек нет возрастных данных.

Из них впервые вакцинированных было 82 человека, что составляет 37,8%. Первичная вакцинация проводилась в два этапа инактивированной вакциной «Оспавир», г. Томск (НПО «Микроген»). Клинические реакции учитывались после второго этапа вакцинации. Ревакцинация проводилась от 2 до 8 раз оспенной живой сухой вакциной накожно с помощью бифуркационной иглы, временной промежуток между прошедшими ревакцинациями в интерпретации данных данного исследования не учитывался.

Первичной осмотр после прививки проводился в течении 3-5 дней с фиксацией данных об общем состоянии, температуры тела и кожной реакции на прививку. Состояние вакцинированных оценивалось по клиническим признакам: легкое течение (температура до 39С, планомерное образование кожных элементов) и средней тяжести (сильная реакция на прививку: температура выше 39С, распространенная гиперемия и отечность на месте прививки и появление дополнительных элементов, присоединение инфекционных заболеваний) (3). В исследовании учитывались объективные данные: образовавшиеся элементы на месте вакцинации и их размер, выраженность температурной реакции,

длительность заживления; и клиническую оценку состояния: характер реакции на прививку (легкая и средняя) и степень реактивности иммунной системы (стандартная, гипоэргическая и гиперэргическая реакции). Данные были подвергнуты статистической обработке с использованием электронного пакета программ Statistika8 (t-test).

**Результаты** статистической обработки электронной базы данных представлены в таблицах 1,2,3. Наличие и выраженность элементов местной реакции у лиц с разной степенью реакции на вакцинацию представлены в таблице 1.

Таблица 1- Наличие элементов местной реакции у лиц с разной степенью реакции на вакцинацию

Тип реакции\Сила реакции	Реакции нет (м:ж) N=5 (0:5)	Лёгкая степень N=141 (99:42)	Средняя N=61 (46:15)	Не указано N=10 (5:5)
Есть папула n=61(36:25)		37 (18:19)	20 (15:5)	4 (3:1)
Только папула	0	2(0:2)	0	
Имеется везикула n=180(130:50)		119 (85:34)	51(40:11)	10(5:5)
Только везикула	0	7(6:1)	2(2:0)	
Имеется пустула n=189(134:56)		121(86:36)	58(43:15)	10(5:5)
Только пустула	0	9(7:2)	10(6:4)	
Папула+ везикула (n=2)	0	3(2:1)	3(2:1)	
Папула+ пустула(n=2)	0	4(2:2)		6(2:4)
везикула+ пустула	0	81(63:18)	29(23:6)	
Все три	0	29(14:15)	19(14:5)	4(3:1)
Ничего	5	7(5:2)		(5:0)

Как видно из таблицы, у 5 человек, все из них были женщины (1 вакцинирована первично,4 повторно) ни температурной, ни кожной реакции не наблюдалось. Первоначальный кожный элемент- папула был зафиксирован при первичном осмотре в 61 случаях, единственный кожным элементом она была только в случае легкой степени реакции на прививку. Везикула наблюдалась у 180 вакцинированных, пустула была отмечена в 189 случаях. Таким образом, при легкой степени протекания реакции (преимущественно у повторно вакцинированных) клиническая картина может быть стерта, температурная реакция не выражена, кожные элементы редуцированы. В случаях полноценной иммунной реакции можно наблюдать все 3 ожидаемых кожных элемента. Количественные показатели реакции на вакцинацию при разных схемах ее проведения (присутствие/отсутствие предшествующей вакцинации) представлены в таблице 2.

Помимо кожных элементов отмечались формирование зон гиперемии и уплотнения, диаметр сформировавшейся корочки. В случаях легкой степени реакции на вакцинацию зоны гиперемии и уплотнения, диаметр корочки и время ее отпадения были достоверно меньше, чем в случаях средней степени реакции. Местная реакция демонстрирует иммунный ответ, коррелирующий с уровнем температурной реакции на прививку.

Таблица 2- Количественные показатели реакции на вакцинацию (M±SD)(среднее значение + стандартное отклонение)+

Показатель	Во всей группе (n)	Лёгкая степень реакции на вакцинацию	Средняя	Не указано
Зона гиперемии (см)	2,94±2,56 (184)	1,94±1,17 (117)	5,1±3,34 (58)***	2,00±0,56 (9)
Зона уплотнения	1,744±8,5 (119)	1,38±0,92(68)	2,41±1,1 (44)***	1,14±0,24 (7)
D корочки	0,848±0,29 (159)	0,77±0,29 (104)	1,03±0,21 (50)***	0,68±0,16 (5)
День отпадения корочки	16,5±7,2 (204)	14,59±5,19 (134)	21,25±8,87 (60)***	13,7±6,57 (10)

Примечание: группа со средней реакцией на вакцинацию (2) достоверно отличается от двух других групп  $p < 0,0001$ ; группы с лёгкой и не указанной степенью реакции на вакцинацию статистически не различаются по исследованным параметрам.

Дальнейшему анализу были подвергнуты различия в количественных показателях реакций на вакцинацию (табл.3).

Таблица 3. Различия в количественных показателях реакций на вакцинацию

Показатель	Во всей группе (n)	Предшествующая вакцинация	
		Была	отсутствовала
Зона гиперемии (см)	2,94±2,56 (184)	4,4±3,27(73)	1,97±1,27(103)***
Зона уплотнения	1,744±8,5 (119)	2,28±1,2(55)	1,22±0,55(57)***
D корочки	0,848±0,29 (159)	0,97±0,23(66)	0,76±0,31 (86)***
День отпадения корочки	16,5±7,2 (204)	20,24±8,12 (79)	14,17±5,41 (115)***

Примечание: различия между группами статистически достоверны  $p < 0,0001$

Анализ данных таблицы 3 выявил статистически значимые различия ( $p < 0.01$ ) между первично и повторно вакцинированными. У первично вакцинированных местная реакция и кожные элементы более выражены, чем у повторно вакцинированных, что отражает степень реактивности иммунной системы (ИС) в зависимости от наличия или отсутствия предшествующей стимуляции иммунитета.

Таким образом, опираясь на результаты проведенного статистического исследования, можно выделить группы сравнения на основании клинических различий поствакцинального периода. В дальнейшем планируется получить образцы крови лиц, прошедших вакцинацию, с целью определения напряженности иммунитета на основании уровня титра специфических антител к вирусу натуральной оспы, выделения геномной ДНК для создания банка биологических образцов, и дальнейшего поиска факторов, в том числе молекулярно-генетических, для разработки схем более безопасной вакцинации и разработке подходов к созданию новых вакцин.

#### Литература:

1. Официальный сайт ВОЗ.
2. <http://medportal.ru/mednovosti/news/2010/03/25/smallpox/>



3. Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы. методические указания. му 3.3.1.2044-06" (утв. главным государственным санитарным врачом рф 23.01.2006)
4. Информация Департамента здравоохранения шт. Миннесота. Об оспе. 12.06.2005.
5. Научный обзор исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 гг. ВОЗ.

УДК 616.988:618.1

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СМЕШАННЫХ ВИРУС-ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ОРГАНОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ГЕРПЕСОМ ТЯЖЁЛОГО И СРЕДНЕТЯЖЁЛОГО ТЕЧЕНИЯ**

*К.Д. Ермоленко, Д.К. Ермоленко*

*ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера  
г.Санкт-Петербург, Россия*

**Аннотация.** Работа посвящена проблеме выявления больных с повышенным риском возникновения рака шейки матки, к которым относятся пациенты с сочетанной папилломавирусной инфекцией и генитальным герпесом, изучению изменений эпидемиологической обстановки, касающейся данной инфекционной патологии, за последние 10 лет, а также установлению наиболее распространённых филогенетических групп вирусов папилломы человека высокого и низкого онкогенного риска.

**Ключевые слова:** вирусы папилломы человека, рак шейки матки, генитальный герпес, эпидемиология

Одной из актуальнейших проблем современного здравоохранения является проблема выявления больных с повышенным риском возникновения рака шейки матки (РШМ) и контроля за их состоянием. Если по данным ряда исследований до 1992 года число случаев данной нозологической формы снижалось[2], то в течение первого десятилетия XXI века отмечен всплеск заболеваемости РШМ не только в Европе, но и в Российской Федерации. В период с 2000 по 2010 отмечался подъем заболеваемости данной нозологической формой на 22,4% [1]. На сегодняшний день РШМ занимает второе место в структуре онкологической патологии у женщин и обуславливает до 60% злокачественных опухолей половых органов. Его частота в нашей стране составляет 10,8 на 100 тыс. женщин. Наиболее высокая заболеваемость отмечена в Северо-Кавказском регионе и в Москве[1].

Исследования последних двадцати лет позволили установить связь между папилломавирусной инфекцией(ПВИ) и развитием РШМ и предраковых заболеваний этого органа, к которым, как известно, относятся дисплазии разной степени выраженности. Причем риск развития данных патологических состояний увеличивается при наличии в пораженных тканях более 1 типа вируса папилломы человека (ВПЧ)[4,5]. Значительному возрастанию вероятности развития онкологических заболеваний способствует наличие и иных инфекционных факторов, в частности вирусов простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1/2), вызывающих у таких больных рецидивирующее течение генитального герпеса (ГГ) [3]. Проведенные ранее эпидемиологические исследования, посвященные распространённости сочетанной инфекции шейки матки, вызванной ВПЧ и

ВПГ1/2 у женщин детородного возраста, фрагментарны и не учитывают её изменений с течением времени.

Целью данного исследования была оценка встречаемости смешанной ВПЧ и ВПГ1/2 инфекции шейки матки у женщин детородного возраста, страдающих рецидивирующим ГГ тяжёлого и среднетяжёлого течения и определение временного тренда за десятилетний период.

Для проведения работы методом случайной выборки было отобрано по 86 женщин в возрасте от 26 до 38 лет без нарушений менструального цикла, обратившихся в 2002 и 2012 году за медицинской помощью в связи с рецидивирующим ГГ среднетяжёлого и тяжёлого течения (частота рецидивирования инфекционного процесса от 1 раза в месяц до 1 раза в 3 месяца).

Диагностика заболевания осуществлялась на основании анамнестических данных, характерных клинических проявлений, кольпоскопического исследования, и подтверждалась полимеразной цепной реакцией (РТ-ПЦР) в режиме реального времени. С помощью РТ-ПЦР также отслеживались основные группы ВПЧ, имеющие тропность к органам урогенитального тракта.

В результате проведенных исследований было установлено увеличение сочетанной ВПЧ и ВПГ 1/2 инфекции на 22,1% за период с 2002 по 2012 гг. (табл. 1). Более того, отмечен рост частоты выявления ВПЧ всех филогенетических групп высокого онкогенного риска, особенно группы А7 и сочетания групп А5 и А6 (на 4,7%), а также ВПЧ низкого онкогенного риска 6 и 11 типов.

Таблица 1. - Динамика изменения вирус-вирусных ассоциаций у больных с рецидивирующим генитальным герпесом, обратившихся за медицинской помощью в 2002 и 2012 гг.

Тип и группы ВПЧ	2002 год		2012 год	
	Количество больных	%	Количество больных	%
ВПЧ 6 типа	3	3,5%	5	5,8%
ВПЧ 11 типа	1	1,2%	3	3,5%
ВПЧ А9 филогенетическая группа	9	10,5%	12	14,0%
ВПЧ А 7 филогенетическая группа	6	7,0%	10	11,6%
ВПЧ А5, А6 сочетание филогенетических групп	2	2,3%	6	7,0%
ВПЧ А7, А9 сочетание филогенетических групп	2	2,3%	4	4,7%
ВПЧ А5, А6, А7, А9 сочетание филогенетических групп	0	0,0%	4	4,7%
ВПЧ+ВПГ	23	26,7%	42	48,8%
Всего	86		86	

Особое значение имеет то, что почти у 5% пациентов, обратившихся за помощью в 2012 году, имели сочетание всех филогенетических групп ВПЧ на фоне ГГ. В то же время у больных, обследованных в 2002 году, подобное сочетание выявлено не было.

Таким образом, за последние 10 лет отмечается значительное увеличение частоты встречаемости сочетанной ВПЧ и ВПГ1/2 инфекции у женщин детородного возраста, страдающих рецидивирующей формой ГГ, что обуславливает необходимость обязательного скрининга подобного контингента на ВПЧ. В случае выявления и этих возбудителей, больные должны быть

отнесены к группе повышенного риска развития дисплазий шейки матки с обязательным кольпоскопическим, цитологическим, а в случае необходимости и гистологическим контролем над их состоянием.

#### **Литература:**

1. Злокачественные заболевания в России Под редакцией Чиссова В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М. 2012 ФГБУ им. П.А.Герцена» - 260 с.
2. Пухнер А.Ф., Козлова В.И. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий, передаваемые половым путём. М. Предтеча. 2010. – 792 с.
3. Урманчеева А.Ф., Мерабишвили В.М., Сельков С.А. и др. Эпидемиология и диагностика рака шейки матки // Акуш. и гин. - 2001. - Т. XLX. - Вып. 1. - С. 80-86.
4. Otero-Motta A.P., Ordonez J.L., Gonzales-Celador R., Rivas B., Masias Mdel C., Bullon A., Abad Mdel M. Prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologic abnormalities from unvaccinated women living in north-western Spain. // APMIS.- 2011, vol. 119, №3. - P. 204-215.
5. Pista A., Oliveira A., Verdasca N., Ribeiro F. Single and multiple human papillomavirus infection in cervical abnormalities in Portuguese women // Clin. Microbiol. Infect. – 2011, vol. 17, №6. – P. 941 – 946.

УДК 613.262+613.294

### **БИОДЕКОНТАМИНАЦИЯ СВЕЖИХ ОВОЩЕЙ И ФРУКТОВ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ПЛАЗМОЙ**

*Г.В. Киреев\**, *Ю.А. Ракицкий\**, *Е.Н. Кобзев\*\*\**, *В.А. Чугунов\*\*\**, *Ю.С. Акишев\*\*\**,  
*Н.И. Трушкин\*\*\**, *М.Е. Грушин\*\*\**

*\* ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,  
п. Оболенск, Московская область, Россия,*

*\*\* Пуцинский государственный естественно-научный институт,  
г. Пуцино, Россия*

*\*\*\* Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований,  
г. Троицк, Россия*

**Аннотация.** Показана возможность биодеконтаминации свежих овощей и фруктов низкотемпературной плазмой. Обработка холодной плазмой поверхности ягод винограда и листьев салата в течение 30 секунд позволила снизить численность естественной микрофлоры на поверхности образцов в среднем на 1 порядок (до единичных КОЕ/см<sup>2</sup>). 30-секундная плазменная обработка листьев белокочанной капусты, искусственно контаминированной непатогенной культурой *E. coli* ATCC 25922 #2393, приводила к полной инаktivации *E. coli* на поверхности листьев капусты (при исходной поверхностной плотности  $(2,9 \pm 1,1) \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup>).

**Ключевые слова:** низкотемпературная плазма, обработка продуктов питания, биодеконтаминация свежих овощей и фруктов.

Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов является одной из приоритетных задач, решение которой непосредственно направлено на охрану здоровья населения. Во всем мире эта проблема приобретает особую актуальность в связи с увеличением числа заболеваний, передающихся через пищевые продукты. Кроме того, задача рационального использования и эффективного хранения пищевых ресурсов имеет большое

социально-экономическое значение.

При нарушении правил заготовки, транспортирования, хранения и реализации пищевых продуктов возникают их значительные потери. Особенно остро стоит проблема обеззараживания продуктов, чувствительных к нагреванию. В этом отношении весьма характерным является положение с биодеконтаминацией свежих овощей и фруктов, для которых тепловая обработка совершенно неприемлема. В связи с этим, для биодеконтаминации данных продуктов обычно используется обработка хлором, однако ее эффективность невелика [1]. Однако необходимо признать, что удовлетворительной альтернативы хлору, к сожалению, до сих пор нет, несмотря на его ограниченную эффективность в качестве биоцида, а также на наличие определенного риска для здоровья человека при его применении [2].

В этой связи, на наш взгляд, плазменная биодеконтаминация свежих фруктов и овощей может стать перспективной альтернативой применяемым дезинфектантам, прежде всего, хлору. Плазменная технология может обеспечить эффективную инактивацию микроорганизмов, сохранение качества и товарного вида продуктов, свести к минимуму повреждение упаковочных материалов.

Низкотемпературная плазма создаётся маломощным электрическим разрядом непосредственно в обрабатываемых жидкостях и газах или на поверхностях стерилизуемых объектов [3]. В ходе плазменной обработки образуется широкий спектр активных агентов: излучение (микроволны, ультрафиолет), заряженные частицы (электроны, положительные и отрицательные ионы), электромагнитное поле, а также химически активные частицы (электронно-возбужденные частицы, свободные радикалы, газы в атомарном состоянии). Именно воздействие перечисленных активных агентов плазмы приводит к быстрой гибели микроорганизмов [4].

**Целью данной работы** была оценка эффективности биодеконтаминации свежих овощей и фруктов с использованием генератора низкотемпературной плазмы на основе диэлектрического барьерного разряда.

#### ***Обработка поверхности ягод винограда***

В исследованиях был использован виноград сорта «Изабелла», выращенный в условиях дачного хозяйства без применения антимикробных средств. Численность естественной микрофлоры на поверхности ягод была  $(1,5 \pm 1,3) \cdot 10^2$  КОЕ/ягоду. В ходе плазменной обработки продолжительностью 30 секунд нам удалось снизить численность микроорганизмов на поверхности ягод в среднем на 1 порядок. Хотя ни в одном из экспериментов полная инактивация микроорганизмов на поверхности винограда достигнута не была, необходимо отметить, что нам удалось снизить численность микрофлоры с 200-300 КОЕ/ягоду до единичных (менее 10) КОЕ на ягоде. Оптимизация условий обработки ягод, на наш взгляд, может повысить эффективность плазменной обработки.

#### ***Обработка поверхности салата «китайская капуста»***

Естественная обсеменённость листьев салата в среднем составляла  $(3,2 \pm 1,4) \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup>. Плазменная обработка листьев салата холодной плазмой в течение 30 секунд позволила снизить численность микроорганизмов на поверхности с  $(2,3 \pm 0,7) \cdot 10^3$  КОЕ/см<sup>2</sup> до  $(1,1 \pm 0,7) \cdot 10^2$  КОЕ/см<sup>2</sup> (рис. 1).

Так же, как и в случае винограда, полностью инактивировать микроорганизмы на поверхности листьев салата не удалось, однако численность микробов была снижена с тысяч КОЕ/см<sup>2</sup> до десятков КОЕ/см<sup>2</sup>. В качестве сравнения мы оценили эффективность обработки холодной плазмой по сравнению с промывкой под струёй водопроводной воды. Полученные данные показали, что интенсивная промывка вручную (без использования моющих и вспомогательных средств, таких как поролоновая губка) в течение 5 минут под

струей водопроводной воды листьев салата не оказывало никакого влияния на степень их обсеменённости. По нашему мнению, это связано с тем, что листья салата являются очень хрупкими, поэтому, чтобы их не повредить, промывку вели максимально деликатно. Таким образом, обработка поверхности листьев салата плазмой в течение 30 секунд была значительно эффективней промывки их под струей воды в течение 5 минут и снижала обсеменённость до единичных КОЕ/см<sup>2</sup>.

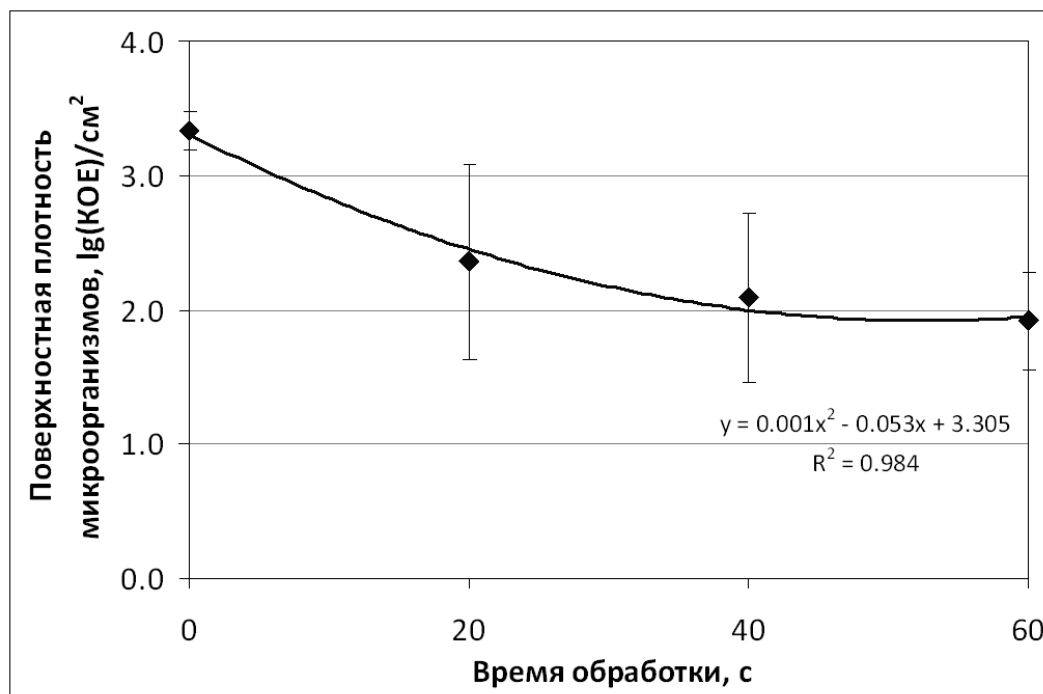


Рисунок 1 – Динамика численности естественной микрофлоры на поверхности листьев салата «китайская капуста» в ходе обработки холодной плазмой

### **Обработка поверхности листьев белокочанной капусты**

Поскольку для экспериментов были использованы внутренние листья свежего кочана капусты (не подвергавшегося длительному хранению), исследуемые образцы были практически стерильны. В отдельных случаях наблюдалась очень низкая обсеменённость (от 1 до 4 КОЕ/образец), что, скорее всего, связано с вторичной контаминацией. Именно поэтому в ходе исследований образцы листьев капусты искусственно контаминировали непатогенной культурой *E. coli* ATCC 25922 #2393, моделируя возможную контаминацию патогенной кишечной палочкой. В случае, когда поверхность листьев капусты контаминировали относительно высокими концентрациями (конечная концентрация *E. coli* была более 10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>), обработка поверхности листьев холодной плазмой в течение 20 секунд позволила снизить концентрацию микроорганизмов с  $(3,0 \pm 1,5) \cdot 10^7$  до  $(8,7 \pm 3,9) \cdot 10^4$  КОЕ/см<sup>2</sup> (рисунок 2). Экстраполяция полученных данных позволяет предположить, что при высокой исходной численности *E. coli* (более 10<sup>7</sup> КОЕ/см<sup>2</sup>) полная инактивация культуры на поверхности листьев капусты должна наступить при продолжительности экспозиции 30-35 секунд.

При более низкой поверхностной плотности  $((2,9 \pm 1,1) \cdot 10^5$  КОЕ/см<sup>2</sup>), обработка холодной плазмой в течение 30 секунд приводила к полной инактивации *E. coli* на поверхности листьев капусты (рисунок 2).

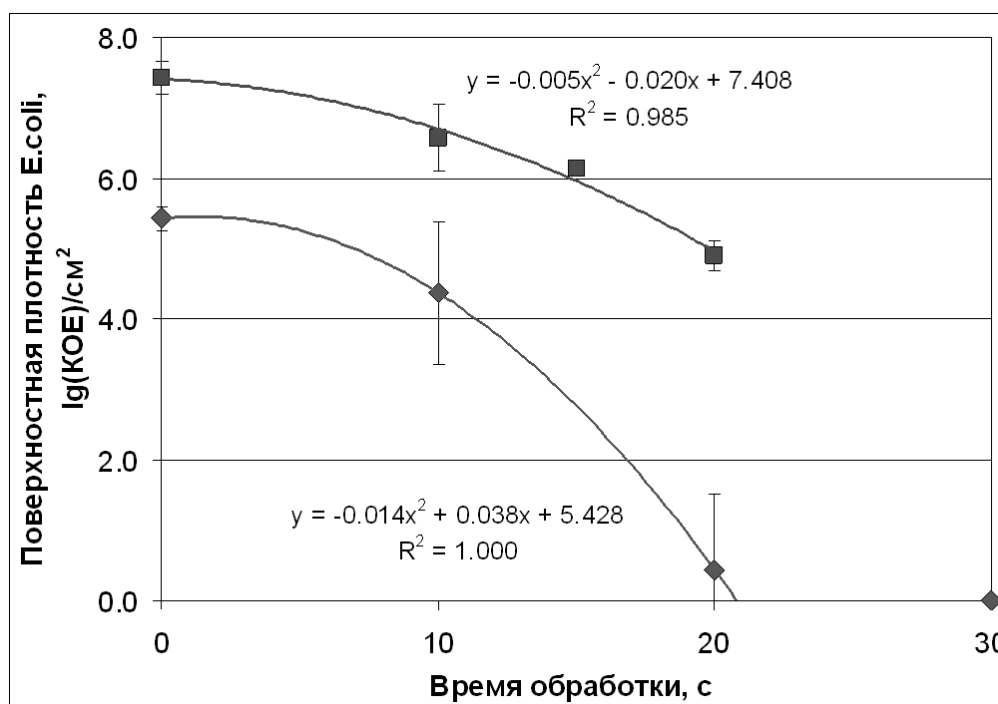


Рисунок 2 – Динамика численности *E. coli* на поверхности листьев капусты в ходе прямой обработки холодной плазмой

В заключение необходимо отметить, что визуальный осмотр поверхности обработанных образцов фруктов и овощей не выявил никаких видимых изменений их поверхности. Также нами не было отмечено изменение товарного вида обработанных продуктов.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности применения низкотемпературной плазмы для биодеконтаминации фруктов, овощей и других пищевых продуктов. По мнению зарубежных исследователей, плазменные технологии могут найти широкое применение в пищевой промышленности для биодеконтаминации продуктов, пищевого сырья и упаковочных материалов, что даст возможность хранить и транспортировать продукты питания при сохранении их полезных качеств и товарного вида [2, 5].

#### Литература:

1. Delaquis, P. J. Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce / P. J. Delaquis, S. Stewart, P. M. A. Toivonen, A. L. Moyls // Food Res. Int. – 1999. – Vol. 32. – P. 7-14.
2. Nguenthe, C. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables / C. Nguenthe, F. Carlin // Crit. Rev. Food Sci. Nutrition. – 1994. Vol. 34. P. 371-401.
3. Акишев, Ю. С. Создание неравновесной плазмы при атмосферном давлении в жидкости с газовыми пузырьками и в воздухе с жидким аэрозолем и ее использование для стерилизации / Ю. С. Акишев, М. Е. Грушин, В. Б. Каральник // Физика плазмы. – 2006. - Т. 32. - №12. - С. 1142-1152.
4. Laroussi, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects / M. Laroussi // IEEE Trans. Plasma Sci. – 2002. – Vol. 30. – N 4. – P. 1409-1415.
5. Critzer, F. J. Atmospheric plasma inactivation of foodborne pathogens on fresh produce surfaces // F. J. Critzer, K. Kelly-Wintenberg, S. L. South, D. A. Golden // Journal of Food Protection. – 2007. Vol. 70. – P. 2290 –2296.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН.

*Л.С. Киямова, М.А. Николаева, Н.А. Кучимова, З.Х. Даянова*

*Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан  
г.Уфа, Россия*

**Аннотация.** Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости туберкулезом остается одной из самых актуальных проблем здравоохранения во всем мире. На распространённость туберкулёза в республике, позднее выявление больных, наличие не диагностированных случаев заболевания, недостатки в организации противоэпидемических мероприятий в очагах туберкулёза указывает ряд характерных показателей. Одним из основных направлений в профилактике распространения заболевания туберкулезом среди населения является вакцинопрофилактика и своевременное выявление больных туберкулезом.

**Ключевые слова:** туберкулез, заболеваемость, летальность, вакцинопрофилактика, туберкулинодиагностика, ВИЧ-инфекция, заключительная дезинфекция.

В настоящее время по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) около 1,7 млн. человек во всем мире инфицированы микобактериями туберкулеза. Ежегодно от этой инфекции умирает около 3 млн. человек - больше, чем от всех других инфекционных болезней вместе взятых [3].

Ежегодно в России выявляется около 60 тысяч бациллярных больных, активно выделяющих возбудителя туберкулеза и обсеменяющих среду обитания. Еще 60 тысяч страдают хроническими формами туберкулеза, которые в течение длительного времени выделяют микобактерии [2]. Восприимчивость людей к туберкулезу всеобщая и весьма выраженная, однако, она подвержена возрастным и половым влияниям. Выше вероятность заболеть туберкулезом среди лиц, страдающих хроническими заболеваниями органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, сахарным диабетом.

В 2012 году в Республике Башкортостан зарегистрировано 1873 случая впервые выявленного активного туберкулеза (2011 г. – 1897 случаев). Показатель заболеваемости 46,0 на 100 тыс. населения на 1,4% меньше предыдущего года (2011 г. – 46,6 на 100 тыс.) и ниже среднероссийского и по Приволжскому федеральному округу соответственно на 26,6% и 21,2% (рис. 1). Заболеваемость туберкулезом сельского населения по сравнению с предыдущим годом увеличилась на 12,8% и составила 33,6 на 100 тыс. сельских жителей (2011 – 29,7) [1].

Наиболее высокие показатели заболеваемости регистрируются в Иглинском (68,3), Архангельском (59,5), Мелеузовском (46,4), Благовещенском (46,2) муниципальных районах и городах Уфа (49,1), Белорецк (46,5).

Среди всех впервые выявленных больных активным туберкулезом органов дыхания бациллярные больные в 2012 году составили 24,2 %. Всего зарегистрировано 453 случая заболевания с бактериовыделением, показатель – 11,1 на 100 тыс. населения (2011 – 501 случай, пок. 12,3).

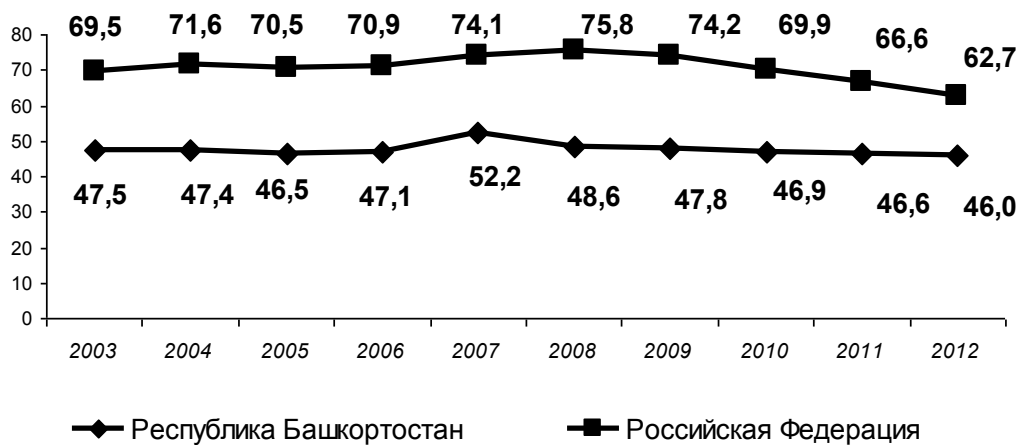


Рис. 1 Заболеваемость туберкулезом в Республике Башкортостан и Российской Федерации в 2003-2012 годах, на 100 тыс. населения.

В 2012 году впервые выявленным активным туберкулезом заболело 54 ребенка в возрасте до 17 лет, показатель заболеваемости детского населения в среднем по республике составил 6,4 на 100 тыс. данной возрастной группы (2011 г. – 6,7 на 100 тыс. населения). Показатели первичного инфицирования туберкулезом детского населения в 2012 году по сравнению с 2011 годом несколько снизились: в возрастных группах от 0 до года – на 34,3% (с 5,4 до 3,5 на 100 тыс.) и 7-14 лет на 32,5% (с 6,4 до 4,3 на 100 тысяч детей данного возраста), тем не менее, в возрасте от 1 до 2 лет и с 3 до 6 лет показатель заболеваемости активным туберкулезом выше в 1,4 и 2,6 раза соответственно.

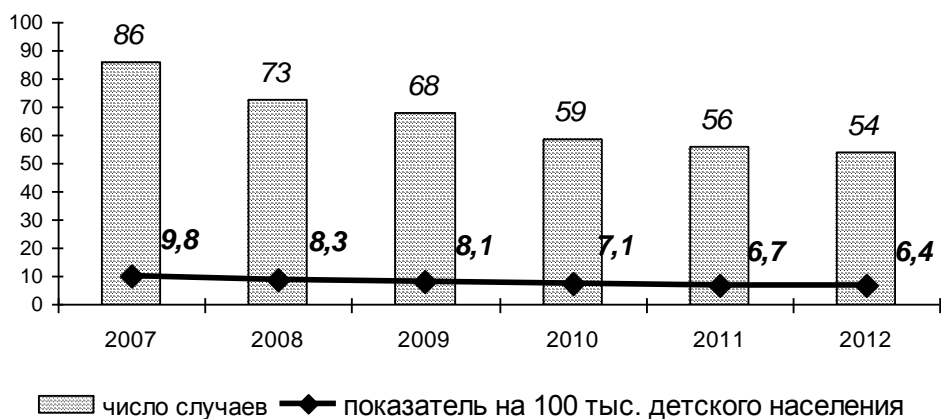


Рис. 2 Заболеваемость детского населения Республики Башкортостан активными формами туберкулеза и туберкулеза органов дыхания в 2007-2012 годах.

Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу связана с заболеваемостью населения ВИЧ-инфекцией. В мире 40-60% больных ВИЧ-инфекцией умирает от туберкулеза.

По итогам 2012 года зарегистрировано 502 случая ВИЧ-инфекции у туберкулезных больных, что на 3,7% больше 2011 г. (2011 г. – 484 случая; 2010 г. – 587 случаев). Всего в ГБУЗ Республиканский Центр по борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями в 2012 году на учете состояло 818 туберкулезных больных с ВИЧ-инфекцией (2011 год – 767 человек). Среди ВИЧ-инфицированных лиц в 2012 году умерло от туберкулеза 104 человека [5] (рис.3).



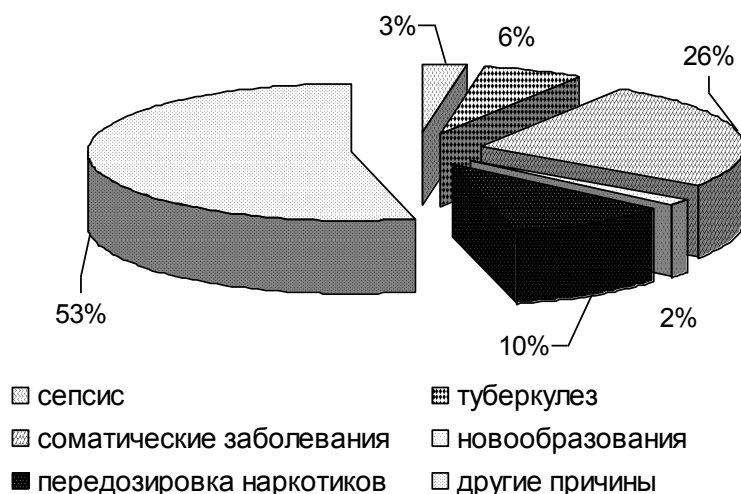


Рис. 3 Структура причин смерти ВИЧ-инфицированных в 2012 году.

Надо помнить, что риск заразиться туберкулёзом есть у всех. Главное выявить заболевание на ранних стадиях.

Следует отметить, что в 2012 году регистрировалось увеличение доли случаев заболевания туберкулезом, выявленных при профилактических осмотрах (с 60,7% до 62,8%) и снижение доли посмертно диагностированных случаев (с 0,4% до 0,3%). Профилактическим обследованием в 2012 году охвачено 71,8% населения (2011 – 71,7%), в том числе: подростки – 100,0%, декретированная группа населения – 101,6%, контингенты группы риска – 93,7% [4].

Вместе с тем, в ряде территорий республики работа по раннему выявлению туберкулеза среди населения проводится неудовлетворительно. Охват населения профилактическими осмотрами в целях раннего выявления туберкулеза, в том числе среди декретированного контингента ниже средне республиканских данных в следующих административных районах: Бирский (52,7%), Шаранский (54,4), Стерлибашевский (55,2), г.Октябрьский (55,7), Иглинский (57,6%), Федоровский (59,5), Мелеузовский (59,5), Чишминский (60,7), Архангельский (63,6%), г.Уфа (65,3), Хайбуллинский (65,5), Кармаскалинский (66,1%), Дуванский (66,3), Кушнаренковский (66,4), Кюргазинский (66,4), Гафурийский (66,8%), Мишкинский (66,8), Кигинский (67,0), Аургазинский (68,5%), Белокатайский (69,3%), Краснокамский (69,5), г. Нефтекамск (69,7).

Значительная часть асоциальных слоев населения и лиц, не проживающих по месту регистрации в связи с трудовой деятельностью, по-прежнему остается не обследованной более двух лет.

Показателем неудовлетворительной организации и отсутствия контроля за достоверностью планирования и своевременностью прохождения профилактического флюорографического обследований населения является позднее выявление больных и, особенно, среди населения, проживающего в сельской местности. В 2012 году из числа впервые выявленных больных туберкулёзом органов дыхания, состоящих на учёте в системе здравоохранения республики, выявлены в стадии бактериовыделения 431 человек – 28,6% (2011. – 32,3%), с распадом лёгочной ткани 388 людей – 27,3 % (2011 – 27,1%).

Имеются недостатки в организации раннего выявления туберкулеза среди детей и подростков. В 2012 году туберкулинодиагностикой охвачено детей в возрасте от 1 года до 14 лет – 99,4%, от 15 до 17 лет – 87,2%.

Одним из основных направлений в профилактике распространения заболевания туберкулёзом среди населения является вакцинопрофилактика.

Раннее введение противотуберкулёзной вакцины обеспечивает защиту от самых опасных клинических форм туберкулёза. Поэтому усилия медицинских работников и родителей должны быть направлены, прежде всего, на высокий охват прививками детей в раннем возрасте (период новорожденности и в возрасте до 1 года).

План иммунизации против туберкулёза в 2012 г. по республике выполнен на 102,2 %. Охват прививками против туберкулёза детей до 1 года составил 98,2% от числа родившихся, детей в возрасте 7 лет – 18,1% и 14 лет – 12,3% от числа состоящих на учёте.

При этом профилактическая работа с контактными лицами из бытовых очагов туберкулеза в 2012 году проводилась не на должном уровне. Из подлежащих диспансерному наблюдению в противотуберкулезном диспансере в 2012 году не наблюдалось 1,4% контактных лиц из очагов туберкулезной инфекции (2011 – 0,3%). В очагах активного туберкулёза с бактериовыделением обследованием охвачены все 100% контактных лиц (10764 человека).

В 2012 году заболели туберкулезом 23 контактных лица из очагов бытового туберкулеза, в том числе детей до 17 лет – 4 человек.

Таким образом, в 2012 году, в результате проведенной работы и улучшения финансирования региональных и республиканских противотуберкулезных программ наметились позитивные тенденции в активизации мероприятий по раннему выявлению туберкулеза и работы в очагах туберкулезной инфекции. Тем не менее, сохраняют свою актуальность факторы, способствующие распространению заболеваемости населения туберкулезом, особенно в условиях экономической нестабильности.

#### **Литература:**

1. Государственный доклад "О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Башкортостан в 2012 году";
2. Шилова М.В. Туберкулез в России в 2008 году: монография. Москва, 2009. 160 с.;
3. Ю.М.Маркелов//Ранняя диагностика и профилактика туберкулеза: учебное пособие. г.Петрозаводск, 1996. С.34;
4. Г.М.Сидоренко//Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Башкортостан за 2012 год. Уфа, 2012. С.28;
5. Фролова О.П., Якубовик В., Коробицин А.А.//Влияние ВИЧ-инфекции на эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в г.Уфе в современных условиях. Уфа, 2005. С.16-20.

УДК 615.478.74

### **НОВАЯ ПРОСТАЯ ТИТРИМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРГЕКСИДИНА, ХЛОРГЕКСИДИН БИГЛЮКОНАТА, ХЛОРГЕКСИДИН ДИАЦЕТАТА В ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВАХ**

*Е.А. Клочко, С.В. Андреев, Э.А. Новикова*

*ФБУН «Научно-исследовательский институт Дезинфектологии»  
г.Москва, Россия.*

**Аннотация.** Разработана новая простая титриметрическая методика определения концентрации хлоргексидина биглюконата в диапазоне от 0,1 до 2 %, основанная на титровании хлоргексидина в среде вода-кетон. Разработанная методика

применима для водных и водно-спиртовых растворов хлоргексидина биглюконата, а также для хлоргексидина диацетата и хлоргексидина.

**Ключевые слова:** хлоргексидин; хлоргексидин диацетат; хлоргексидин биглюконат; метод анализа.

Актуальность работы обусловлена

- возросшими запросами по контролю концентраций действующих веществ (ДВ) в рабочих растворах;

- сложностью и высокой трудоемкостью применяемой в настоящее время методики определения хлоргексидина биглюконата на основе неводного титрования в ледяной уксусной кислоте.

Заданные для определения концентрации были выбраны с учетом концентраций хлоргексидина биглюконата, применяемых в дезинфицирующих средствах в качестве кожного антисептика в виде водного раствора концентрации 1% и водно-спиртового – 0,5%; для целей дезинфекции в виде – 0,2% водного раствора, водно-спиртового раствора 0,5% и 0,1%.

В настоящее время используется титриметрическое определение концентрации хлоргексидина биглюконата в дезинфицирующих средствах на основе кислотно-основного титрования в ледяной уксусной кислоте. Метод предусматривает: отгонку воды из пробы до сухого остатка, растворение его в безводной ледяной уксусной кислоте, титрование приготовленным безводным уксуснокислым раствором хлорной кислоты с потенциметрическим или визуальным установлением точки конца титрования [1].

В работе [3] предложен более простой титриметрический метод определения хлоргексидина биглюконата с потенциметрическим установлением конечной точки титрования. Метод, предложенный для анализа концентрированного водного раствора хлоргексидина биглюконата, основан на титровании хлоргексидина биглюконата водным раствором соляной кислоты в водно-ацетоновой среде. Показано, что в указанных условиях скачок значений рН лежит в области 4,5 – 3,5, титр 0,1 н раствора соляной кислоты по хлоргексидину биглюконату ( $M.M.=897,6$ ) составляет  $T_{ХГБГ} = 0,04488 \text{ г/см}^3$  (вместо  $T_{ХГБГ} 0,02244$  в ледяной уксусной кислоте). Объясняя механизм реакции, автор делает вывод о том, что при титровании соляной кислотой в водно-ацетоновой среде протонируются только два наиболее основных атома азота.

В развитие метода [3] нами была исследована возможность использования визуального титрования – в присутствии бромфенолового синего, характеризующегося переходом окраски в установленном потенциметрически интервале рН [3]. Были подобраны условия проведения визуального титрования водных растворов с концентрацией 2; 1; 0,5; 0,2 % хлоргексидина биглюконата.

Как показали экспериментальные исследования, водно-спиртовые растворы хлоргексидина биглюконата в среде водного ацетона оттитровать не удастся. В связи с этим, исходя из литературных данных о применяемых при неводном титровании органических растворителях [2], нами выбран метилэтилкетон в качестве среды титрования с добавлением к пробе изопропилового спирта.

Подобраны условия проведения визуального титрования соляной кислотой в среде метилэтилкетона водно-спиртовых растворов хлоргексидина биглюконата с концентрацией 2 – 0,1 %.

Проведенными исследованиями показано, что количественный анализ хлоргексидина биглюконата в водно-спиртовых растворах обеспечивается при титровании соляной кислотой в присутствии индикатора бромфенолового синего в среде метилэтилкетона при добавлении изопропилового спирта.

Для количественного определения хлоргексидина биглюконата в водных растворах до концентрации 0,2 % пригодны титрования соляной кислотой в присутствии бромфенолового синего в среде ацетона.

По результатам исследований предложена методика определения концентрации хлоргексидина биглюконата в жидких дезинфицирующих средствах титриметрическим методом.

Проведены метрологические исследования предлагаемого метода на модельных водно-спиртовых растворах хлоргексидина биглюконата с концентрациями от 1% до 0,1 % и водных растворах – концентраций 1 – 0,2 %.

Сравнение двух титриметрических методик – известной и разработанной показало преимущества разработанной методики: значительное снижение трудоемкости по приготовлению необходимых реактивов и приготовлению пробы; упрощается процедура титрования, значительно сокращается время анализа.

**Заключение:**

1. Разработана методика определения хлоргексидина биглюконата в водно-спиртовых и водных растворах на основе титрования соляной кислотой в присутствии индикатора бромфенолового синего в среде метилэтилкетона, а водных растворов – в среде ацетона.

2. Оба варианта методики характеризуются относительной погрешностью  $\pm 3\%$  для доверительной вероятности  $P=0,95$  при незначимой систематической составляющей погрешности.

#### **Литература:**

1. ФС 42-2761-90 «Хлоргексидин биглюконата, 20 %-ный водный раствор»
2. Бишоп Э., *Индикаторы*, М.: «Мир», 1976, Т. 1-2, 946 с.
3. Крейнгольд С. Простой и точный метод определения хлоргексидина биглюконата// *Дезинфекционное дело*. 1998. № 2. С. 26

УДК 616.932:57.063.8:615.371

### **ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 и O139 СЕРОГРУПП**

*С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев, Л.Я. Урбанович*

*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
г.Иркутск, Россия*

**Аннотация.** В препаратах субклеточных фракций (наружные мембраны, мочевиновые экстракты) *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп разной эпидемической значимости в диффузионных тестах с использованием в качестве субстрата неионных детергентов выявлена липолитическая активность, по величине которой обнаружены межштаммовые различия.

**Ключевые слова:** липолитическая активность, неионные детергенты, диффузионный тест, субклеточные фракции, *Vibrio cholerae*.

В настоящее время функции многих бактериальных липаз все еще полностью не выяснены. Их главная роль может превышать простой гидролиз жиров для питания клеток. Тем не менее, установлено, что ряд токсинов микроорганизмов являются фосфолипазами или обладают липолитической активностью [3]. Имеются исследования, предлагающие дифференцирование на

основе определения липазной активности гемолитических и негемолитических штаммов *Vibrio cholerae* [2]. Показано влияние лизофосфолипазы *V. cholerae* на продукцию холерного токсина [5]. Способность холерного вибриона гидролизовать поверхностно-активные вещества, в том числе неионные детергенты, является одним из механизмов адаптации патогена к неблагоприятным факторам внешней среды. Важность выполняемой роли ферментами во взаимоотношении холерного вибриона с макроорганизмом подтверждается известным положением об эффективности химической холерной вакцины, в состав которой должны входить и ферменты [1].

**Цель работы** – изучение липолитической активности препаратов субклеточных фракций *V. cholerae* eltor O1 и *V. cholerae* O139 в диффузионных тестах с использованием в качестве субстратов неионных детергентов.

**Материалы и методы.** В работе использовано 12 штаммов *V. cholerae* eltor O1 и 2 штамма *V. cholerae* O139 из коллекции музея живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора». Первая группа токсигенные штаммы: *V. cholerae* eltor O1 И-563, М-878, И-1263, И-1298, И-1330, И-1337, И-1342; Вторая группа нетоксигенные штаммы: *V. cholerae* eltor O1 И-638, И-1291, 2-01, 129-05-В, 2131, *V. cholerae* O139 И-5, И-16. Препараты наружных мембран (НМ) и мочевиновых экстрактов (МЭ) получали посредством лизиса живых клеток 4,5 М раствором мочевины с последующим дифференциальным центрифугированием. Экстракты НМ получали обработкой Triton X-100 в присутствии ЭДТА с последующим осаждением солюбилизованного материала изопропанолом или сульфатом аммония.

Липолитическую активность определяли модифицированным методом R. G. Jensen [4] в 1 % агарозном геле, содержащем в качестве субстрата неионные детергенты: Triton X-100, Triton X-114, Triton X-305, Triton X-405, Tween-20, Tween-60, Tween-85, Span-85 в конечной концентрации 0,5 %. О наличии липолитической активности судили по образованию зон помутнения вокруг лунок при гидролизе неионных детергентов и выпадения солей уриновой кислоты в осадок. В положительном контроле использовали липазу из свиной поджелудочной железы (марка «Б»), в отрицательном контроле - 0,05 М Трис-НСl буфер, рН 8,3. Активность препаратов оценивали в миллиметрах по ширине (от края лунки) зон липолиза.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины и их ошибки.

#### **Результаты и обсуждение.**

В препаратах субклеточных фракций холерного вибриона (НМ, МЭ) в диффузионных тестах обнаружена липолитическая активность (рисунок 1).

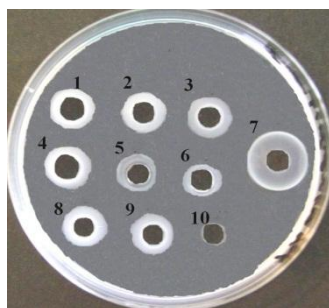


Рисунок 1. Липолитическая активность препаратов субклеточных фракций *V. cholerae* в диффузионном тесте с использованием в качестве субстрата Tween-20.

1 – НМ *V. cholerae* 2131; 2 – НМ *V. cholerae* O139 И-5; 3 – НМ *V. cholerae* И-1330; 4 – НМ *V. cholerae* И-1337; 5 – МЭ *V. cholerae* И-1263; 6 – МЭ *V. cholerae* И-638; 7 – экстракт НМ *V. cholerae* И-1263 после осаждения изопропанолом; 8 – НМ *V. cholerae* O139 И-16; 9 – НМ *V. cholerae* И-1298; 10 – буфер Трис-НСl, рН 8,3

Анализ ферментативной активности выявил различия между препаратами разных штаммов холерного вибриона. Наибольшую липолитическую активность показал препарат экстракта НМ *V. cholerae* И-1263 (см. таблицу), причём активность экстрактов оказалась выше таковой самого препарата НМ в 2 раза.

Таблица: Липолитическая активность субклеточных фракций *V. cholerae*

№ п/п	Номер штамма	Препарат	Размер зон гидролиза (мм)	
			M ± m	
			Tween-20	Triton X-305
1	И-563	НМ	-	4,00 ± 0,04
2	И-638	МЭ	4,00 ± 0,04	-
		НМ	4,00 ± 0,02	-
3	М-878	экстракт НМ	3,00 ± 0,05	-
4	И-1263	МЭ	4,50 ± 0,02	-
		НМ	4,00 ± 0,02	-
		экстракт НМ	8,00 ± 0,04	8,00 ± 0,03
5	И-1291	НМ	5,00 ± 0,03	-
6	И-1298	НМ	5,00 ± 0,03	-
7	И-1330	НМ	5,00 ± 0,03	5,00 ± 0,04
8	И-1337	НМ	5,00 ± 0,03	5,00 ± 0,02
9	И-1342	НМ	-	4,00 ± 0,04
10	2131	НМ	5,00 ± 0,03	5,00 ± 0,03
11	2-01	НМ	-	4,00 ± 0,05
12	129-05-B	НМ	-	1,00 ± 0,04
13	О139 И-5	НМ	5,00 ± 0,03	4,00 ± 0,04
14	О139 И-16	НМ	5,00 ± 0,03	5,00 ± 0,03

Примечание: « - » определение не проводилось.

Повышение липолитической активности в экстракте при сопоставлении с исходными препаратом НМ можно объяснить относительно большим содержанием ферментов в препарате после экстрагирования НМ и последующим преципитированием с помощью сульфата аммония или изопропанолом. Следует заметить, что при дополнительном фракционировании с использованием сульфата аммония или изопропанола различий в степени активности получаемых препаратов отмечено не было.

Сравнительный анализ результатов липолитической активности при использовании липидсодержащих детергентов в качестве субстратов показал, что наибольшую чувствительность к гидролизу препаратами субклеточных фракций холерного вибриона проявили детергенты Triton X-305 и Tween-20. При использовании других детергентов в качестве субстратов липолитическая активность была ниже. По убыванию проявлений степени интенсивности гидролиза препаратами холерного вибриона взятые неионные детергенты можно

расположить в следующем порядке: Triton X-305 ≥ Tween-20 > Tween-60 > Triton X-114 > Triton X-405 > Triton X-100 > Span-85 > Tween-85.

#### **Заключение**

В препаратах субклеточных фракций *V. cholerae* eltor O1 и *V. cholerae* O139 в диффузионных тестах с использованием в качестве субстратов неионных детергентов, содержащих короткоцепочечные жирные кислоты, выявлена липолитическая активность, по величине которой отмечены межштаммовые различия. В качестве субстратов определены неионные детергенты, наиболее подходящие для обнаружения и изучения липолитических ферментов холерного вибриона.

#### **Литература:**

1. Адамов А.К. Метаболический иммунитет к холере / А. К. Адамов. Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1982. 176 с.
2. Телесманич Н.Р. Триацилглицероллипазная активность гемолитических холерных вибрионов / Н.Р. Телесманич // Журн. микробиол. 2004. № 2. С. 11–14.
3. Arpingny J.L. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties / J. L. Arpingny, K.-E. Jaeger // J. Biochem. 1999. Vol. 343, N 1. P. 177–183.
4. Jensen R.G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources / R. G. Jensen // Lipids. 1983. Vol. 18, N 9. P. 650–657.
5. Whayeb S.A. Lysophospholipase L<sub>2</sub> of *Vibrio cholerae* O1 affects cholera toxin production / S. A. Whayeb, K. Yamamoto, M. Y. Castillo // FEMS Immunology and Medical Microbiology. 1996. Vol. 15, N 1. P. 9–15.

УДК 616.981.51:615.371:616-097

### **ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ *BACILLUS ANTHRACIS* 34F<sub>2</sub> STERNE**

*Ж.А. Коновалова, С.А. Витязева, Е.В. Кравец,  
С.В. Лукьянова, К.Ю. Ястремская, В.И. Дубровина*

*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный  
институт Сибири Дальнего Востока»  
г.Иркутск, Россия*

**Аннотация.** Получены два антигенных препарата *Bacillus anthracis* 34F<sub>2</sub> Sterne (S1 и S2), дана их физико-химическая и иммунохимическая характеристики. Изучено влияние экспериментальных антигенных препаратов S1 и S2 на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы в условиях *in vitro*. Установлено их стимулирующее влияние на кислородзависимый метаболизм (НСТ-тест) и антиокислительную способность фагоцитов (активность супероксиддисмутазы).

**Ключевые слова:** антигены сибиреязвенного микроба, иммуногенность, фагоциты

Применяемые в настоящее время вакцинные препараты против сибирской язвы имеют существенные недостатки и нуждаются в совершенствовании. Поиск безопасных средств, способных эффективно стимулировать защитные реакции иммунной системы в ответ на внедрение сибиреязвенного микроба, является актуальным направлением исследований современной медицины в области вакцинопрофилактики.

В настоящее время в качестве перспективных кандидатов для создания профилактических препаратов рассматриваются антигены оболочки бактериальной клетки, в частности белки S-слоя, обладающие иммуногенными свойствами [1, 2].

Представляется вероятным, что получение поверхностных сибиреязвенных антигенов с последующим изучением действия этих антигенов на клетки врожденного иммунитета, позволит оценить их роль в иммунном процессе и возможность применения в сочетании с иммунокорректирующими препаратами для конструирования химических вакцин.

Цель работы: изучить влияние экспериментальных антигенных препаратов *Bacillus anthracis* 34F<sub>2</sub> Sterne на функциональное состояние фагоцитов в условиях *in vitro*.

#### **Материалы и методы**

Антигенные препараты S1 и S2 получены из вакцинного штамма *B. anthracis* 34F<sub>2</sub> Sterne (pXO1<sup>+</sup>pXO2<sup>-</sup>) по методу [2] в нашей модификации.

Анализ полипептидного спектра антигенных препаратов проводили в 12 % полиакриламидном геле в вертикальной камере по методу U. K. Laemmli, M. Favre [4]. Для определения молекулярной массы (м.м.) белков применяли маркеры фирмы «Combithek» (м.м. 12,5; 25; 45; 68; 100 кДа), а также наборы белков – SDS-PAGE molecular weight standards, Broad range, фирмы Bio-Rad (США) с последующей окраской на белки кумасси ярко-синим R-250 [4]. Гели анализировали на гельдокументирующей системе Gel Doc XR+Imaging System, Bio-Rad (США).

Наличие антигенов в экстрактах *B. anthracis* определяли в реакции иммунодиффузии в 1 % агаровом геле с использованием сывороток против экстрагируемого белка С сибиреязвенного микроба (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) и коммерческого сибиреязвенного лошадиного иммуноглобулина (48 ЦНИИ Минобороны России).

Токсическую активность полученных экспериментальных образцов антигенных препаратов проверяли на подкожно инокулированных мышах, LD<sub>50</sub> рассчитывали по общепринятой формуле Кербера.

Животных получали из питомника ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и после карантинизации использовали в опытах. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания, животных выводили из эксперимента в соответствии с Приложением № 4 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» к Приказу Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Перитонеальные макрофаги (ПМ) 50 сертифицированных (НПО «Вектор», Новосибирск) беспородных белых мышей (18-20 г) в дозе (10<sup>6</sup>/0,2 мл) примировали S1, S2 (100 мкг/мл – по содержанию белка) в течение 30 мин при 37 °С в 96-луночных плоскодонных планшетах с последующим определением суммарной активности ферментов дыхательной цепи (НСТ-тест), активности супероксиддисмутазы (СОД) в условиях *in vitro* [5]. Контролем служили клетки интактных животных.

Анализ полученных результатов осуществляли стандартными статистическими методами с использованием пакета программ (StatSoft, USA) STATISTICA 6, Microsoft Excel 2003 и выражали как индекс стимуляции (ИС) в процентах (%) в виде средней арифметической из выборки (М), стандартного отклонения (s). Для сравнения средних арифметических из выборок использовали



U-критерий Манна-Уитни. Результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05 ( $P < 0,05$ ). Эксперименты повторяли 3 раза.

### Результаты исследования и их обсуждение

Антигенные препараты S1 и S2 *B. anthracis* 34F<sub>2</sub> Sterne (лиофильно высушенные) хорошо растворимы в воде. Содержание углеводов в S1 и S2 составляет 16 и 10 %; нуклеиновых кислот – 8 и 5 %; белков – 40 и 60 % соответственно.

Препараты S1 и S2 также существенно различались по полипептидному спектру. В препарате S1 обнаружены лёгкие полипептиды (от 16 до 65 кДа) и отсутствовали полипептиды S-слоя сибиреязвенного микроба с молекулярной массой (м.м.) 92-100 кДа и протективному антигену массой м.м. 84 кДа.

В отличие от S1 препарат S2 образовывал полосу преципитации в реакции иммунодиффузии с иммуноглобулинами к белку S-слоя.

Показано, что антигенные препараты S1 и S2 в дозах от 50 до 400 мкг/кг (по белку) веса не оказывают токсического действия на макроорганизм и LD<sub>50</sub> для лабораторных животных не установлена.

Суммарную активность ферментов дыхательной цепи оценивали в НСТ-тесте (рис. А).

Оба исследуемых препарата (S1 и S2) стимулируют кислородзависимый метаболизм фагоцитов, тем самым повышая их бактерицидную способность. Значения показателей НСТ-теста были выше в 1,7 раз у макрофагов, стимулированных S2 препаратом сибиреязвенного микроба, по сравнению с аналогичными показателями в случае S-1 ( $P < 0,05$ ).

Известно, что СОД играет ключевую роль в антиоксидантной защите организма, катализируя дисмутацию избытка активных форм кислорода в перекись водорода. При изучении активности СОД фагоцитов (рис. Б), примированных S1 и S2, ИС были на уровне контрольных значений ( $1,26 \pm 0,03$  нг СОД/10<sup>6</sup> фагоцитов), что свидетельствует об отсутствии накопления токсических кислородных радикалов в клетках.

Рис.

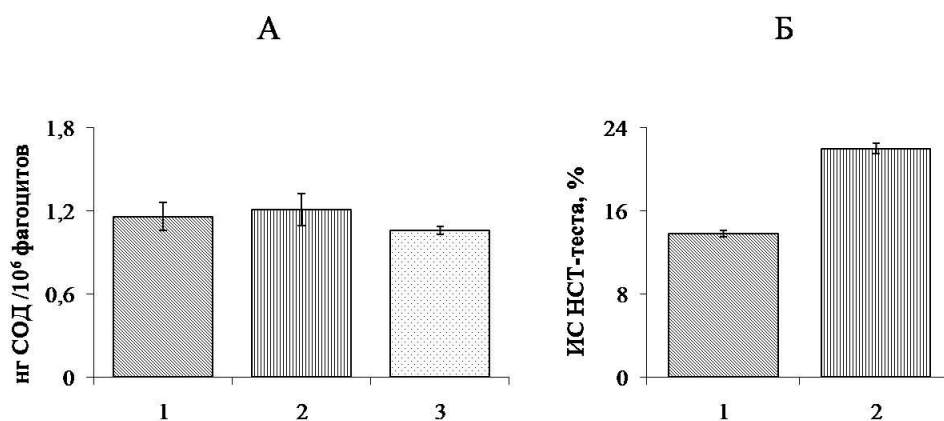


Рисунок. Влияние антигенных препаратов *B. anthracis* 34F<sub>2</sub> Stern на функциональное состояние фагоцитов ( $M \pm s$ )

А – Активность СОД; Б – НСТ-тест. 1 – S1; 2 – S2; 3 – Контроль

### Заключение

Таким образом, при помощи физико-химических и иммунохимических методов установлено, что препараты S1 и S2, выделенные из культуры *B. anthracis* 34F<sub>2</sub> Sterne содержат фракцию полипептидов с молекулярным весом от 15 до 100 кДа. Показано, что способ обеззараживания и выделения белковой

фракции может значительно влиять на антигенную структуру препаратов. Белковый спектр S1, выделенного при помощи осаждения микробного лизата из культуральной жидкости, не содержал протективного антигена (ПА) и белков S-слоя *B. anthracis*. В препарате S2 определён более полный белковый спектр, характерный для экстрактов сибиреязвенного микроба, включающий потенциально иммуногенные полипептиды (84–100 кДа) [4].

На основании результатов оценки действия S1 и S2 сибиреязвенного микроба установлен их стимулирующий эффект на функциональную активность фагоцитов. Между тем, имеется ряд достоверных отличий между S1 и S2. Так, показатели активации ферментов дыхательной цепи фагоцитов при их взаимодействии с S2 были достоверно выше, чем в случае S1. На наш взгляд, вероятным объяснением этому может быть наличие в образце S2-комплекса белков (84 – 100 кДа), которые обладают иммуногенными свойствами.

Проведенные нами исследования являются лишь начальным этапом в изучении иммуногенных свойств выделенных антигенных комплексов и после их дополнительной очистки и более детальной физико-химической характеристики могут рассматриваться в качестве перспективных кандидатов для конструирования на их основе химических сибиреязвенных вакцин.

#### **Литература:**

1. Ariel N. Genome – based bioinformatics selection of chromosomal *Bacillus anthracis* putative vaccine candidates coupled with proteomic identification of surface – associated antigens / N. Ariel, A. Zvi, K.S. Makarova et al. // *Infect. Immun.* – 2003 – Vol. 71, N 3. – P. 4563–4579.
2. Баркова И.А. Иммунодиагностическая оценка белков, продуцируемых штаммами *Bacillus anthracis* с разным профилем плазмид вирулентности: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2007. – 34 с.
3. Методы изучения и оценки спороцидной активности дезинфицирующих и стерилизующих средств: Методические указания. МУ 3.5.2435-09 [доступ 17 мая 2013] Адрес: <http://www.lawmix.ru/medlaw/7257>.
4. Методы общей бактериологии : пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхардт и др. – М., 1984. – Т. 2. – 472 с.
5. Дубровина В.И. Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма / В.И.Дубровина, Ж.А. Коновалова, О.Б. Колесникова, С.А. Татарников, С.А. Витязева, В.В. Войткова, В.Н. Рычкова, С.В. Лукьянова. – Методические рекомендации, Иркутск, 2008. – 12 с.

УДК 616.993:612.017.12

### **ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВАКЦИНАЛЬНОМ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНОМ ИММУНОГЕНЕЗЕ**

М.В. Костюченко, Д.Г. Пономаренко, Н.С. Саркисян, Е.Л. Ракитина,  
О.В. Логвиненко, Т.В.Бердникова

*ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт  
г.Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** В статье приведены результаты иммунофенотипического исследования лимфоцитов крови лабораторных животных при иммунизации *B. abortus 19-ВА*. Описана динамика клеток иммунологической памяти, выявлено преобладание клеточных механизмов иммунитета в индуктивную и адаптивную фазу вакцинального противобруцеллезного иммуногенеза.

**Ключевые слова:** бруцеллез, вакцинальный иммунитет, Т- и В-лимфоциты, клетки иммунологической памяти

Одной из наиболее актуальных проблем, на современном уровне развития медицины, является иммунологическая толерантность к инфекциям. Основу для решения вопросов невосприимчивости организма к патогенам составляет специфическая профилактика – вакцинация [1].

Результаты анализа заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации за последние 5 лет свидетельствуют о сохраняющейся негативной динамике развития эпизоотической и эпидемической обстановки по бруцеллезу, что обусловлено увеличением числа неблагополучных пунктов по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных и ростом числа заболеваний [2]. По данным Роспотребнадзора, в 2012 году на территории РФ зарегистрировано 465 случаев первично диагностированного бруцеллеза.

Единственным способом специфической профилактики бруцеллеза является вакцинация. Для иммунизации людей против бруцеллеза применяется сухая живая вакцина, приготовленная из вакцинного штамма *B. abortus 19-BA*, которая обеспечивает наивысшую напряженность противобруцеллезного иммунитета в течение 5-6 месяцев после иммунизации [3].

Основой для оценки напряженности иммунитета против бруцеллеза, в настоящее время, являются серологические реакции, однако учитывая, что ведущая роль в защите организма от бруцелл принадлежит клеточному звену иммунитета, серологические методы только косвенно могут указывать на напряженность противобруцеллезного иммунитета.

Учитывая вышеизложенное, актуальным в настоящее время является изучение состояния клеточного звена иммунитета в процессе формирования вакцинального иммунитета против бруцеллеза.

Целью настоящих исследований явилось изучение динамики показателей клеточного иммунитета при поствакцинальном противобруцеллезном иммуногенезе.

Для реализации поставленной цели исследовали кровь белых лабораторных мышей иммунизированных вакцинным штаммом *B. Abortus 19 BAV* дозе 0,1 мл.  $10^5$  микробных клеток, подкожно, данные животные составили опытную группу (n=30). Контролем служили интактные животные (n=30), которым вводили стерильный физиологический раствор в том же объеме. Взятие крови осуществляли на 21, 30 и 45 сутки после иммунизации, по 10 животных опытной и контрольной группы в каждый период исследования. Иммунофенотипические исследования клеток крови осуществляли с использованием проточного цитофлюориметра FACS Calibur (BectonDickinson, США) и моноклональных антител Invitrogen (США). В крови животных определяли содержание Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), Т-цитотоксических (CD8<sup>+</sup>), В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>) и клеток иммунной памяти (CD44<sup>+</sup>).

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью программы Statistica 6.0.

Анализируя результаты исследования крови лабораторных животных на 21 сутки после иммунизации *B. Abortus 19 BA*, выявлено статистически значимое повышение уровня Т-хелперов до  $38,4 \pm 1,5\%$  ( $p \leq 0,05$ ), при этом уровень общего количества Т-лимфоцитов ( $72,05 \pm 2,7\%$ ) и клеток CD8<sup>+</sup> ( $35,24 \pm 1,6\%$ ) имел тенденцию к увеличению. Количество В-лимфоцитов у животных после иммунизации в данный период исследования не изменилось. Рассматривая динамику клеток несущих маркер иммунологической памяти (CD44<sup>+</sup>)

установлено выраженное повышение количества данной популяции в сравнении с контролем (71,2±3,97%) до 89,9±3,05% (Таб.1).

Таблица 1. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов крови животных на 21 сутки после иммунизации *B. Abortus 19 BA*

Показатель	Контроль, n=10	Опыт, n=10
CD3 <sup>+</sup>	68,8±2,85	72,05±3,9
CD4 <sup>+</sup>	30,1±1,18	38,4±1,50*
CD8 <sup>+</sup>	32,4±2,03	35,2±2,59
CD19 <sup>+</sup>	22,6±2,78	23,6±2,29
CD44 <sup>+</sup>	71,2±3,97	89,9±3,05*

\*- разница достоверна при  $p \leq 0,05$

В процессе формирования поствакцинального иммунитета против бруцеллеза на 30 сутки, установлено статистически значимое увеличение количества клеток CD4<sup>+</sup> - 37,6±1,92% ( $p \leq 0,05$ ) и снижение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов - 23,4±1,70% ( $p \leq 0,05$ ) в сравнении с показателями в контрольной группе, в которой данные значения составили 31,7±2,12% и 33,2±2,43%, соответственно. В указанный период исследования выявлена активация В-системы иммунитета, что выражается в увеличении синтеза в организме иммунизированных особей клеток CD19<sup>+</sup> в среднем до 27,04±1,74%. Выявлено дальнейшее повышение количества клеток обуславливающих иммунологическую память, так в данный период определено увеличение CD44<sup>+</sup> до 94,01±1,08%. (Таб.2).

Таблица 2. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов крови животных на 30 сутки после иммунизации *B. Abortus 19 BA*

Показатель	Контроль, n=10	Опыт, n=10
CD3 <sup>+</sup>	70,3±1,93	67,8±2,05
CD4 <sup>+</sup>	31,7±2,21	37,6±1,02*
CD8 <sup>+</sup>	33,2±2,43	23,4±1,70*
CD19 <sup>+</sup>	21,7±1,46	27,04±1,74*
CD44 <sup>+</sup>	73,6±6,20	94,01±1,08*

\*- разница достоверна при  $p \leq 0,05$

Подвергая анализу результаты иммунологического исследования крови мышей на 45 сутки после иммунизации *B. Abortus 19 BA*, определена тенденция к увеличению общего количества Т-лимфоцитов, выявлено снижение количества Т-хелперов до уровня контрольных значений, при этом установлено повторное повышение количества цитотоксических Т-лимфоцитов до 37,6±1,70%. Уровень В-лимфоцитов не имел достоверной разницы в сравнении с данными контрольной группы, количество клеток иммунологической памяти оставалось достоверно высоким (92,2±4,27%) (Таб.3).

Таблица 3. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов крови животных на 45 сутки после иммунизации *B. Abortus 19 BA*

Показатель	Контроль, n=10	Опыт, n=10
CD3 <sup>+</sup>	69,30±2,51	76,2±3,84
CD4 <sup>+</sup>	28,6±1,78	30,3±2,97
CD8 <sup>+</sup>	31,3±1,12	37,6±1,17*
CD19 <sup>+</sup>	22,3±1,83	22,05±2,91
CD44 <sup>+</sup>	74,2±5,33	92,2±1,08*

\*- разница достоверна при  $p \leq 0,05$

Таким образом, проведенные исследования указывают, что на ранних этапах формирования (21 сутки) вакцинального противобруцеллезного клеточного иммунитета выражено повышение синтеза Т-хелперов, что мы связываем с увеличением их функциональной активности, это способствует формированию пролиферативной фазы иммунитета за счет презентации фрагментов чужеродного антигена иммунокомпетентным клеткам. На 30 сутки после иммунизации установлено снижения уровня клеток с фенотипом CD8<sup>+</sup>, что вероятно вызвано активной миграцией цитотоксических Т-лимфоцитов в иммунные органы, обуславливая реализацию клеточного иммунитета. Повышение уровня В-лимфоцитов в данный период исследования, по нашему мнению, связано активацией CD4<sup>+</sup>, которые непосредственно взаимодействуют с предшественниками антителопродуцирующих клеток.

Повышение количества цитотоксических Т-лимфоцитов на 45 сутки эксперимента обусловлено формированием адаптивного иммунитета, ведущим механизмом, которого в данном случае является клеточное звено.

Исследования динамики клеток, формирующих иммунологическую память, выявили активизацию их синтеза с 21 по 45 сутки (периоды исследования) после иммунизации.

Проведенные исследования указывают на выраженность клеточных механизмов иммунитета в пролиферативную и продуктивную фазу вакцинального противобруцеллезного иммуногенеза.

#### **Литература:**

1. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике /А.А. Кишкун-М.: Медицинское информационное агентство, 2009 – 711с.
2. Лямкин Г.И., Современная эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации/ Г.И. Лямкин, Н.И. Тихенко, Д.В. Русанова, Е.А. Манин // Мат. Всерос. науч-практ. конф. Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных.: Ставрополь: «Экспо-Медиа»,2012.-с.51-52
3. Профилактика бруцеллеза. Санитарно-эпидемиологические правила, СП 3.1.7.2613-10

УДК 616.9:616-07

### **ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДИАГНОСТИКУМА ЭРИТРОЦИТАРНОГО МЕЛИОИДОЗНОГО АНТИГЕННОГО СУХОГО**

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

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»  
г. Волгоград. Россия*

**Аннотация.** Получен диагностикум эритроцитарный мелиоидозный антигенный сухой на основе водно-солевого экстракта авирулентного штамма *B. pseudomallei* 107. Специфическую активность препарата изучали в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) на наборе 24 сывороток экспериментальных животных. Показана возможность внедрения диагностикума в практику с целью выявления специфических антител к возбудителям мелиоидоза и сапа.

**Ключевые слова:** Реакция непрямой гемагглютинации, эритроцитарный диагностикум, мелиоидоз, сап, *B. pseudomallei*, *B. mallei*

Сап и мелиоидоз относят к особо опасным инфекциям II группы патогенности, этиологическим фактором которых являются грамотрицательные бактерии *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*.

Средств специфической профилактики особо опасных буркхольдериозов не существует, лечение осложнено полирезистентностью возбудителей к лекарственным средствам, в том числе и резервного ряда [1]. К тому же, на сегодняшний день в условиях все более увеличивающихся миграционных потоков, развития туризма и уровней коммуникации населения, а также в преддверии предстоящих Международных спортивных форумов вероятность завозных случаев этих инфекций в нашу страну резко возрастает.

В связи с этим своевременная и экстренная диагностика сапа и мелиоидоза приобретает особую актуальность.

Методы, направленные на обнаружение в биологических жидкостях больных людей антител к возбудителям сапа и мелиоидоза и определение уровня иммунного ответа с помощью иммунологических тест-систем (РИД, РСК, ВИЭФ, РНГА, ТИФМ и др.), позволяют провести диагностику инфекционных заболеваний в ранние сроки и с высокой степенью достоверности [3].

РНГА основана на взаимодействии специфических антител с антигенами, сенсibiliзирующими эритроциты, с образованием визуализируемых гемагглютинатов. Диагностическая значимость реакции непрямой гемагглютинации напрямую связана с качеством используемого диагностикума и, прежде всего, его специфической активностью.

В ходе исследования была отработана оптимальная схема приготовления диагностикума эритроцитарного мелиоидозного антигенного сухого. Для сенсibiliзации эритроцитов барана выбран антигенный комплекс авирулентного штамма возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* 107.

Формализацию осуществляли согласно методике Меньшова-Шмута [3]. При этом с целью более эффективной сенсibiliзации эритроцитарных клеток проводили дополнительную подготовку их поверхности, обрабатывая формализированные эритроциты танином. Взвесь эритроцитов 2,5 % концентрации инкубировали в равных объемах с раствором танина в исходном разведении 1:20000 на водяной бане при 37°C в течение 15 мин.

Сенсibiliзацию носителя с антигенным комплексом проводили при 45° в течение 90 мин в 0,01 М фосфатно-солевом буфере pH 5,9 на водяной бане с шейкером. Для удаления несвязавшегося сенситина эритроциты, нагруженные антигенами, отмывали 0,15 М раствором NaCl (pH 7,2) путем их центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин.

Осадок ресуспендировали в этом же буферном растворе, доводя концентрацию сенсibiliзированных эритроцитов до 2,5%.

Полученные серии препарата были подвергнуты лиофильному высушиванию в протективной среде, которая содержала 15 % реополиглобина и 7,5 % сахарозы. Ампулы с диагностикумом в среде высушивания предварительно замораживали при -70 °С. При лиофилизации плавно изменяли температуру полка от -70 °С до 0 °С в течение 14 ч и в последующие 10-12 ч до +25 °С. В целом общее время высушивания составляло 24-26 ч.

Качество диагностикума до и после лиофилизации проверяли с козьими и кроличьими гипериммунными сыворотками, которые были получены путем еженедельной многоциклового иммунизации животных инактивированной взвесью возбудителя мелиоидоза в убывающих концентрациях от  $10^9$  до  $1,25 \cdot 10^8$ . Сыворотки, иммунологическая активность которых по результатам РИД составляла 1:16-1:32, были использованы в дальнейшем в РНГА с эритроцитарным мелиоидозным антигенным диагностикумом.

РНГА считали положительной, если в опытной лунке эритроциты равномерно распределялись по всему дну, формируя «зонтик», на 3+4+ по общепринятым стандартам учета реакции [2].

Аналитические характеристики диагностикума были изучены на наборе из 24 сывороток, в которые входили 19 иммунных сывороток экспериментальных животных (9 мелиоидозных и сапных сывороток кроликов, 10 мелиоидозных и сапных сывороток коз) и 5 интактных контрольных сывороток (белой крысы, белой мыши, морских свинок, золотистого хомячка, козы и кролика).

Для повышения достоверности полученных результатов опыты проводили с 3 сериями препарата.

В результате было установлено, что в иммунных сапных и мелиоидозных сыворотках титры РНГА с разработанным диагностикумом составили в сыворотках кроликов 1:1600 – 1:20480 и в сыворотках коз – от 1:6400 до 1:204800. С контрольными сыворотками интактных животных в титрах от 1:20 и выше ложноположительных результатов не наблюдалось.

По результатам РНГА было установлено, что лиофилизация в щадящем режиме позволила сохранить активность всех полученных серий препарата без снижения титров реакции.

Значительно более высокий уровень антителообразования в организме мелкого рогатого скота, с нашей точки зрения, может быть связан с высокой концентрацией общего белка в козлиных сыворотках в норме (до 70-80 мг/мл).

Таким образом, на основе мелиоидозного антигенного комплекса авирулентного штамма *B. pseudomallei* 107 нами был создан диагностикум эритроцитарный мелиоидозный антигенный сухой, способный выявлять в РНГА специфические иммуноглобулины к возбудителям мелиоидоза и сапа в титрах до 1:204800, что подтверждает как его высокую специфическую активность, так и возможность использования в РНГА при экспресс-диагностике особо опасных буркхольдериозов.

#### **Выводы:**

1. Специфическая активность диагностикума эритроцитарного мелиоидозного антигенного сухого оценена на наборе 19 гипериммунных кроличьих и козьих сывороток и составила 1:1600-1:20480 и 1:6400 – 1:204800 соответственно, при этом с контрольными сыворотками лабораторных животных ложноположительных результатов не наблюдалось.
2. РНГА с диагностикумом на основе антигенного комплекса инактивированных клеток авирулентного штамма *B.pseudomallei* 107 позволяет выявлять в сыворотках специфические антитела к возбудителям сапа и мелиоидоза и может быть использована как экспресс-метод иммуноанализа на этапах лабораторной диагностики особо опасных буркхольдериозов.
3. Лиофилизация в щадящем режиме позволяет полностью сохранить специфическую активность диагностикума эритроцитарного мелиоидозного антигенного и таким образом существенно увеличить срок годности препарата.

#### **Литература:**

1. White N.J. Melioidosis.//Lancet - 2003, № 361-Р. 1715-22.
2. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. //Практическое руководство. Под ред. академика РАМН, проф. Г.Г. Онищенко.- М.: ЗАО «МП Гигиена», - 2006, 280 с.
3. Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., Рыбкин В.С., Липницкий А.В., Яковлев А.Т., Кулаков М.Я., Новицкая И.В., Ахмедов А.Н., Прохвятилова Е.В. Иммунологическая диагностика мелиоидоза. //Мелиоидоз Сб. науч. тр. Под ред. Н.Г. Тихонова.- 1995. - С.224.

**ПОДБОР ЭЛЮЕНТОВ ДЛЯ РАЗРЫВА СВЯЗИ АНТИГЕНА С  
АНТИТЕЛАМИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА МАГНИТНОЙ  
МАТРИЦЕ, С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ПОСТАНОВКОЙ ПЦР И ОЦЕНКА  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

*С.А.Курчева, Ю.Ю.Гаркуша, О.А. Гнусарева, Д.А. Ковалёв*

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
г.Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** Приведены результаты изучения условий элюциитуляремию микробареагентами различного химического состава с сохранением биологических свойств патогена после селективного концентрирования на поверхности микрочастиц аффинного сорбента с магнитными свойствами для последующей его индикации в полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов.

**Ключевые слова:** магноиммуносорбент (МИС), элюент, полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Методы иммуномагнитной сепарации находят широкое применение в области лабораторной диагностики инфекционных болезней и санитарно-эпидемиологических исследований, то есть именно там, где требуется высокочувствительная детекция микроорганизмов в сложных (контаминированных, загрязненных ингибиторами и т.д.) образцах с низкой концентрацией микроорганизмов [1,2,4].

В связи с этим, экспериментальное исследование методов элюции селективно сконцентрированного патогена на МИС для последующей постановки ПЦР, требует рационального подхода. С целью оптимизации условий элюции и сохранения целостности возбудителя в процессе элюирования необходимо проверить и учесть значительное количество параметров: состав и свойства самой матрицы; рН, молярность и объем элюентов; температурные и временные характеристики инкубации. Для элюции патогена применяются различные реагенты и методики. Их разнообразие зависит от природы используемой матрицы, элюируемого патогена и цели элюирования.

Нами проведен ряд экспериментов по элюции туляремию микроба с МИС. Учитывая особенности магнитной матрицы и химические свойства элюирующих растворов был апробирован ряд элюентов, с последующим выявлением ДНК возбудителя туляремии методом ПЦР. Выявление ДНК *F.tularensis* проводили методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов на основании амплификации фрагмента видоспецифического участка хромосомы [5]. Регистрацию результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1,7 % агарозном геле с использованием коммерческих наборов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле «ЭФ». Электрофорез проводили при напряжении 10 В/см в течение 25-30 мин. Результаты учитывали на основании наличия на электрофореграмме специфических полос амплификационной ДНК.

Постановка ПЦР после применения элюирующих растворов с использованием наборов реагентов для выявления ДНК туляремию микроба методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов «*Francisellatularensismultiplex-Eph*» производства ФКУЗ



Ставропольский противочумный институт (экспериментальные серии) и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора «Ген Francisella tularensis-РЭФ» дала идентичные результаты, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1.- Выявление ДНК возбудителя туляремии методом ПЦР при использовании различных элюентов.

№ п/п	Элюент	Результат выявления ДНК туляремии
1.	0,2 М КОН	–
2.	0,3 М КОН	–
3.	0,4 М КОН	–
4.	ТЕ буфер с набора ПЦР	–
5.	0,1 М трис -НСI	–
6.	0,3 М тринатрийфосфат	–
7.	0,1 М цитрат натрия	+
8.	0,1 М тринатрийфосфат	+
9.	80 % ацедилпепсин	+
10.	электродный буфер	–
11.	0,2 М гидрофосфат натрия	–
12.	60 % ацетонитрил	+
13.	0,1 М лимонная кислота : 0,2 М тринатрийфосфат (9:1)	+

Из таблицы следует, что положительные результаты получены при использовании в качестве элюентов – 0,1 М тринатрийфосфата; 0,1 М цитрата натрия; 60 % ацетонитрила; 80 % раствора ацедилпепсина и 0,1 М раствора лимонной кислоты с 0,2 М раствором тринатрийфосфата в соотношении 9:1.

В дальнейшем, для упрощения выявления возбудителя туляремии после селективного концентрирования его на МИС (без предварительной элюции) были испытаны еще два способа:

1. Кипячение МИС в течение 30 мин. после его инкубации с антигеном и удаления несвязавшегося патогена;

2. Добавление лизирующего буфера на основе 6 М гуанидинизотиоцианата, в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубации в течение 15 мин при температуре (65±1) °С.

Испытания показали положительные результаты в обоих случаях.

Таким образом, при проведении санитарно-эпидемиологических исследований сложных контаминированных образцов большого объема для индикации возбудителя туляремии с помощью ПЦР целесообразно провести его селективное концентрирование на МИС, а далее постановку ПЦР проводить согласно инструкции по применению набора реагентов, т.е. обеззараживание и добавление лизирующего буфера на основе 6 М гуанидинизотиоцианата или использовать метод кипячения МИС.

#### **Литература:**

1. Афанасьев Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Ростов, 2000. – 45 с.
2. Способ получения иммуносорбента (варианты): пат. 2138813 / И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, В.И. Ефременко [и др.]. – Рос. Федерация. № 97119147/13; заявл. 20.11.1997; опубл. 27.09.1999, Бюл. № 27.

3. Курчева С.А. Разработка биотехнологии производства иммунобиологических препаратов для выявления возбудителя туляремии // Вестник Московского государственного областного университета. Серия «Естественные науки». – 2011. № 3. – С. 55–57.
4. Тюменцева И.С. Научно-методические основы конструирования и усовершенствования производства диагностических тест-систем для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций: автореф. дис. ... д-ра мед.наук. – Ставрополь, 1996. – 57с.
5. Солодовников Б.В., Зайцев А.А., Гнусарева О.А. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) при исследовании иксодовых клещей на туляремию// Актуальные проблемы предупреждения ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ: материалы X Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (5-6 октября, 2010 г., Ставрополь).–Ставрополь, 2010. – С.227–228.

УДК 616.99

### **ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ СМЕШАННЫХ ПАРАЗИТАРНЫХ ИНВАЗИЙ**

*Л.И. Лукманова, В.Ф. Махмутов, Л.И. Шамсиярова, М.И. Лукманов*

*ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»  
г. Уфа, Россия*

**Аннотация.** Целью работы явилось изучение смешанных инвазий цистного эхинококкоза с другими гельминтозами (аскаридоз, токсокароз, описторхоз, трихинеллез) и протозоозом (лямблиоз). Под наблюдением находились 103 больных. У 95 больных диагностировали эхинококкоз без сопутствующих паразитозов, у 8 - в сочетании с другими инвазиями. Наиболее часто (5%) встречались смешанные поражения с токсокарозом, реже – с лямблиозом (2%) и аскаридозом (1%). Сочетания эхинококкоза с описторхозом и трихинеллезом не обнаружены. Таким образом, частота сочетанных форм была существенно ниже, чем моноинвазии ЦЭ ( $p > 0,05$ ) несмотря на то, что факторы заражения и меры профилактики у этих паразитозов схожи. Исследования на плодородность эхинококковых пузырей при моно- и микст-инвазиях значительных различий не выявили.

**Ключевые слова:** цистный эхинококкоз, гельминтозы, лямблиоз, смешанные инвазии

Паразитарные болезни широко распространены среди населения мира. В России ежегодно регистрируется около 1 миллиона больных гельминтозами и протозоозами. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике, высокий уровень заболеваемости остается актуальной проблемой медицинской паразитологии. Наименее изученной является эпидемиология и патогенез смешанных или микст-инвазий. Е.П. Павловским (1937) для обозначения эволюционно сформировавшегося сожительства паразитов облигатных для определенного вида хозяев введено понятие паразитоценоз. Сочленами паразитоценоза могут становиться полезные и индифферентные для организма хозяина симбионты, так как они способны оказывать влияние на жизнедеятельность и вирулентность паразитов.

Взаимоотношения между сочленами паразитоценоза зависят также от состояния организма хозяина. Доказано, что структурно-функциональная организация паразитоценозов влияет на морфологические и физиологические особенности паразитов, их репродуктивное состояние, продолжительность жизни и патогенность [3]. Присутствие некоторых паразитов может повышать восприимчивость больного к другим возбудителям болезней. В результате синергизма патогенов могут возникнуть ассоциативные болезни. Ассоциативные паразитарные болезни отличаются более длительным и тяжелым течением. Например, токсоплазмоз, саркоцистоз и пневмоцистоз протекают более тяжело у больных СПИД; гельминтозы отягощают течение туберкулеза и вирусного гепатита.

Взаимодействия сочленов паразитоценоза является сложным процессом, изучение которого представляет собой одно из направлений современной паразитологии и экологии. До настоящего времени мало изучены патогенез, эпидемиология, вопросы диагностики, терапии ассоциативных паразитозов, что обуславливает актуальность этой проблемы. Литературные данные свидетельствуют о возможности трех вариантов взаимоотношений гельминтов между собой и с простейшими в организме одного хозяина: симбиотическом, антагонистическом и индифферентном [1, 3, 4]. Например, при смешанной инвазии острицами и карликовым цепнем наблюдается симбиотическое сожительство, ухудшающее состояние больного. Между аскаридами, власоглавами и острицами выявлены антагонистические отношения. Индифферентные отношения отмечаются между острицами и лямблиями.

Целью настоящей работы явилось изучение частоты встречаемости смешанных инвазий цистного эхинококкоза с другими гельминтозами и протозоозом.

Под наблюдением находились 103 больных цистным эхинококкозом (ЦЭ). Все обследуемые – сельские (81%) или городские (19%) жители Республики Башкортостан (РБ). Среди них 61% - лиц женского и 39% - мужского пола. Диагноз ЦЭ установлен на основании данных УЗИ и подтвержден исследованием стенки кисты после эхинококкэктомии. Иммуноглобулины класса IgG к антигенам выявляли, согласно инструкции по применению, в сыворотке венозной крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Использовали диагностические тест-системы компании ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Исследовали наиболее распространенные в РБ гельминтозы: аскаридоз, токсокароз, описторхоз, трихинеллез и протозооз – лямблиоз [5].

Анализировали плодородность (фертильность) эхинококковых пузырей при моно- и микст-инвазиях. Для определения показателя плодородности подсчитывали количество протосколексов в 1 мл пузырной жидкости [2].

У 95 больных (92%) диагностировали ЦЭ без сопутствующих паразитозов, у 8 (8%) - в сочетании с другими инвазиями. Наиболее часто (5%) встречались смешанные поражения ЦЭ с токсокарозом, в меньшей степени – с лямблиозом (2%) и аскаридозом (1%). Сочетания ЦЭ с описторхозом и трихинеллезом не обнаружены. Обращает на себя внимание, что частота встречаемости сочетанных форм существенно ниже, чем моноинвазии ЦЭ ( $p > 0,05$ ) несмотря на то, что факторы заражения и меры профилактики при эхинококкозе, лямблиозе, аскаридозе и токсокарозе схожи.

Исследования на плодородность эхинококковых пузырей, выявленных у больных ЦЭ при моно- и микст-инвазиях, значительных различий в числе протосколексов не выявили. При моноинвазии ЦЭ количество протосколексов в 1 мл пузырной жидкости составило  $790 \pm 78$ . При смешанной инвазии ЦЭ и токсокароза показатель плодородности составил  $815 \pm 93$ ; при ЦЭ и лямблиозе

623±54; при ЦЭ и аскаридозе 751±35. Эхинококковые пузыри являются ведущим звеном в передаче инвазии, поэтому плодородность во многом определяет их эпидемиологическую значимость в процессе распространения. При гельминтозах тяжесть течения заболевания у хозяина определяется интенсивностью инвазии (плодовитостью паразита). При высокой плодородности эхинококковых пузырей чаще наблюдаются рецидивы после хирургической эхинококэктомии. Поэтому обнаружение микст-инвазий при которых повышается плодородность эхинококка имеет большое значение в медицине.

Таким образом, проведенные исследования показали, что частота встречаемости микст-инвазии цистного эхинококкоза с изученными паразитами невысока. Плодородность эхинококковых пузырей при микст-инвазиях эхинококкоза с аскаридозом, токсокарозом, описторхозом, трихинеллезом и лямблиозом значительных различий не имела.

#### **Литература:**

1. Бухарин, О.В. Роль ассоциативных микросимбионтов в функционировании ассоциативного симбиоза / О.В. Бухарин, Е.А. Кремлева, А.В. Сгибнев // Журн. микробиол., 2012. - №6. – С. 89-95.
2. Журавец, А.К. Цистный эхинококкоз – гидатидная болезнь животных и человека. – Новочеркасск, 2004. - 507 с.
3. Паразитарные болезни человека (протозоозы и гельминтозы): Руководство для врачей /Под ред. В.П. Сергиева, Ю.В. Лобзина, С.С. Козлова. – СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2008. – 592 с.: ил.
4. Савинов, А.Б. Развитие симбиотической парадигмы / А.Б. Савинов // Мат. Межд. научной конф. (30 нояб. – 3 дек. 2010) «Теоретические и практические проблемы паразитологии», Москва: Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцева РАН, 2010. – С. 331-333.
5. Туйгунов М.М. Проблема гельминтозов в Республике Башкортостан / М.М. Туйгунов, М.И. Лукманов, Р.Г. Фазлаев, Г.И. Лукманова // Мед. паразитол. – 2012. - №3. – С. 8-11.

УДК 614.8-084

### **СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ФКУЗ ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАЗОРА**

*Е.В.Молчанова, Н.П.Агеева*

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»  
г.Волгоград, Россия*

**Аннотация.** Обеспечение биологической безопасности на территории Российской Федерации может быть достигнуто в результате своевременной модернизации инженерно-технического и усовершенствования профессионального уровня человеческого факторов на всех биологически опасных объектах. ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора относится к предприятиям III класса опасности. Реконструкция лабораторных корпусов позволила заменить технологически устаревшие и физически изношенные системы жизнеобеспечения и оборудование. Эпидемиологический и бактериологический мониторинг позволяет контролировать работу с микроорганизмами, состояние здоровья сотрудников и эффективность инженерных систем биологической безопасности.

**Ключевые слова:** биологическая безопасность, эпидемиологический и бактериологический мониторинг, возбудители ООИ

В соответствии с реализуемой концепцией федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» особое внимание уделяется потенциально опасным биологическим объектам, а именно, организациям, в которых проводятся работы с патогенными биологическими агентами (ПБА). Субъект Российской Федерации Волгоградская область на своей территории имеет отдел особо опасных инфекций в составе трех учреждений: ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области», ГУЗ «Волгоградская областная клиническая инфекционная больница № 1» и ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Последнее, как биологически опасный объект, имеет основное значение.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора относится к учреждениям микробиологического профиля, в научных подразделениях которого хранятся и используются в исследовательских целях ПБА I-IV групп.

В целях обеспечения биологической безопасности работающего персонала, населения и окружающей среды в институте постоянно совершенствуется организационные, технические, медицинские и социальные мероприятия, составляющие функциональную основу системы биобезопасности. Данный комплекс позволяет минимизировать потенциальную опасность объекта за счет повышения надежности технических систем и технологических процессов, а также «человеческого фактора».

Биобезопасность в первую очередь обеспечивается эффективной организацией и соответствующим контролем. Соблюдение в структурных подразделениях режима безопасной работы с ПБА I-IV групп и исполнение приказов и других документов вышестоящих организаций и администрации института обеспечивается комиссией по контролю выполнения требований биологической безопасности (КББ) в составе 7 человек. Данным органом на основе регламентирующих нормативных актов [1, 2, 4] разработана внутриинститутская документация, предусматривающая соблюдение требований с учетом особенностей института (географическим расположением, инфраструктурой района, климатом и т.д.). Каждый квартал членами КББ проводится проверка лабораторий института, при которой особое внимание уделяется учету и хранению, а также передаче объектов патогенов I-IV групп, наличию и правильности приготовления и использования дезинфицирующих растворов, работе автоклавов, состоянию фильтров вентиляционных систем боксов безопасности, контролю за их техническим состоянием, проведению проверок на обсемененность, соответствию защитной одежды и выполнению противоэпидемического режима в заразной и чистой зонах, а также проведению занятий по ликвидации учебных аварий.

Еще один из основных факторов, негативно влияющих на состояние биологической безопасности любого учреждения – это износ специализированного оборудования и технических систем, а также применение устаревших технологий.

Проведенная модернизация двух лабораторных корпусов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, в период 2008 – 2011 гг. обеспечила замену морально и технологически устаревшего оборудования на новое современное с минимальными шумовыми характеристиками и шумоглушителями. Все боксовые

помещения для работ с ПБА I-II групп были оснащены ламинарными шкафами микробиологической безопасности II класса защиты Kojair GL-130 или III класса защиты Kojair KC-III (Finland) и вытяжной вентиляцией с высокоэффективными ячеювыми складчатыми фильтрами типа ФяС и HEPA с эффективностью очистки от аэрозолей до 99,5% -99,9% автономного характера. Обслуживание и контроль параметров, характеризующих эффективность функционирования инженерных систем обеспечения биологической безопасности, проверку надежности запуска резервного оборудования проводят квалифицированные специалисты инженерно-технической службы, имеющие соответствующие лицензии и сертификаты. Введение в эксплуатацию современных технологий и оборудования определило разработку специалистами института соответствующих инструкций и методических рекомендаций, направленных на обеспечение биобезопасной работы.

Общеизвестна ведущая роль «человеческого фактора» (разработчиков, эксплуатационников, пользователей, руководителей всех уровней) в обеспечении надежности работ. Наблюдающееся сокращение числа образовательных учреждений, снижение уровня профессиональной подготовки специалистов и экономическая ситуация в 90-х гг. XX века привели к снижению квалификации и численности персонала научно-исследовательских институтов и отступлению от технологических норм. Поэтому на сегодня наиболее важным моментом обеспечения биобезопасности является подбор персонала для работ с возбудителями особо опасных инфекций (ООИ). Сотрудники, работающие в условиях повышенной опасности, морально и психологически ответственны за здоровье и жизни окружающих людей. При приеме на работу будущий сотрудник проходит предварительное собеседование, в ходе которого выясняется наличие качеств, необходимых для работников противочумной системы, как условие положительного решения: отсутствие хронических заболеваний, коммуникабельность, умение подчиняться требованиям, нормам, стрессоустойчивость, интеллект, дисциплинированность, высокая работоспособность, адаптивность, умение принимать быстрое решение в критической ситуации и др. [3].

Гарантия безопасной работы каждого отдельного сотрудника и всего коллектива достигается системой его профессиональной подготовки. Регламентируемые СП 1.3.1285-03 формы допуска согласно внутриинститутской документации несколько расширены. Так, по прохождении курсов специализации по особо опасным инфекциям сотрудники приказом директора допускаются к работе с микроорганизмами I-II групп патогенности с определенными ограничениями, т.е. они работают под контролем заведующего отделом (лабораторией). После приобретения определенного опыта и необходимых навыков не менее чем через год по ходатайству заведующего, по прохождению внеочередной аттестации по соблюдению требований биологической безопасности и практическим навыкам бактериологии, они могут получить допуск к самостоятельной работе. Еще одной мерой усиления биобезопасности является подготовленный и ежегодно проводимый специальный цикл лекций программы курсов по соблюдению требований биологической безопасности для инженерно-технического персонала.

Каждый год в структурных подразделениях института, осуществляющих работу с ПБА I-II групп, проводятся тренировочные занятия по отработке алгоритмов поведения при возникновении аварийных ситуаций. Раз в два года все сотрудники сдают зачет на знание требований биологической безопасности при работе с микроорганизмами I-II групп патогенности и два раза в год – инструктаж по профессиональной технике безопасности.

Таким образом, модернизация базовых элементов лабораторных корпусов позволила заменить морально, технологически устаревшие и физически изношенные системы жизнеобеспечения и оборудование. Условия, созданные в учреждении для работ с возбудителями ООИ, минимизируют угрозы, связанные с хранением, обращением и передачей опасных биологических агентов, что обеспечивает биологическую безопасность с учетом современных требований, как для работающего персонала ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, так и для окружающей среды. Вместе с тем, считаем необходимым дальнейшую разработку эффективных систем мониторинга и контроля, направленных на выявление и предотвращение угроз в области биологической безопасности включающих своевременное аппаратное обновление существующих технологий и совершенствование системы подготовки, переподготовки и аттестации квалифицированных (в том числе руководящих) кадров, а также повышение трудовой и технологической дисциплины.

#### **Литература:**

1. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03 // Бюл. норм. док. госсанэпиднадзора. – 2003. – № 3 (13). – С. 66 – 144.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV гр. патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. – 75 с.
3. Малюкова Т.А., Лоцманова Е.Ю., Бойко А.В., Тихомирова Л.А., Растунцева Е.В., Юсупова З.С., Сазанова Е.В. Профессионально важные качества персонала, допускаемого к работам с ПБА I-II групп // Пробл. особо опасных инф. 2009. №2 (100). с 17 – 21.
4. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-II групп патогенности. Санитарно-эпидемиологические правила. СП.1.2.036-95 / Госкомсанэпиднадзор России. – М.: Информ. издат. центр, 1995. – 93 с.

УДК 616-074:616.341

### **КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦЕЛИАКИИ В ВОЛГОГРАДСКОМ РЕГИОНЕ**

*И.В. Новицкая, П.А. Бовт*

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»  
г.Волгоград, Россия*

**Аннотация.** В работе представлен анализ историй болезней 216 пациентов с диагнозом целиакия, наблюдавшихся в лечебных учреждениях города Волгограда и области. Оценены клинические проявления заболевания, выделены типичная, атипичная и латентная формы. Проведено исследование уровня глиадиновых, эндомизийных и ретикулиновых антител в сыворотках обследуемых. Определена степень выявляемости целиакии в разных регионах Волгоградской области. Оценена эффективность безглютеновой диетотерапии.

**Ключевые слова:** целиакия, глиадиновые антитела, эндомизийные антитела, ретикулиновые антитела, безглютеновая диетотерапия

Целиакия – наследственное заболевание тонкого кишечника, характеризующееся обратимой атрофией слизистой оболочки кишечника, которая сопровождается нарушением всасывания нутриентов и развитием синдрома мальабсорбции различной степени выраженности.

Вариабельность клинических форм целиакии нередко приводит к трудностям в диагностике заболевания и назначению неадекватной терапии, что свидетельствует о необходимости повышения осведомленности врачей и населения о данном заболевании.

Целью нашей работы явилась оценка клинических проявлений заболевания и показателей лабораторных методов исследования при глютеновой энтеропатии в Волгоградском регионе.

Анализ клинической картины пациентов с верифицированным диагнозом целиакии позволил выделить основные формы заболевания, а также установить, что типичная форма (низкие весовые прибавки, диарея, сниженный аппетит, эпигастральные боли, рвота) наблюдалась у 75,5% больных Волгограда и области, атипичная (атопический дерматит, задержка психоречевого развития, частичная алопеция и др.) и латентная (заболевание длительно протекает скрыто и впервые проявляется во взрослом возрасте) в 22,5% и 2% случаев соответственно.

При этом в структуре заболевания нередко отмечалось присутствие сочетанной патологии, которая в большинстве случаев была представлена различными гастроэнтерологическими заболеваниями, среди которых дискинезия желчевыводящих путей (15,6%), синдром избыточного бактериального роста в кишечнике (15,6%), хронический гастродуоденит (7,3%), лактазная недостаточность (14,6%) и др. В отдельных случаях как свидетельство полисистемности поражений при целиакии у обследованных пациентов были обнаружены врожденные пороки развития различных органов (17,7%), дисплазия соединительной ткани (3,1%), аллергический синдром (2,1%), которые, вероятно, обусловлены взаимодействием генотипа человека, комбинаций аллелей и средовых факторов.

В ходе работы были сопоставлены направительные и окончательные диагнозы обследованных больных. Процент первично выявленных в амбулаторно-поликлинических учреждениях случаев целиакии среди пациентов г. Волгограда и г. Волжского оказался достоверно выше, чем в райцентрах области, и составил 38,2% и 17,3% соответственно. Тем не менее, трудности постановки диагноза глютеновой энтеропатии очевидны.

Проведенный анализ родословных ряда больных подтвердил предрасположенность к целиакии как наследственному полисистемному заболеванию мультифакториального генеза. Прежде всего, в семьях больных наряду с гастроэнтерологической патологией встречались поражения многих органов и систем, что, вероятно, свидетельствует о включении в генную сеть целиакии генов, связанных как с заболеваниями органов пищеварения, так и с другой разнообразной патологией (лактазная недостаточность, язвенная болезнь, бронхиальная астма и др.).

В постановке правильного клинического диагноза немаловажную роль играют результаты лабораторных методов исследования. Было установлено, что тест на эндомизийные антитела оказывался положительным у больных глютеновой энтеропатией чаще (93,85%), чем тесты на антитела к глиадину (AGA-IgA – 89,6%; AGA-IgG – 73,13%) и ретикулину (80%). Однако поскольку не один из методов диагностики не демонстрирует абсолютную эффективность, а также во избежание получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов лабораторных анализов, целесообразнее назначать комплекс тестов для постановки максимально достоверного диагноза.



В настоящее время единственным методом лечения глютенной энтеропатии является строгое пожизненное соблюдение безглютеновой диеты, которая способствует улучшению состояния здоровья пациентов, при этом, в первую очередь, исчезает кишечная симптоматика, свидетельствующая о развитии синдрома мальабсорбции, позднее происходит снижение проявления внекишечной симптоматики. Улучшение клинической картины подтверждается и результатами лабораторных методов исследования. В наших наблюдениях у 90,4% пациентов наблюдалась стойкая положительная динамика в клинических и лабораторных показателях. Тем не менее, в 9,6% случаев выявлена неэффективность диеты, что, вероятно, явилось следствием нестрогого соблюдения предписанного лечения или наличием рефрактерной формы процесса.

Несомненно, расширение знаний о данной патологии должно послужить поводом к увеличению числа верифицированных диагнозов целиакии, чему будет способствовать проведение корректных диагностических процедур, и, как следствие, назначение своевременной и адекватной терапии.

УДК 616.981.49

### **СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ САЛЬМОНЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И ВОДЫ Р. ДОН**

*О.П. Панасовец\*, О.А. Шмайленко\*\**

*\*ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора;  
\*\*МБУЗ Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко;  
г. Ростов-на-Дону, Россия*

**Аннотация.** В статье изложены результаты сравнительной оценки чувствительности выделенных штаммов сальмонелл от больных людей и из воды р. Дон. В ходе проведенных исследований было установлено, что клинические и «дикие» штаммы обладают схожей чувствительностью к антибиотикам. В тоже время, клинические штаммы обладают более высокой вирулентностью.

**Ключевые слова:** сальмонеллы, антибиотикорезистентность, вирулентность.

Антибиотикорезистентность микроорганизмов – проблема современного здравоохранения во всем мире. Развитые страны используют антибиотики не только для лечения людей и животных, но и для предупреждения возникновения инфекционных заболеваний. Это приводит к появлению устойчивых штаммов микроорганизмов к используемым антибиотикам.

Цель работы – сравнение профиля резистентности к антимикробным препаратам штаммов сальмонелл, выделенных из воды р. Дон и от госпитализированных взрослых больных в инфекционное отделение МБУЗ ГБ № 1 им. Н.А. Семашко.

Объектами исследования были бактерии р. *Salmonella*, выделенные от пациентов и из воды р. Дон.

Исследования на наличие сальмонелл в воде проводили согласно разработанных нами МР «Использование готовой к применению питательной среды для выделения сальмонелл из водных объектов» № 07-03-10/3846а от 4.07.2012 г. Клинический материал засеивали «прямым посевом» на чашки с

висмут-сульфит агаром, агаром Эндо и Плоскирева, а также методом подрачивания в накопительной питательной среде с пересевом на вышеуказанные твердые питательные среды. Идентификацию сальмонелл проводили по общепринятой методике.

Вирулентность оценивали путем введения 1 мл суточной культуры исследуемых штаммов внутрибрюшинно лабораторным мышам весом 16 – 18 г. Для определения вирулентности пользовались заражающими дозами 1000, 10000, 100000, 1000000, 1000000000 КОЕ/мл.

Оценку чувствительности выделенных штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам проводили диско – диффузионным методом согласно МУК 4.2. 1890 - 04. Определялась чувствительность микроорганизмов к следующим химиотерапевтическим препаратам, рекомендованным для лечения больных сальмонеллезом: бета-лактамы (ампициллин, амоксициллин, имипенем, цефотаксим, цефтриаксон), аминогликозиды (гентамицин, канамицин, амикацин), хинолоны (офлоксацин, ципрофлоксацин), тетрациклины (доксциклин), фосфомицин.

За изучаемый период исследовано 95 проб воды р. Дон. Всего из общего количества исследованных проб воды выделено 102 культуры сальмонелл 33-х сероваров. Частота выделения сальмонелл группы В составила 39,2 %, группы С – 28,4 %, группы Д – 18,6 %, группы Е – 13,72 %. Чаще других среди сальмонелл группы В встречались *S.derby* (10,8 %), *S.typhimurium* (9,8 %); группы С – *S.utah* (9,8 %); группы Д – *S.enteritidis* (9,8 %); группы Е – *S.oxford*, *S.virchow* (по 3,92%).

Штаммы были стандартными по биохимическим признакам: образовывали сероводород, утилизировали цитрат Симмонса, сбразивали глюкозу и манит с образованием газа и кислоты, не утилизировали сахарозу, лактозу и мочевины, реакция Фогеса-Проскауэра и на индол отрицательна.

Выделенные из воды сальмонеллы в 100% были чувствительны к цефозалину, фосфомицину и спарфлоксацину. Менее чувствительны – к гентамицину, ампициллину, амоксициллину, ципрофлоксацину, офлоксацину и имипенему (78,9%). К доксициклину оказались устойчивыми 94,7% штаммов.

Всего было обследовано 180 пациентов. Сальмонеллы выделены в 22,8 % случаев. Среди пациентов, у которых были обнаружены бактерии р. *Salmonella*, 79,5% были в возрасте от 16 до 60 лет, то есть трудоспособное население. Тяжесть течения заболевания всех пациентов характеризовалось как среднетяжелое.

Все выделенные сальмонеллы были типичны по биохимическим признакам и относились к 4 серологическим группам: В, С, Е и D. Сальмонеллы, выделенные от больных людей, относились к 5 сероварам. Наиболее часто встречались *S. enteritidis* (63,4%) и *S. typhimurium* (24,3%), а *S. london*, *S. virchow*, *S. newport* – представлены единичными находками.

Среди клинических изолятов не было обнаружено полирезистентных штаммов. Уровень резистентности сальмонелл был выше к ампициллину – 47%, а доксициклину – 91,2%. Наиболее чувствительными эти штаммы оказались к гентамицину в 82,4% случаев, к фосфомицину – 79,4%, а также к амикацину – 67,6%. К имипенему и амоксициллину были чувствительны 50% исследуемых штаммов.

Сравнение факторов патогенности, таких как вирулентность, гемолитическая активность и способность образовывать ДНК-азу, показало, что клинические штаммы оказались более «агрессивными». Изучение выделенных сальмонелл показало, что штаммы, выделенные из клинического материала, обладали более высокой вирулентностью: заражающая доза при которой погибали все подопытные животные колебалась от  $10^4$  до  $10^6$  КОЕ/мл. У

штаммов, выделенных из воды - от  $10^8$  до  $10^{10}$  КОЕ/мл. На кровяном агаре гемолиз образовывали 28% и 26% штаммов, клинических и «диких», соответственно. Способность образовывать ДНК-азу заметно выше у клинических штаммов сальмонелл – 64%, тогда как у водных – 36,8%.

Таким образом, можно отметить схожесть профиля резистентности у сальмонелл, выделенных из воды р. Дон и клинического материала. Наибольшей активностью по отношению к этим штаммам обладали фосфомицин, гентамицин и амикацин. К доксициклину были резистентны около 90% всех штаммов сальмонелл. Изучение факторов патогенности показало более высокую вирулентность штаммов сальмонелл, выделенных от больных людей.

УДК 57.063.8+576.8

## ПРОЕКТ ГЕНОМА *BRUCELLA SUIIS* 1330

*С.В. Писаренко, Е.Н. Мисетова, Л.В. Ляпустина*

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
г. Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** С использованием полупроводниковой технологии PGM выполнено секвенирование генома *B. suis* 1330, осуществлена сборка полученных ридов в контиги и проведено частичное картирование генома

**Ключевые слова:** полногеномное секвенирование, *Brucella suis*, геном, нуклеотидная последовательность

Использование молекулярно-генетических подходов для характеристики штаммов микроорганизмов обеспечивает возможность оценки и анализа культур на штаммовом уровне, что не только расширяет знания о филогении возбудителей, но и дает реальный инструмент для расшифровки вспышек инфекционных болезней. Доступность полногеномных нуклеотидных последовательностей возбудителей инфекционных болезней позволяет характеризовать штаммы микроорганизмов на новом уровне, обеспечивая доступ к расшифровке механизмов их вирулентности.

Последнее десятилетие характеризуется появлением в мировых базах данных полных последовательностей геномов возбудителей бруцеллеза различных видов [1, 2], что позволило провести сравнительное изучение возможных видоспецифических участков геномов, оценку аттенуированных свойств вакцинного штамма, сравнительный филогенетический геномный анализ [3] и т.д.

В работе была использована культура референтного штамма *B. suis* 1330 (биовар 1) из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, находящаяся в лиофилизированном состоянии с 1979 г.

В результате изучения культурально-морфологических свойств данного штамма было установлено, что он стабильно сохранял свои свойства и вызывал формирование специфического инфекционного процесса при заражении биопробных животных.

Геном *B. suis* 1330 был секвенирован с помощью платформы Ion Torrent PGM («Life Technologies», США). В общей сложности прочитаны 468,521,876 п.о., которые составили 5,378,603 ридов при средней длине 87 п.о. Сборка генома осуществлялась с помощью программного обеспечения GSDe NovoAssembler 2.6. Newbler. В результате сборки получены 156 контигов (> 500 п.о.) общей длиной 3,277,007 п.о., значение  $N50 = 33\ 139$  п.о.

Проект генома *B. suis* 1330 проанализирован с помощью Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) [4]. В общей сложности были обнаружены 3194 белок-кодирующих последовательностей, G+C составил 57,3 %. Сервер RAST смог функционально прокомментировать 2399 генов, оставшиеся 795 – были аннотированы как последовательности, кодирующие гипотетические белки.

Поиск тРНК- и рРНК-кодирующих последовательностей выполнялся с помощью tRNAscan-SE 1.21 и RNAmmer1.2 соответственно. Было показано, что проект генома содержит девять рРНК локусов и 64 тРНК генов, кодирующих 20 аминокислот, а также ряд генов, которые играют роль в инвазивности и патогенности бруцеллезного микроба. Эти гены детерминируют синтез бактериоцинов (колицин V), белков-транслокаторов через цитоплазматическую мембрану (ABC транспортеров), участвуют в определении устойчивости к антибиотикам и токсическим соединениям. Присутствуют гены, содержащие профаги, мобильные элементы [5].

Будущие исследования отношений между выявленными генами возможно помогут обеспечить продвижение в понимании эволюции и адаптации микроорганизмов вида *B. suis*, а также расширить знания о хозяйинной приуроченности представителей данного вида.

Проект генома был зарегистрирован в базе данных GenBank под номером PRJNA206045.

#### **Литература:**

1. Elhassanny A.E. et al. The ferrous iron transporter is required for the virulence of *Brucella abortus* 2308 in mice // *Mol. Microbiol.* May 5 - 2013.
2. Chain P.S. et al. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. // *Infect. Immun.* 73, 8353–8361 - 2005.
3. Foster J.T. Whole genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. // *J. Bacteriol.* 191, 2864–2870 - 2009.
4. Aziz R.K. et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology // *BMC Genomics* 9:75 - 2008.
5. Gao G., et al. *Brucella* virulence mechanisms implications in novel vaccines and drugs // *Crit Rev Eukaryot gene expr.*; 23(1):49-64 - 2013.

УДК 632.938

## **К ВОПРОСУ О ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ**

*Н.С. Саркисян, М.В. Костюченко*

*ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт  
г.Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** Роль иммунологической памяти неоднозначна и может иметь как позитивное, так и негативное значение, что диктует необходимость поиска эффективных способов ее регуляции (эндогенными или внешними воздействиями), нацеленных в одном случае (инфекционные и опухолевые заболевания) на усиление, а в другом (аутоиммунная патология, аллергии) - на подавление (ослабление) иммунных процессов. Данная статья является обобщенным анализом современной литературы по проблеме иммунологической памяти.

**Ключевые слова:** иммунологическая память, Т-и В-лимфоциты

Иммунологическая память (ИП) - это способность иммунной системы к более быстрому и эффективному ответу на антиген, с которым организм встречался ранее. Этот ответ, который также называется вторичным, третичным и т.д., зависит от количества вводимого антигена и отличается от первичного ответа. Данный феномен реализуется при вакцинации, выражаясь в формировании длительно живущей популяции специализированных лимфоцитов памяти. Как именно функционирует ИП недостаточно ясно [1].

Существует несколько взглядов на функционирование ИП: 1) ИП зависит от вида антигена; 2) ИП является специальным свойством лимфоцитов, проявляющимся на стадии между наивными и дифференцированными Т-эффекторами и плазматическими клетками [2,8]. Клетки ИП являются высоко дифференцированными и включают как Т-лимфоциты ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), обеспечивающие клеточный компонент иммунной реакции, так и В-клетки, и долгоживущие плазмциты, синтезирующие защитные антитела. Долгое время именно с наличием специфических антител, годами и десятилетиями присутствующими в крови у переболевших или вакцинированных лиц, связывали само понятие ИП. Позднее стало ясно, что уровень защитных антител обеспечивают долгоживущие плазматические клетки и В-клетки памяти [10,13].

ИП может рассматриваться как адаптивный иммунный ответ на антиген. В обычных условиях вторичный иммунный ответ подразумевает продукцию сывороточных антител в более высокой концентрации и через более короткий промежуток времени по сравнению с первичным, кроме того, синтезируемые антитела обладают более высокой связывающей способностью [9].

Клетки ИП  $CD8^+$  являются особой популяцией, которая функционально и фенотипически существенно отличаются как от наивных Т-клеток, так и от эффекторных клеток  $CD8^+$  [9,12]. Остается нерешенным вопрос о происхождении клеток ИП, дифференцируются ли они из наивных клеток, которые являются общими предшественниками для всех эффекторных цитолитических Т-клеток или дифференцируются из особой популяции Т-лимфоцитов.

Можно предположить, что клетки ИП  $CD8^+$  дифференцируются из клеток с высокоаффинными рецепторами, что отчасти может определять быстрое уничтожение клетками ИП антигена. При повторной встрече организма с антигеном активироваться могут как наивные клетки, так и уже существующие клетки ИП. Взаимоотношение этих двух популяций до конца не изучено. Нерешенным остается вопрос об участии клеток  $CD4^+$  в процессе дифференцировки и длительном выживании клеток ИП  $CD8^+$ . Исследованиями показано, что клетки ИП  $CD8^+$ , образующиеся в ответе на вирусы и внутриклеточные бактерии в отсутствие клеток  $CD4^+$  теряют способность приобретать эффекторные функции. Было выдвинуто предположение, что зависимость от клеток  $CD4^+$  является функциональной особенностью клеток ИП  $CD8^+$ , независимо от иммунизирующего антигена [12].

Анализируя данные о наличии специфической защиты у пациентов с агаммаглобулинемией, привитых против кори или других вирусов, свидетельствовали в пользу наличия Т-клеточного компонента ИП. Так, исходная численность клеток в клонах Т-клеток памяти на 2-3 порядка выше, чем в клонах - наивных клеток. Наивные лимфоциты находятся в фазе покоя ( $G_0$ ), для выхода из которой требуется время и дополнительные воздействия, а клетки памяти - в клеточном цикле, поэтому их реакция намного быстрее [1].

К сожалению, до настоящего времени не предложено единого, хорошо стандартизованного и достаточно простого метода для оценки Т-клеточной памяти, как, например, метод определения специфических антител.

Нет никаких сомнений в том, что ИП, опосредуемая увеличенными титрами антител, необходима и достаточна для обеспечения защиты против инфекции цитопатическими вирусами. Одной из функций ИП на уровне отдельного макроорганизма и популяции в целом является, вероятно, приспособление популяции к вирусу прямо или косвенным образом через регулирование эпидемий вируса с помощью популяционного иммунитета [4,5].

В противоположность сохраняющимся длительное время и в более высокой концентрации уровням антител памяти, обеспечивающим защиту, цитотоксические Т-лимфоциты (CTLs) быстро индуцируются и исчезают. Частотность (частота встречаемости) CD8<sup>+</sup> Т-клеток (к определенному антигену) находится на низком уровне у обычного нормального хозяина, порядка 1 клетки на 10<sup>6</sup> лимфоцитов [14].

Анализ литературы показал, что иммунологическая память при туберкулезе развивается по тем же основным законам, что и при введении любого антигена, с учетом особенностей, обусловленных персистенцией в организме живого возбудителя. При туберкулезе (в плане сохранения определенного уровня приобретенной резистентности в результате предыдущего контакта) иммунологическая память не зависит исключительно от персистенции живых микобактерий [3].

Описано, что при однократной иммунизации живой гриппозной вакциной отмечается достоверное увеличение в периферической крови уровня (CD8<sup>+</sup>) и (CD4<sup>+</sup>) фенотипов CD45RO<sup>+</sup> («иммунологической памяти») и CD45RA<sup>+</sup> («наивных») у значительной части вакцинированных лиц (35-60%). Существует определенная связь между поствакцинальным накоплением Т-клеток памяти в периферической крови и наличием системного гуморального ответа на прививку. Однако эта связь не абсолютна, поскольку увеличение доли этих клеток после вакцинации происходит также и у части лиц без такого ответа (до 25% иммунизированных) [8].

Факторы, оказывающие влияние на формирование иммунологической памяти при заболеваниях, весьма многочисленны и разнообразны. Стероидные гормоны считаются самой большой группой биологически активных веществ, воздействие которых на процессы пролиферации, дифференцировки и гибели клеток иммунной системы интенсивно изучается [2].

В данной статье показано, что двукратная интраназальная иммунизация живой гриппозной вакциной А(Н5N2) «наивных» в отношении контактов с возбудителем птичьего гриппа людей индуцирует у них продукцию циркулирующих вирусспецифических CD8<sup>+</sup>-и CD4<sup>+</sup>-клеток ИП, специфических как к вакцинному штамму, так и к актуальному вирусу гриппа А(Н1N1). Получены данные, свидетельствующие о том, что часть взрослых людей не являются абсолютно неиммунными в отношении птичьего вируса гриппа А(Н5N2), поскольку в довакцинальном периоде у них обнаруживают перекрестно реагирующие Т-клетки ИП, специфические к этому возбудителю [4].

В настоящее время остается дискуссионным вопрос: генерируются ли клетки памяти из преддетерминированных наивных предшественников, или они формируются из клеток-эффекторов случайным образом. Первый вариант предполагает существование непримированных антиген-специфичных клеток, исходно запрограммированных отвечать на антигенное воздействие формированием ИП. Второй вариант предполагает, что в процессе деления часть эффекторных клеток случайным образом (стохастически) или в результате ростовой селекции становятся клетками памяти. Следует заметить, что эти варианты не являются взаимоисключающими [7].

Согласно имеющимся данным, в результате развития адаптивного иммунного ответа, генерируются антиген-специфические эффекторный лимфоциты, большая часть которых, в конечном итоге, подвергается апоптозу. Самоподдержание, реализующееся за счет того, что в результате клеточного деления только одна дочерняя клетка дифференцируется, тогда как другая в полной мере сохраняет свойства материнской клетки, является важной характерологической особенностью лимфоцитов, ответственных за ИП. Эта особенность роднит их со стволовыми кроветворными клетками. Феномен генерации и длительного существования клеток ИП в организме лежит в основе всех известных на сегодняшний день методов эффективной вакцинации. Иммунная память также лежит в основе иммунопатологических состояний, связанных с развитием аллергических реакций и аутоиммунных процессов [5,6].

Наивные клетки, несущие CD45RA превращаются в клетки-памяти с низкомолекулярной изоформой CD45RO. Эти изменения происходят под влиянием антигена. Не исключается возможность обратной реверсии – перехода CD45RO клеток в CD45RA клетки, сохраняющие свойства клеток ИП, без участия антигена. В клетках ИП по сравнению с наивными клетками содержится больше ингибитора апоптоза Bcl-2 и антигенов главного комплекса гистосовместимости II класса. Для увеличения срока жизни клетки и поддержания экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-2 необходим повторный контакт клетки с антигеном. Клетки ИП вырабатывают более широкий спектр цитокинов, обладают выраженной способностью прикрепляться к сосудистому эндотелию при взаимодействии с антигеном. ИП связана, прежде всего, с клетками памяти, которые рециркулируют во всех тканях организма, где есть кровеносные сосуды, и выполняют по существу функцию эффекторных клеток [9].

Таким образом, анализ современной литературы касающейся проблемы ИП позволил выяснить, что главным инструментом создания ИП является антигенпредставляющий комплекс молекул главного комплекса гистосовместимости с пептидами антигена. Такой комплекс концентрируется преимущественно на дендритных клетках в участках лимфоидной ткани, где происходит превращение наивных клеток в клетки ИП.

Существенный интерес представляет возможность блокировки или отмены иммунологической памяти к определенному антигену. Возможность прервать ИП (не нарушая, конечно, памяти к; другим антигенам) будет революцией в борьбе с аллергическими заболеваниями. Это наиболее трудная задача, и ученые пока только ищут пути к ее решению.

Проведенный обзор литературы указывает на отсутствие в настоящее время исчерпывающих знаний о природе клеток иммунной памяти и их функциональных особенностях. Изучение синергии Т- и В- клеточных реакций безусловно внесут свой вклад в понимание механизмов формирования долговременной ИП.

#### **Литература:**

1. Батрэм Г., Кэтрин Дж.Фромпович Основы иммунной системы человека до появления вакцин: не переворачивают ли вакцины иммунную систему наших детей вверх ногами//Международный медицинский совет по вакцинации июнь - 2011.с. (3)
2. Литвинова Л.С. и др Стероидная регуляция иммунной памяти //Вестник балтийского федерального университета. Калининград. -2011.- №1. – С. 77-87. (12)
3. Медуницын Н.В. Где находится иммунологическая память? Роль антигена в поддержании иммунологической памяти // Иммунология. 2001.№6. С.19-24.(15)

4. Найхин А.Н. и др. Оценка Т - клеточной иммунологической памяти по экспрессии молекул CD45 у людей, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной // Медицинская иммунология. -2008. Т.10.№6. С.535-542. (17)
5. Найхин А. Н. и др. Стимуляция гомо - и гетерологичной Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа а (h5n2) // Вопросы вирусологии . 2012. Т.-57. №1. С. 38-42 (18)
6. Никоненко Б.Ви др. Иммунологическая память у мышей линий сва исба/n при вакцинации *Mycobacterium bovis* (bcg) // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001. №8. С. 649-651. (19)
7. Репина Е.А.и др. Иммунологической памяти в патогенезе сахарного диабета 1 типа// Международный журнал по иммунореабелитации. 2009. Т. 11. №1.С. 107. (21)
8. Селедцова Г.В., Иванова И.П., Селедцов В.И. Т - клеточная вакцинация в лечении рассеянного склероза // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2008.Т. 3. № 4. С. 31-35. (22)
9. Селедцов В.И. и др. Клеточные механизмы генерации иммунологической памяти // Цитокины и воспаление. 2010. Т. 9. №4.С. 9-15. (23).
10. Топтыгина А.П. Т-клетки памяти //Иммунология . 2008. № 5.С.311-316
11. Топтыгина А.П. Специфический Т- клеточный иммунный ответ: методы оценки // Вопросы диагностики в педиатрии. 2012. № 6.С. 5-10.
12. Achiron A., Lavie G., Kishner I. et al. T cell vaccination in multiplesclerosis relapsing –remitting nonresponders patients // Clin. Immunol. -2004. -Vol. 113, № 2. -P. 155-160.(1)
13. Akdis M., Trautmann A., Klunker S. et al. T-helper (Th) 2 predominance in atopic diseases is due to preferential apoptosis of circulating memory/effector Th1 cells //FASEB J. -2003. -Vol. 17, № 9. -P. 1026-1035.(2)
14. Bell E.B., Sheila M. et al. / Bell E.B., Sheila M Immunol. Today. - 1998.-vol.19.-P.60-64.(4)

УДК 616.9+616.921.5(470.41)

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН ЗА 2010-2013 ГОДЫ**

*Л.Ф. Сафиуллина, М.А. Золотова, С.Д. Лебедева, Г.Ш. Исаева*

*ФБУН «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан»  
г.Казань, Россия*

**Аннотация:** грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) занимают ведущее место в структуре инфекционных болезней. ОРВИ оказывают непосредственный вред здоровью человека, снижают защитные силы организма и могут быть причиной разнообразных заболеваний дыхательных путей, центральной нервной системы, почек и др. (Малой В.П. и Андрейчин М.А., 2012). Особенно восприимчивы к ОРВИ дети, беременные и люди пожилого возраста. Среди ОРВИ вирус гриппа занимает особое положение, так как он характеризуется высокой мутагенностью и изменчивостью что делает проблемной идентификацию данного возбудителя. Учитывая скорость распространения и изменчивость данного возбудителя, возникает угроза эпидемий и пандемий. Составление полноценной картины встречаемости



различных возбудителей ОРВИ у больных необходимо для выбора правильной стратегии лечения больных и предупреждения острой эпидемиологической ситуации среди населения.

**Ключевые слова:** грипп, острые респираторные инфекции (ОРВИ), циркуляция, мониторинг, Республика Татарстан

**Введение:** респираторные вирусы являются наиболее частой причиной заболевания по всему миру. Наиболее частыми этиологическими агентами ОРВИ являются вирусы, принадлежащие к 6 основным семействам Coronaviridae (коронавирусы человека 229E, HKU1, NL63, OC43), Adenoviridae (аденовирус человека более 40 серологических типов), Orthomyxoviridae (вирус гриппа типа А и В), Paramyxoviridae (вирус парагриппа 1-4 типов, метапневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус), Picornoviridae (риновирус типов А, В, С), Parvoviridae (бокавирус человека) (Сергеева Е.И. и др., 2010). В связи с тем, что широкий спектр вирусных агентов способен вызывать ОРВИ, проведение мониторинга за циркуляцией возбудителей ОРВИ является актуальным на сегодняшний день.

**Цель и задачи:** проведение молекулярно-генетических исследований и анализ результатов надзора за возбудителями гриппа и ОРВИ на территории Республики Татарстан за 2010-2013 годы.

**Материал и методы исследований.** Материалом для исследования служили мазки из носоглотки, отобранные от больных с подозрением на ОРВИ. Было обследовано в 2010 году – 229 больных, в 2011 – 554 больных, 2012 – 638 больных, 2013 – 766 больных. Исследование материала производили методом ПЦР на обнаружение специфических фрагментов нуклеиновых кислот вирусов гриппа А (А/Н1N1; А/Н3N2; А/Н1N1 2009), гриппа В, парагриппа, RS-вирусов, аденовирусов, бокавирусов, метапневмовирусов, коронавирусов, риновирусов. Использовались следующие наборы диагностикумов: «АмплиСенс Influenza virus А/В - FL» «АмплиСенс Influenza virus А - тип - FL», «АмплиСенс Influenza virus А/Н1 - swine - FL», «АмплиСенс Influenza virus А/Н5N1 - FL», «АмплиСенс ОРВИ - скрин- FL» в соответствии с рекомендациями производителей.

**Результаты.** Анализ результатов генодиагностических исследований показал, что в 2010-2011 годах в период эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ на территории РТ, в этиологической структуре ОРВИ доминировал вирус пандемического гриппа А(Н1N1)/ swine/2009, который был выявлен в 12,7% и 30,7% случаев соответственно. В 2012 году ни у одного обследованного вирус «свиного» гриппа выявлен не был, в 2013 году произошел «возврат» пандемического гриппа, который был выявлен в 22,7% случаев. Также обнаруживался вирус гриппа А(Н3N2): в 2011 году 2,1% случаев, в 2012 году наблюдалось увеличение случаев до 4,23%, с последующим снижением до 1,96% случаев в 2013 году. Вирус гриппа А/Н1N1 в 2010-2011 годах не выявлялся, в 2012 году он был обнаружен в 0,16% случаев, в 2013 году – в 0,26%. Заболеваемость гриппом В за годы наблюдений оставалась практически на одном уровне: в 2010 - 1,75%, 2011 – 1,98%, 2013- 1%. В этиологической структуре другие возбудители ОРВИ составляли менее половины случаев, за период 2011-2013 годы частота их обнаружения варьировала от 23,75% до 45,6%, что в среднем составило 37,13%. Доминировали риновирусы ( в 2011 г.– 27,9%, в 2012 – 13,48%, 2013 – 7,96%). Остальные возбудители выявлялись значительно реже, в среднем за 2011-2013 гг.: вирусы парагриппа (4,96%), RS-вирусы (17,64%), адено-, бока-, корона- и метапневмовирусы в 1,77%, 2,15%, 1,48% и 1,17% случаев соответственно. Сравнительные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1. - Циркуляция вирусов гриппа и ОРВИ на территории РТ в 2010-2013гг.

Наименование		2010		2011		2012		2013	
		Кол-во проб	% нестандартных	Кол-во проб	% нестандартных	Кол-во проб	% нестандартных	Кол-во проб	% нестандартных
Грипп	A/H1N1	229	-	554	-	638	0,16	766	0,26
	A/H3N2	229	-	554	2,1	638	4,23	766	1,96
	A/H1N1 2009	229	12,7	554	30,7	638	-	766	22,7
	B	229	1,75	554	1,98	638	-	766	1
Парагрипп		88	4,5	554	6,5	638	6,90	766	1,96
RS-вирусы		88	48,8	554	6,3	638	8,15	766	7,3
Аденовирусы		-	-	554	0,7	638	2,66	766	1,96
Бокавирусы		-	-	143	2,8	638	2,35	766	1,3
Метапневмавирусы		-	-	143	-	638	1,41	766	2,1
Коронавирусы		-	-	143	1,4	638	1,88	766	1,17
Риновирусы		-	-	143	27,9	638	13,48	766	7,96

Вывод. Анализ результатов, полученных на базе лаборатории *Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)»* за 2010-2013 гг. показал, что во время эпидсезона ОРВИ на территории РТ доминировали вирусы гриппа А, преимущественно пандемического подтипа A(H1N1)/swine/2009.

#### Литература:

1. Грипп и другие ОРВИ/ Под ред. В.П. Малого, М.А. Андрейчина.- М.: Издат. группа «Гэотар-Медиа», 2012.- 8 с.
2. Сергеева Е.И., Винокурова А.В., Агафонов А.П., Терновой В.А. Диагностика вируса гриппа, вируса парагриппа, риновируса, метапневмавируса методом ПЦР в режиме реального времени//Молекулярная диагностика-2010.- 2010.- Т.4.- С.210.

УДК 616.9:16-036.22

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO В ТАЁЖНЫХ КЛЕЩАХ, УДАЛЁННЫХ С ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА ХАБАРОВСКА В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПЕРИОД 2011, 2012 ГОДОВ**

*Т.С. Солдатова, А. В. Щукин, Т. В. Мжельская*

*ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» г.Хабаровск, Россия*

**Аннотация.** В работе представлена сезонная динамика инфицирования напитавшихся иксодовых клещей боррелиями комплекса *Borrelia Burgdorferi sensu lato* в 2011-2012 годах. На основании исследования методом ПЦР 2175 особей переносчиков инфекции сделан вывод о наиболее эпидемически значимых в отношении иксодового клещевого боррелиоза месяцах – мае и июне. В целом уровень инфицированности иксодовых клещей боррелиями составил 29,5 - 34,1%.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, иксодовые клещи, боррелии, полимеразно-цепная реакция

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) или Болезнь Лайма занимает одно из ведущих мест по заболеваемости среди трансмиссивных природно-очаговых инфекций в Хабаровском крае.

Возбудители ИКБ боррелии комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*) проникают в организм человека со слюной инфицированных взрослых клещей, их личинок или нимф во время кровососания. Восприимчивость человека к боррелиям очень высокая. Случаи заболеваний регистрируются среди всех возрастных групп, чаще болеет взрослое трудоспособное население. Клинически болезнь Лайма характеризуется полиморфизмом проявлений: поражением кожи, нервной, сердечно-сосудистой систем, опорно-двигательного аппарата, общей инфекционной интоксикацией часто приобретает хроническое и рецидивирующее течение.

Заболеваемость ИКБ в Хабаровском крае колеблется от 36 до 97 случаев в год. Одной из возможностей оценки опасности трансмиссивных клещевых инфекций является число жителей края, обратившихся в ЛПУ после присасывания клещей. За 9 месяцев 2012 года в крае было зафиксировано 5004 обращения, из них в городе Хабаровске — 1957. В 2011 году данные показатели составили 5237 и 1697 соответственно.

Для установления диагноза ИКБ используются как микроскопические, так и серологические методы лабораторных исследований. Однако, метод идентификации боррелий в кишечнике клеща не всегда эффективен, так как является трудоёмким и не обладает достаточной чувствительностью. В свою очередь, серологические тесты не обладают необходимой информативностью на ранних этапах диагностирования инфекции, в связи с поздним развитием иммунного ответа после инфицирования боррелиями.

Внедрение ПЦР для диагностики ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* в инфицированных клещах позволяет определить наличие данного инфекционного агента на ранних этапах заражения, с чувствительностью около 95% и возможностью исследования переносчика в любом состоянии[1].

Таким образом, ПЦР является лучшим из доступных методов для ранней диагностики *Borrelia burgdorferi sensu lato*, что позволяет определить вероятность ИКБ у пострадавшего человека и может послужить основанием для назначения экстренной превентивной антибиотикотерапии в первые 5 дней с момента присасывания клеща. Кроме того, наличие в анамнезе пациента факта нападения клеща, зараженного боррелиями, может способствовать постановке правильного диагноза заболевания и лечению пациента в случае обращения пострадавшего за помощью, при ухудшении самочувствия.

Целью настоящей работы явилось получение данных о частоте выявляемости боррелий в клещах рода *Ixodes* в разные периоды их активности в 2011-2012 годах. Получение этой информации представляет как научный, так и практический интерес и будет способствовать улучшению эпидемиологического контроля за ИКБ.

#### **Материалы и методы**

2175 экземпляров иксодовых клещей, удаленных с жителей Хабаровского края в 2011- 2012 годах, подверглись молекулярно-генетическому анализу на наличие ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* и составили основу данного исследования.

Для выделения нуклеиновой кислоты (НК) из клещей в микропробирку с насекомым добавляли 300 мкл 96% этанола и перемешивали в течение 10-15 с.

Капли со стенок пробирки сбрасывали кратковременным центрифугированием, спирт удаляли с помощью пипетки. Клещей в пробирках промывали 500 мкл раствора 0,15 М NaCl и замораживали в течение 5 минут в жидком азоте. Замороженного клеща тщательно растирали в пробирке с индивидуальным стерильным пестиком и суспендировали в 250 мкл буферного раствора. После встряхивания пробирки частицы хитинового покрова осаждали коротким центрифугированием и получали надосадочную жидкость (суспензию органов и мягких тканей клеща)[2].

Определение ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* было осуществлено на амплификаторе с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «iQ5 iCycler» («Bio-Rad», США), с использованием коммерческих тест-систем «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.*» производства ОАО «Вектор-Бест» (п. Кольцово, Новосибирская область). Для исследований применяли по 100 мкл фракции суммарной НК, выделенной из 2175 напитавшихся клещей.

#### Результаты и обсуждение.

Начало периода активности иксодовых клещей в 2011-2012 годах приходится на II декаду апреля (Табл. 1). В этом месяце генерация клещей полностью представлена перезимовавшими особями, высокий процент выявляемости боррелий в клещах (32,0-38%) свидетельствует о хорошей сохранности возбудителя в переносчиках в зимний период.

Таблица 1.- Результаты выявления ДНК боррелий в напитавшихся иксодовых клещах, удаленных с жителей г. Хабаровска в 2011-2012 годах.

Месяц		2011 год		2012 год	
		Количество исследованных проб	Количество проб, в которых выявлена ДНК боррелий	Количество исследованных проб	Количество проб, в которых выявлена ДНК боррелий
Апрель	II декада	5	2	5	1
	III декада	14	4	92	36
<b>Всего</b>		<b>19</b>	<b>6 (32%)</b>	<b>97</b>	<b>37 (38%)</b>
Май	I декада	68	19	141	50
	II декада	142	42	141	37
	III декада	167	61	226	63
<b>Всего</b>		<b>377</b>	<b>122 (32,4%)</b>	<b>508</b>	<b>150 (29,5%)</b>
Июнь	I декада	202	74	163	38
	II декада	138	43	227	66
	III декада	103	47	84	20
<b>Всего</b>		<b>443</b>	<b>164 (37%)</b>	<b>474</b>	<b>124 (26,2%)</b>
Июль	I декада	61	22	60	20
	II декада	52	17	19	6
	III декада	16	2	11	2
<b>Всего</b>		<b>129</b>	<b>41 (31,8%)</b>	<b>90</b>	<b>28 (31%)</b>
Август	I декада	9	4	3	-
	II декада	4	-	5	1
	III декада	8	-	9	-
<b>Всего</b>		<b>21</b>	<b>4 (19%)</b>	<b>17</b>	<b>1(6%)</b>
<b>Итого</b>		<b>989</b>	<b>337 (34,1%)</b>	<b>1186</b>	<b>350 (29,5%)</b>

Пик численности присосавшихся иксодовых клещей в 2011 году пришелся на июнь месяц, когда были обследованы 443 особи иксодовых клещей. В этом же месяце наблюдался самый высокий процент выявляемости ДНК боррелий в клещах – 37%. В 2012 году пик пришелся на май месяц, однако процент инфицированности клещей боррелиями составил 29,5%. В июле обращаемость по поводу присасывания клещей резко снижается, но количество зараженных особей составляет от 31 до 31,8%. В августе инфицированные боррелиями особи встречались в I декаде месяца в 2011 году и во II декаде 2012 года. Примечательно, что в августе среди обследованных клещей преобладали личинки и нимфы новой генерации переносчиков.

Пунктами выявления напитавшихся инфицированных клещей, удаленных с жителей города Хабаровска, были: район Хехцира, Хабаровский район, город Хабаровск, район имени Лазо и Нанайский район.

В целом, уровень инфицированности клещей боррелиями, в сезон активности клещей, колеблется от 29,5% до 34,1%, что соответствует таковому для клещей *Ixodes persulcatus*, собранных с растительности на юге Хабаровского края[3].

#### **Заключение**

Данное исследование показало наличие *Borrelia burgdorferi sensu lato* в клещах рода *Ixodes* в течение 5 месяцев как в 2011 году, так и в 2012 году (с апреля по август). В целом, от 29,5 до 34,1 % иксодовых клещей, в сезон их активности, были заражены боррелиями. Наибольшему риску заражения ИКБ подвержены лица, отмечавшие присасывание клещей в мае-июне.

#### **Литература:**

1. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (Болезнь Лайма). – Кольцово. – 2005. – с. 9-15.
2. Бондаренко Е.И., Тимофеев Д.И. Новый набор реагентов «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato*». Выявление зараженности клещей патогенными для человека боррелиями с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени // Новости «ВекторБест». – №1. – Кольцово. – 2010. – с. 2-6.
3. Пуховская Н.М., Высочина Н.П. Результаты изучения сочетанных природных очагов клещевого энцефалита и иксодового клещевого боррелиоза на юге Хабаровского края // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - № 11. – Хабаровск, 2007. – с.111.

УДК 621.384.8:616-074

### **ПРЯМОЕ БЕЛКОВОЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ MALDI-TOF ПРОФИЛИРОВАНИЕ ДЛЯ БЫСТРОЙ И ТОЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ РОДА *VIBRIO***

*Н.Р. Телесманич, С.О. Сеина, С.Ю. Водяницкая, О.С. Чемисова, И.А. Чайка*

*ФКУЗ "Ростовский-на-Дону противочумный институт"  
г.Ростов-на-Дону, Россия*

**Аннотация.** В данной статье рассмотрена возможность использования масс-спектрометрического анализа для идентификации патогенных и непатогенных представителей рода *Vibrio* при формировании коллекций патогенных для человека вибрионов и мониторинге судовых балластных вод. Выявлена и обоснована необходимость совместного использования бактериологического и масс-спектрометрического методов идентификации представителей рода *Vibrio*.

**Ключевые слова:** *Vibrio*, масс-спектрометрия, биотипирование, score, Biotyper

Проблема заболеваемости особо опасными инфекциями не теряет свою актуальность и в современном мире, несмотря на развитую медицину и прогресс в технологиях. Темп жизни, глобализация приводят к распространению инфекций с одного материка на другой в крайне короткие сроки. В такой ситуации просто необходимы современные подходы к идентификации микроорганизмов, позволяющие за короткое время выявить инфекционный агент. Одним из таких подходов является масс-спектрометрия. Данный вид идентификации является передовым методом в мировой практике [1].

Целью работы является возможность использования масс-спектрометрического анализа для идентификации патогенных и непатогенных представителей рода *Vibrio*. Данная работа велась в рамках двух научных тем Ростовского противочумного института: «Формирование коллекций патогенных для человека вибрионов» (работа проводилась в соавторстве с музеем живых культур) и «Мониторинг судовых балластных вод» (работа проводилась в соавторстве с лабораторией санитарной охраны территорий и музеем живых культур).

В рамках темы «Формирование коллекций патогенных для человека вибрионов» материалом для исследования послужили 207 музейных штаммов, выделенных от человека и из объектов окружающей среды в период с 1986 по 2012г, относящимся к 4 видам рода *Vibrio*: *V.parahaemolyticus* - 47 штаммов, *V.alginolyticus* - 154 штамма, *V.mimicus* - 4 штамма, *V.fluvialis* - 2 штамма. Коллекция была охарактеризована по паспортным данным основных таксономических биохимических признаков рода и вида.

При помощи масс-спектрометрии в течение лета 2012 года было исследовано 347 штаммов микроорганизмов балластных вод судов, пребывающих в международных порты Ростовской области. В результате биотипирования 347 штаммов микроорганизмов было идентифицировано 12 видов рода *Vibrio*. Помимо постоянно выделяемых патогенных галофильных вибрионов *V.vulnificus*, *V.harveyi*, *V.fluvialis* нами впервые идентифицированы *V.metschnikovii*, *V.alginolyticus*, *V.furnissii*, а также широкий спектр непатогенных вибрионов который был представлен *V.orientalis*, *V.navarrensis* и недавно открытыми, но еще не внесенными видами *V.brasiliensis*, *V.rotiferianus* [4].

В таблице 1 представлены результаты поиска галофильных вибрионов в балластных водах судов, прибывших в порты Ростовской области в 2012г с июня по сентябрь и средние величины степени достоверности (score). Различные значения показателя score, свидетельствующие о надежной идентификации вида (score >2.000 и >2.300) были присвоены как для патогенных, так и для непатогенных вибрионов. К группе патогенных вибрионов с высоким показателем score были отнесены следующие виды: *V.vulnificus* 2.205, *V.harveyi* 2.181, *V.furnissii* 2.014, *V.parahaemolyticus* 2.259, *V.alginolyticus* 2.121, при этом с максимальным значением был определен *V.fluvialis* 2.316; что касается непатогенных для человека вибрионов, к микроорганизмам с показателем score выше 2.000 отнеслись: *V. rotiferianu* 2.07'4, *V.navarrensis* 2.017'.

Низкое значение показателя идентификации score отмечены: *V.brasiliensis* 1.717, *V.albensis* 1.862. Однако нами проанализировано и установлено, что такому значению score можно доверять, так как исследуемая культура не идентична штамму, находящемуся в базе данных, но является очень близкой к белковому профилю данного микроорганизма. К тому же, данные культуры представленные в коммерческой базе данных по одному экземпляру. Этот факт подтверждается в таблице результатов Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results (Expendid review), выдавая в главной позиции Matched Pattern (с англ. - подобранный образец) вариант микроорганизма с наибольшим значением score, а следующему за ним подобранному образцу присвоено значение score со значительной разницей (более

0,3). Кроме того, Маяцкий Н.А. и Калакуцкая А.Н. с соавторами в 2011г. показали, что при показателе score > 1.700, можно рекомендовать использовать эту величину (score), как пороговую для надежной идентификации вида [2].

Таблица 1 Результаты поиска галофильных вибрионов в балластных водах судов, прибывших в порты Ростовской области в 2012г.

Месяц	Патогенные для человека вибрионы		score (средняя величина)	Непатогенные для человека вибрионы		score (средняя величина)	
	Вид	Кол-во		Вид	Кол-во		
Июнь	<i>V. albensis</i>	<b>3 1</b>	1.862	<i>V. rotiferianus</i>	1 1	2.074	
	<i>V.</i>		2.205			2.017	
Июль	<i>V. albensis</i>	17	1.862	<i>V. rotiferianus</i>	1 4 1	2.074	
	<i>V. vulnificus</i>	<b>4</b>	2.205		1	2.017	
	<i>V. harveyi</i>	<b>1</b>	2.181	<i>V. navarrensis</i>		1.717	
	<i>V. fluvialis</i>	<b>2</b>	2.316	<i>V. brasiliensis</i>		1.777	
	<i>V. furnissii</i>	<b>1</b>	2.014	<i>s. V. orientalis</i>			
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<b>1</b>	2.259				
	<i>V. alginolyticus</i>	<b>2</b>	2.121				
Август	<i>V. albensis</i>	<b>5 1 3</b>	1.862	<i>V. navarrensis</i>	4	2.017	
	<i>V. vulnificus</i>		2.205				
	<i>V. harveyi</i>		2.181				
	<i>V. fluvialis</i>		2.316				
	<i>V. metschnikovii</i>		1.621				
Сентябрь	<i>V. albensis</i>	<b>10</b>	1.862	<i>V. navarrensis</i>	2 1	2.017	
	<i>V. vulnificus</i>		<b>5 2 1</b>	2.205		<i>V. brasiliensis</i>	1.717
	<i>V. harveyi</i>		<b>1</b>	2.181		<i>s</i>	
	<i>V. fluvialis</i>		<b>2</b>	2.316			
	<i>V. furnissii</i>			2.014			
	<i>V. parahaemolyticus</i>			2.259			

Наименьший показатель величины score имеет один из представленных в таблице микроорганизмов *V. metschnikovii* 1.621. Программа Biotyper в таблице результатов

Brucker Daltonik, выдает в нескольких главных позициях Matched Pattern один вариант микроорганизма *V. metschnikovii* (разных штаммов), а следующие за ними варианты ответа со значительной разницей в значениях score. Следовательно, такому значению score можно доверять. Принадлежность к данным видам была подтверждена с помощью бактериологических и биохимических методов.

При исследовании образцов на MALDI - TOF масс-спектрометре с июня по сентябрь нами была выявлена 35 культур *V. albensis* (score 1.862). Мы обратились к каталогу классификации Bergey и увидели, что в 2005г. вид *V. albensis* отнесен к виду *V. cholerae* биовар *albensis*. И стал называться *V. cholerae* биовар *albensis*. Биовар *albensis* отличается от *V. cholerae* способностью к биолюминесценции.

Все полученные культуры *V. cholerae* биовар *albensis* были исследованы бактериологическим методом с применением схемы лабораторной диагностики холеры (МУ 4.2.1097-02 «Лабораторная диагностика холеры».) Все культуры, которые программа идентификации масс-спектрометра определила к биовару *albensis* при исследовании традиционными методами были отнесены *V. cholerae* не 01/ не 0139 серогруппе и не агглютинировались холерными сыворотками 01 и 0139, а также не имели способности к биолюминесценции. Следует отметить, что база данных Biotyper не содержит белковых профилей возбудителей холеры и других особо опасных инфекций, однако, проведенные нами исследования показали возможность выявления представителей *V. cholerae* на этапе отбора проб, ориентируясь на *V. albensis*, при дальнейшем подключении методов бактериологической, серологической и биохимической идентификации.

При внесении масс-спектров штаммов *V. cholerae* в базу данных и построении дендрограмм, основанных на масс-спектрометрических профилях, все штаммы *Vibrio*

*cholerae* вошли в один кластер, достоверно удаленный от других родов *Vibrio*, из коммерческой базы данных, один из которых *Vibrio albensis* входит в группу *Vibrio cholerae* отдельной ветвью.

Для выявления возбудителей холеры в объектах окружающей среды практически основополагающим этапом является отбор подозрительных колоний. От этого этапа зависит эффективность выявления возбудителей холеры. С применением отработанной нами схемы отбора культуры с применением масс-спектрометрического биотипирования значительно повышается вероятность выявления в пробах холерных вибрионов.

Следующим разделом работы было проведение внутривидовой дифференциации между *V.parahaemolyticus* и *V.alginolyticus*, представляющей некоторые трудности при бактериологическом биохимическом подходах. Штаммы этих двух видов очень тесно между собой связаны и имеют похожие биохимические характеристики. Характеристиками, позволяющими дифференцировать *V.parahaemolyticus* от *V.alginolyticus*, является способность к ферментации сахарозы. *V.parahaemolyticus* не гидролизуют арабинозу, в отличие от *V.alginolyticus* и положителен в реакции Фогес-проскауэра только в 80% случаев. Тест на арабинозу и сахарозу бывает, дает погрешность. Поэтому для получения достоверных результатов диагностики необходимо использование дополнительных методов дифференциации и идентификации этих двух видов микроорганизмов. Наряду с *V.parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* были типированы посредством масс-спектрометрии вновь поступившие в 2012 году из Новороссийской противочумной станции 4 штамма *V.mimicus* и 2 -*V.vulnificus*.

Нами с помощью масс-спектрометрического анализа было типировано 154 музейных штамма *V.alginolyticus*, из которых 95% - совпали с паспортными данными и идентифицированы как *V. alginolyticus* с высоким показанием score - выше 2.250, 3 штамма - оказались представителями *V.parahaemolyticus* (score > 2.234). Один штамм сахарозо - позитивный, что характерно для *V.alginolyticus*, по данным масс-спектрометра идентифицирован, как *V.parahaemolyticus*. Среди штаммов *V.alginolyticus* (154) выявлено 4 штамма рода *Shewanella* (score > 2.289), недавно выделенного в определенную таксономическую группу.

Из 47 музейных штаммов *V.parahaemolyticus* - 8 идентифицировано как *V.alginolyticus* (score > 2.312); из 4 штаммов *Vmimicus* - 2 идентифицированы масс-спектрометрическим методом, как *V.vulnificus* (score > 2.197), а 2 оставшихся штамма определились как *V. alginolyticus* (score 2.348) и *Providencia* (score 2.280). Столь высокие показатели (score > 2.197) указывают на высокую степень достоверности результатов.

Таким образом, идентификация бактерий с использованием масс-спектрометрии MALDI переставляет собой альтернативу традиционным лабораторным методам во множестве областей применения, например, в экологических исследованиях. Примером тому может являться, применение масс-спектрометрии в области изучения судовых балластных вод, а также чрезвычайно полезным является использование масс-спектрометрического биотипирования в контроле качества коллекций микроорганизмов.

Представленный метод, в отличие от традиционных микробиологических методов, позволяет быстро и эффективно идентифицировать различные виды рода *Vibrio*. Использование масс-спектрометрического анализа позволяет повысить вероятность выявления холерных вибрионов на этапе отбора подозрительных колоний и повысить эффективность лабораторной диагностики. В результате работы нами уточнены коллекционные параметры 17 штаммов рода *Vibrio*.

Отсутствие в базе данных масс-спектров представителей возбудителя холеры ограничивает методику в плане идентификации холерных вибрионов, что ставит перед



нами задачу создания расширенной коллекции белковых профилей холерных вибрионов. Нами показано, что наличие в базе данных *V.albensis* позволяет выявить представителей вида *V. cholerae* не 01/ не 0139 серогруппы и провести их дальнейшую идентификацию классическими методами.

#### **Литература:**

1. Кубанова А.А., Говорун В.М., Ильина Е.Н., Верещагин В.А., Фриго Н.В., Припутневич Т.В. Первый опыт применения метода прямого белкового профилирования для идентификации и типирования *N. gonorrhoeae*!! Вестник дерматологии и венерологии. - 2006, № 5. - С. 25-29.
2. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крьюжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории // Вопросы диагностики в педиатрии. - 2011. - Т. 3, №5.-С.20-25.
3. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами. Дополнение к Методическим указаниям «Лабораторная диагностика холеры» МУК 4.2.1097-02. Методические указания. МУК 4.2.1793-03
4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Garrity-2<sup>nd</sup>. – New York: Springer – Vol.2B-2005.-P.1 108

УДК 614.8.01:616-036.22

### **РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ОЦЕНКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ МАССОВЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ**

*С.К. Удовиченко, В.П. Топорков*

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский  
противочумный институт «Микроб»  
г.Саратов, Россия*

**Аннотация.** Массовые международные мероприятия (ММ) всегда таят опасность возникновения чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера, как в принимающей стране, так и международном масштабе. Выбор мер и средств предупреждения и контроля ЧС должен осуществляться исходя из оценки уровня потенциальной эпидемической опасности ММ, с учетом его специфики, места и времени проведения.

**Ключевые слова:** массовые мероприятия, ЧС санитарно-эпидемиологического характера, эпидемиологический риск, потенциальная эпидемическая опасность массовых мероприятий

Проведение ММ сопряжено с «внешними» угрозами (обусловленными заносом инфекционных болезней) и «внутренними» угрозами, связанными с активизацией местных нозологических форм. Массовые мероприятия также являются «мишенью» для террористических актов, в том числе с применением биологических средств.

На сегодняшний день в мире отсутствует унифицированный подход к оценке потенциальной эпидемической опасности ММ, способный учитывать существующие угрозы для санитарно-эпидемиологического благополучия населения при проведении ММ.

Анализ 37 ММ, проведенных в мире в период с 1987 по 2012 годы, демонстрирует реальную опасность осложнения эпидемиологической обстановки – эпидемические осложнения в виде вспышек отмечались в 28 случаях (75%). Ведущими механизмами передачи инфекционных агентов были аспирационный (53,5 %) и фекально-оральный (43 %), доминирующими нозологическими формами – грипп (25 %) и норовирусная инфекция (14,3 %). 13 вспышек (46 %) возникли вследствие заноса инфекции приезжающими участниками и гостями.

Нами разработана схема оценки потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий на основании комплексной оценки эпидемиологического риска возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера, с учетом таких составляющих как территория риска, факторы риска, контингенты риска и время риска, присущим как эпидемиологической значимости конкретных территорий проведения ММ, так и самих ММ.

Расчет потенциальной эпидемической опасности Универсиады в Казани по предлагаемой нами схеме проведен в отношении актуальных инфекционных болезней, способных в соответствии с ММСП (2005 г.) и национальными СП 3.4.2318–08, вызвать ЧС в области общественного здравоохранения (лихорадка Денге, желтая лихорадка, полиомиелит, чума, холера, лихорадки Ласса, Марбург, Эбола, малярия, новый коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром – MERS-Cov).

При подготовке к Универсиаде в Казани эндемия по всем перечисленным выше болезням и условия ее проявления была проанализирована в странах Азии (юго-восточной, восточной, южной), Африки (западной, центральной, восточной, южной), Америки (центральной, южной, Карибскому бассейну), Океании. Проведена комплексная оценка эпидемиологических рисков, включающая помесячный анализ доминирования относительно влажных и относительно сухих климатических периодов, благоприятно сказывающихся на численности кровососущих членистоногих переносчиков и теплокровных носителей, являющихся факторами риска для контактирующих с ними людей (контингенты риска), сезонности возникновения заболеваний и заносов холеры. При этом дифференцированы низкий, средний и высокий уровни эпидемиологического риска, а, следовательно, потенциальной эпидемической опасности. Определены месяцы, наиболее опасные для проявления и реализации эпидемиологического риска (май-август).

Потенциальная эпидемическая опасность Универсиады-2013 определена как высокая в отношении холеры и лихорадки Денге, что обусловлено совпадением периода максимального уровня эпидемиологического риска в эндемичных странах-участниках и временем проведения Универсиады-2013 с учетом вероятности прибытия участников в допустимые сроки инкубационного периода болезни.

По аналогичному принципу проведена оценка рисков осложнения эпидемиологической обстановки по эндемичным для Республики Татарстан инфекционным болезням – ГЛПС, клещевому боррелиозу, клещевому вирусному энцефалиту, ЛЗН. Установлено, что в период проведения Универсиады высока вероятность активизации таких природно-очаговых болезней, как ГЛПС и ЛЗН.

Таким образом, приведенные принципиальные положения схемы оценки потенциальной эпидемической опасности Универсиады в Казани использованы для составления нами эпидемиологического прогноза на период проведения Универсиады в Казани и назначения целенаправленных мероприятий по предупреждению и контролю ЧС.

Холера была выбрана в качестве модели для оценки потенциальной эпидемической опасности ММ и конкретно Универсиады-2013.

Территориями риска по холере являются:

- первичные эндемичные территории Азии (Юго-Восточная Азия – Индия и др.);

- вторичные эндемичные территории Африки (неблагополучные страны, проявления холеры в которых обусловлены циркуляцией возбудителя внутри континента – Сомали, Камерун, Демократическая Республика Конго, Уганда, Сьерра Леоне и др.);

- эпидемически неблагополучные территории, на которых холера возникла вследствие недавних заносов (Гаити, Доминиканская Республика, Куба и др.).

Заносы холеры мы рассматриваем как интегральное выражение всех категорий риска.

Анализ распределения заносных случаев холеры по регионам мира показал, что в 76 % случаев холера заносилась из одной азиатской страны в другую, в 15,7 % – из стран Азии в страны Европы. Из стран Африки холера заносилась преимущественно в страны Европы (96 %). До возникновения эпидемии холеры на Гаити заносы инфекции наблюдались лишь внутри стран Американского континента. С октября 2010 г. и по настоящее время из Гаити заносы холеры зарегистрированы в Доминиканскую Республику с последующим распространением инфекции в 28 из 32 провинций, США, Канаду, Чили, Великобританию и Германию, из Доминиканской Республики – в США, Венесуэлу, Мексику и Испанию.

Заносы холеры в Россию наиболее часто (в 80 % случаев) происходят и реализуются из стран Азии.

Анализ эпидемических проявлений в многолетнем аспекте демонстрирует четко выраженную тенденцию к росту уровня заболеваемости холерой в мире, как на эндемичных территориях, так и в результате роста числа завозов холеры на свободные от этой инфекционной болезни территории: за период с 1961 по 1969 год общее число больных составило 417 190 (ср. в год 46 354), общее число заносов было невелико – 173 (ср. в год 19); с 1970 по 1990 год зарегистрировано 1 369 129 больных (ср. в год 65 197), отмечается выраженный рост импортированных случаев – 1 286 (ср. в год 61); за период с 1991 по 2011 год общее число больных – 5 412 216 (ср. в год 257 724), число заносных случаев холеры увеличилось до 3 371 (ср. в год 160).

На территории России с момента начала 7-й пандемии зарегистрировано 146 случаев заноса холеры, из них 4 – на территорию Республики Татарстан.

Анализ времени риска в сезонном аспекте. При оценке сезонного распределения 97 заносных случаев холеры в Россию, для которых известна дата заноса, установлено, что 2 случая инфицирования наблюдались в апреле, 7 – в мае, 15 – в июне, 26 – в июле, 43 – в августе, 4 – в сентябре. Максимальный риск заноса холеры в Российскую Федерацию приходится на июль-август (72 %), средний – май, июнь, сентябрь, минимальный – январь, февраль, март, апрель, октябрь, ноябрь, декабрь. Время проведения Универсиады в Казани в июле 2013 г. совпадает со временем максимального риска заноса холеры в Россию.

Таким образом, научно обоснована высокая потенциальная эпидемическая опасность Универсиады-2013 по холере, потребовавшая внесения существенных корректив в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения при подготовке и проведении этого ММ: усилен эпидемиологический надзор за холерой (увеличение срока мониторинговых исследований и корректировка точек отбора проб из поверхностных водоемов, усиление надзора за санитарно-гигиеническим состоянием мест массового отдыха и объектов туристского интереса), усилены мероприятия по санитарной охране территории, направленные на предотвращение заноса и распространения холеры, что нашло

отражение в специальном приказе Роспотребнадзора от 25.04.2013 г. № 236 «Об организации эпидемиологического надзора за холерой в период подготовки и проведения Всемирной летней Универсиады 2013 года в г. Казани».

УДК 578.825.11:616.9

## **СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ РЕЦЕПТОРОВ Fas/CD95 и DR3/LARD ПРИ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

*О.В. Уткин\*, \*\*, В.Д. Старикова\*\*, Н.А. Сахарнов\*, \*\*, Н.Р. Хилал\*\*,  
А.А. Бабаев\*\*, Е.Н. Филатова\**

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

*г.Нижний Новгород, Россия*

*\*\*ФГОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»*

*г.Нижний Новгород, Россия*

**Аннотация.** Дана качественная и количественная оценка встречаемости мРНК мембранных и растворимых форм рецепторов Fas/CD95 и DR3/LARD у лиц, инфицированных герпесвирусами. Определено содержание растворимых форм рецепторов Fas/CD95 и DR3/LARD в сыворотке крови пациентов с герпесвирусной инфекцией. Охарактеризована плотность экспрессии рецептора DR3/LARD на мембране лимфоцитов крови при герпесвирусной инфекции.

**Ключевые слова:** апоптоз, Fas/CD95, DR3/LARD, рецепторы смерти, герпесвирусная инфекция

В инициации апоптоза и регуляции иммунного ответа принимают участие трансмембранные рецепторы Fas/CD95 и DR3/LARD. Данные рецепторы проявляют высокий структурно-функциональный полиморфизм на разных уровнях реализации генетической информации (мРНК, белок). Изменение экспрессии генов Fas/CD95 и DR3/LARD приводит к модуляции иммунного ответа и может иметь клиническое значение.

Целью работы явился анализ экспрессии генов Fas/CD95 и DR3/LARD в крови при герпесвирусной инфекции (ГВИ) разной этиологии.

Для раздельной детекции мРНК мембранных и растворимых форм Fas/CD95 и DR3/LARD, а также определения относительного уровня их представленности в крови здоровых волонтеров и инфицированных лиц использовали методы ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени, включающие применение оригинальных праймеров и зондов, разработанных авторами.

Сывороточное содержание растворимых форм рецепторов Fas/CD95 и DR3/LARD определяли иммуноферментным методом с помощью специфических моноклональных антител.

Для определения плотности экспрессии рецептора DR3/LARD на мембране лимфоцитов крови использовали метод проточной цитометрии и показатель средней интенсивности флуоресценции (MFI).

При ГВИ разной этиологии относительный уровень представленности мРНК мембранной (mFas) и мРНК доминирующей растворимой формы (sFasTMDel) варьировал. При инфицировании вирусом ветряной оспы (ВВО) уровень мРНК mFas и мРНК sFasTMDel снижался по сравнению со здоровыми волонтерами ( $p < 0,001$ ). При ВЭБ-инфекции (вирус Эпштейна-Барр) снижался

только уровень мРНК mFas ( $p=0,004$ ), а уровень мРНК sFasTMDel не менялся. Инфицирование цитомегаловирусом (ЦМВ) не сопровождалось изменениями в уровнях представленности мРНК mFas и мРНК sFasTMDel.

В крови здоровых волонтеров, а также пациентов с ГВИ выявлялись 6 вариантов мРНК Fas/CD95, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга (mFas, sFasTMDel, sFas4Del, sFas3,4Del, sFas4,6Del и sFas3,4,6Del). В крови мРНК mFas и мРНК sFasTMDel детектировали у всех здоровых волонтеров. Матричная РНК mFas также выявлялась у всех пациентов, а мРНК sFasTMDel у 81 из 92. Встречаемость других сплайсированных форм мРНК Fas/CD95 варьировала как у здоровых волонтеров, так и пациентов с ГВИ. При инфицировании ВВО и ЦМВ мРНК FasExo4Del детектировалась чаще, а мРНК FasExo3,4,6Del реже, чем у здоровых волонтеров ( $p<0,05$ ). По сравнению со здоровыми волонтерами мРНК FasExo4,6Del выявлялась реже во всех группах инфицированных лиц ( $p<0,001$ ).

Выявленные особенности транскриптома клеток крови лиц, инфицированных герпесвирусами, сопоставляли с содержанием растворимого Fas/CD95 (sFas/sCD95) в сыворотке крови. Известно, что сывороточный пул sFas/sCD95 представлен мономерными и олигомерными формами рецептора, проявляющими разные функции. Мономерная форма sFas/sCD95 блокирует передачу цитотоксического сигнала, а олигомерная форма рецептора проявляет проапоптотические свойства. При инфицировании ЦМВ и ВЭБ-инфекции сывороточное содержание мономерного и олигомерного sFas/sCD95 превышало показатели здоровых волонтеров ( $p<0,05$ ). В отношении ВВО различий в содержании sFas/sCD95 обнаружено не было.

В отношении гена рецептора DR3/LARD наблюдалась иная картина экспрессии. По данным литературы выделяют 4 мРНК, кодирующие мембранные формы рецептора (mDR3/mLARD) и 10 мРНК, соответствующих растворимым формам (sDR3/sLARD). При инфицировании ВВО, ЦМВ и ВЭБ уровень представленности пула мРНК mDR3 превышал показатели здоровых волонтеров ( $p<0,001$ ). При этом вне зависимости от этиологии ГВИ плотность экспрессии рецептора DR3/LARD имела только тенденцию к увеличению ( $p>0,05$ ). Повышение уровня представленности пула мРНК sDR3/sLARD наблюдалось только при инфицировании ВВО и ВЭБ ( $p<0,001$ ). ЦМВ-инфекция сопровождалась снижением данного показателя ( $p<0,001$ ). Сывороточный уровень sDR3/sLARD превышал показатели здоровых волонтеров только при ВЭБ-инфекции ( $p<0,001$ ). В отношении других нозологических форм ГВИ различий обнаружено не было.

Дополнительно в крови здоровых волонтеров и инфицированных лиц с различной частотой выявлялись 4 формы мРНК DR3/LARD (2 мембранные формы - LARD 1a и DR3 $\beta$ ; 2 растворимые формы - LARD 3 и soluble DR3 $\beta$ ). У здоровых волонтеров данные варианты мРНК DR3/LARD выявлялись приблизительно с одинаковой частотой. При инфицировании ВВО мРНК soluble DR3 $\beta$  детектировалась реже ( $p=0,035$ ). В отношении инфицирования ЦМВ и ВЭБ различий в частоте выявления сплайсированных вариантов мРНК DR3/LARD обнаружено не было.

Таким образом, при герпесвирусной инфекции разной этиологии происходят качественные и количественные изменения в составе мРНК рецепторов Fas/CD95 и DR3/LARD в крови, а также изменения в сывороточном содержании растворимых форм данных рецепторов. В целом они направлены на модуляцию сигнальных событий апоптоза и сдерживание противовирусного иммунного ответа, что может быть звеном патогенеза, которое обеспечивает пожизненное сохранение герпесвирусов и их циркуляцию в организме хозяина.

Всесторонний анализ экспрессии рецепторов Fas/CD95 и DR3/LARD может быть использован для мониторинга герпесвирусной инфекции. В зависимости от этиологии возбудителя более информативными становятся конкретные показатели.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг и РФФИ (проект №11-04-97088р\_поволжье\_a).

УДК 616-036.22:616.9

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЛЕПТОСПИРОЗАМ НА ЮГЕ РОССИИ

*Е. Н. Чеботарева, В. Н. Надеина.*

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»  
г. Ставрополь, Россия*

**Аннотация.** Приведены данные о тенденциях, удельном весе в заболеваемости лептоспирозами в Российской Федерации, и отдельных субъектах южного региона России, районировании изучаемых территорий по уровню заболеваемости лептоспирозами людей, этиологической структуре лептоспирозов, источниках и факторах передачи инфекции, данные эпидемиологического и эпизоотологического анализа.

**Ключевые слова:** лептоспирозы, заболеваемость, эпидемиологическая ситуация, эпизоотологическая ситуация, районирование.

Проблема борьбы с лептоспирозами является особенно актуальной для южного региона Российской Федерации в связи с его климато-географическими хозяйственно-экономическими особенностями.

Теплый климат, бассейны крупных рек (Волги, Дона и Кубани), обилие осадков на значительной территории в отдельные сезоны года, наводнения и паводки, наличие лиманов, густая сеть искусственных водоемов, мелких рек и поливных каналов, а также разнообразие флоры и фауны, развитое животноводство и растениеводство, в том числе рисоводство и рыбоводство обеспечивают условия укоренения лептоспирозной инфекции на территории Юга России. В Краснодарском крае находятся основные морские курорты России, а в Ставропольском крае курорты Кавказских Минеральных Вод.

Наибольший удельный вес в заболеваемости людей лептоспирозами в РФ с 2010 г. по 2012 г. занимали Центральный и Северо-Западный федеральные округа. В Южном федеральном округе зарегистрировано 12% больных, в Северо-Кавказском – 4%, в Приволжском федеральном округе - 14% , в Сибирском – 4%; на Уральский и Дальневосточный федеральные округа приходится по 1%.

На территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов, далее именуемых Югом России, в эти же годы зарегистрировано 159 больных. На Юге России наибольший удельный вес в заболеваемости лептоспирозами продолжает занимать Краснодарский край (71,7%), Ставропольский край – на втором месте (14,5% больных). В Республике Адыгея и Ростовской области зафиксировано по 3,8% заболевших, в Республике Северная Осетия-Алания – 2,5%, в Волгоградской области и Карачаево-Черкессии – по 1,3%, в Кабардино-Балкарской Республике и Республике Дагестан – по 0,6%, в Республике Калмыкия, Ингушетия, Чеченской

Республике и Астраханской области заболеваний лептоспирозами не зарегистрировано (рис.1).

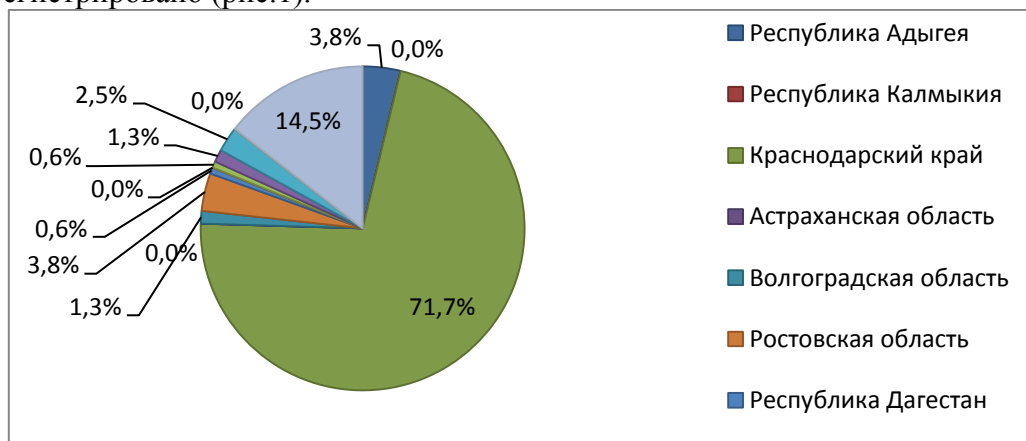


Рис. 1. Удельный вес субъектов РФ, расположенных на Юге России в заболеваемости лептоспирозами в 2010-2012 г.г.

Краснодарский край является наиболее неблагоприятной территорией по заболеваемости лептоспирозами. Заболеваемость регистрируется во всех городах и районах Краснодарского края практически ежегодно, характерна вспышечная заболеваемость. Территории 10 районов, расположенных в лиманно-плавневом и равнинно-степном ландшафтных районах по течению рек Азовского бассейна отнесены к зоне очень высокого риска заражения, 23 района и г.Кропоткин, расположенные в равнинно-степной ландшафтном районе – к зоне высокого риска заражения, остальные 8 районов и 6 городов, расположенных в предгорно-горной и причерноморской ландшафтных районах – к зоне умеренного риска заражения. Заболеваемость лептоспирозами в Краснодарском крае имеет тенденцию к снижению, средний многолетний показатель заболеваемости лептоспирозами на 100 тыс. населения с 2005 г. по 2011 г. составил  $1,56 \pm 0,85$ .

В период с 1997 г. по 2010 г. в крае зарегистрировано 19 неблагоприятных районов, постоянно выявляются эпизоотии в природных очагах и основным носителем в природе являются серые крысы, среди которых циркулируют лептоспиры серогруппы *Icterohaemorrhagiae* (80%).

В республике Адыгея, расположенной внутри границ Краснодарского края, регистрируется как спорадическая, так и вспышечная заболеваемость. С начала 21 века заболеваемость в республике имеет тенденцию к снижению, с ежегодной регистрацией спорадических случаев. Средний многолетний показатель заболеваемости лептоспирозами на 100 тыс. населения в республике с 1997 г. по 2008 г. составил 2,5.

С 1991 г. по 2003г. в республике зарегистрировано 3 неблагоприятных пункта по лептоспирозам. Наиболее неблагоприятным является Тахтамукайский район, в котором за период с 1997 г. по 2008 г. зарегистрировано 33,8% случаев лептоспироза от общего числа заболевших в республике. Тахтамукайский район – один из самых больших и густонаселенных районов, граничащий с районами Краснодарского края, отнесенными к территории с очень высокой заболеваемостью населения лептоспирозами [2].

Наибольшее число заболеваний в республике за этот период было вызвано лептоспирами серогруппы *Icterohaemorrhagiae* (70,87%).

В Ставропольском крае заболеваемость лептоспирозами имела волнообразный характер. В 2001 г., 2003 г. и 2005 г. наблюдались вспышки «купального» характера в Красногвардейском районе. Тенденция заболеваемости лептоспирозами в 2005 - 2012 гг. характеризуется нестабильным снижением. В Ставропольском крае зарегистрировано 55 неблагоприятных пунктов. При

ранжировании территории Ставропольского края по уровню заболеваемости лептоспирозами, Красногвардейский и Кировский районы отнесены к территориям с высокой заболеваемостью; 13 административных районов и города Невинномысск и Ставрополь, расположенные в основном в предгорно-степном и равнино-степном ландшафтах отнесены к территориям с умеренной заболеваемостью; 11 районов, преимущественно расположенных в полупустынном, лесостепном районах, частично в предгорно-степном и равнино-степном районах и курортные города Кавказских Минеральных Вод – к территориям с минимальной заболеваемостью. Этиологическая структура лептоспирозов людей в Ставропольском крае в последние годы неоднократно претерпевала изменения. В период с 1998 г. по 2000 г. наиболее часто регистрировались лептоспиры серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, в 2001 г. – *Gripootyphosa*, с 2002 г. по настоящее время – лептоспиры серогруппы *Sejroe* [3].

На территории края, постоянно выявляются эпизоотии в природных очагах, выявлена инфицированность мелких мышевидных грызунов лептоспирами серогрупп *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*.

Заболеваемость лептоспирозами в республике Дагестан (РД) за последние 15 лет ограничивается единичными случаями. Она отнесена к территории с низкой заболеваемостью лептоспирозами.

С 1997г. по 2008г. в республике выявлено 8 неблагополучных по лептоспирозу сельскохозяйственных животных пунктов. Многочисленные природные очаги лептоспироза на территории республики выявлены во всех ландшафтно – географических зонах. Значительное распространение и увеличение случаев лептоспироза среди сельскохозяйственных животных наблюдается в период весенних и осенних перегонов скота, где они контактируют с дикими животными – лептоспираносителями [1].

В качестве источников и факторов передачи инфекции на изученных территориях Юга России преобладает вода открытых водоемов (от 33 до 100% в различных субъектах), в РД и Ставропольском крае источником инфекции чаще являлись сельскохозяйственные животные, в Республике Адыгея и Краснодарском крае – мышевидные грызуны.

На всех административных территориях среди больных лептоспирозами преобладают мужчины, чаще болеют сельские жители. До 2001 г. заболеваемость на 100 тыс. городского населения Ставропольского края несколько превышала аналогичный показатель среди сельского населения. С 2001 г. ситуация резко изменилась: заболеваемость в сельской местности многократно (в 2-18 раз в разные годы) превышала количество больных лептоспирозами в городах. Это указывает на ведущую роль сельскохозяйственных животных в эпидемическом процессе лептоспирозов.

Таким образом, динамика заболеваемости лептоспирозами в ряде субъектов Юга России имеет тенденцию к снижению, что достигнуто активными профилактическими мероприятиями, в первую очередь вакцинацией населения по эпидемическим показаниям в Краснодарском и Ставропольском краях, отнесенных к территориям с высокой заболеваемостью.

#### **Литература:**

1. Айдиев, А. Б. Эпизоотология лептоспироза крупного рогатого скота в Республике Дагестан: автореф. дис. ... канд. ветеринарных наук. - СПб. – 2003.
2. Самарина, И. В. Современные аспекты эпидемиолого-эпизоотической ситуации по лептоспирозам на Юге России / И.В. Самарина, Д.С. Агапитов, В.П. Надеина //Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств – участников СНГ: матер. X Межгосударственной науч.-



практ. конф. государств – участников СНГ (5-6 октября 2010 г., Ставрополь) / под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева, А.Н. Куличенко. - Ставрополь, 2010. - С. 114-115.

3. Эпидемиологическая ситуация по лептоспирозам в Ставропольском крае матер. науч.-практ. конф. «Здоровье населения и среда обитания» «15-я Ежегодная Неделя медицины Ставрополья» И.В. Самарина [и др.]. – Ставрополь, 2011. – С. 122-126. - Библиогр.: 4 – рус.

УДК 621.384.8

## **ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ *COCCIDIOIDES* SPP. И ДРУГИХ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МИКРОМИЦЕТОВ**

*Т.Н. Шаров, Д.В. Викторов, М.А. Гришиной.*

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»  
г.Волгоград, Россия*

**Аннотация.** В настоящее время повсеместно наблюдается увеличение числа лиц с иммунной недостаточностью, расширение спектра видов патогенных грибов, способных как вызвать вспышки заболеваний в силу естественных причин, так и стать агентами биотерроризма. Чрезвычайно актуальным направлением микробиологии, молекулярной биологии и эпидемиологии является совершенствование существующих методик экспресс-идентификации и типирования микромицетов, а также разработка новых методов и оценка их эффективности.

**Ключевые слова:** клинически значимые микромицеты, масс-спектрометрия, типирование

По мере развития микробиологии и медицинской микологии, было множество попыток применения различных по своей сути и эффективности методов идентификации и типирования микромицетов. Наиболее эффективными оказались относительно недавно внедренные в исследовательскую практику генетические методы, прежде всего основанные на методе ПЦР. Они не только обеспечивают возможность точной и быстрой дифференцировки микроорганизма до уровня штамма, но и позволяют подстроить изначальный протокол метода под конкретные нужды эпидемиолога, без снижения точности результата. Однако, масс-спектрометрические методы, обладая большим потенциалом, не могли его проявить, в силу отсутствия технической базы, достаточной для конкуренции с генотипическими методами. С появлением тандемных масс-спектрометров и «мягких» методов ионизации, масс-спектрометрия по многим параметрам (разрешающая способность, чувствительность) могут не уступать генотипическим методикам, а по некоторым (скорость анализа, стоимость расходных материалов) обладают явным преимуществом.

Масс-спектрометрия представляет собой метод исследования состава вещества путем ионизации молекул с последующей регистрацией масс-спектра (двумерного отображения количества заряженных частиц в зависимости от отношения их массы к заряду). В настоящее время разработано специальное программное обеспечение для изучения белковых масс-спектров, созданы базы данных, содержащие информацию о референтных спектрах микроорганизмов. Возможность получения специфичных для конкретного штамма масс-спектров с последующим их анализом даёт основание использовать данный метод для

идентификации и внутривидовой классификации микроорганизмов. Из всех, описываемых в литературе разновидностей масс-спектрометрии, наиболее эффективным в плане типирования является метод времяпролетной спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF – matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight). Ионизация лазером относится к «мягким» методам ионизации, и оптимальна для работы с высокомолекулярными соединениями, например с белками. Преимуществами масс-спектрометрического метода типирования являются относительная дешевизна (основные расходные материалы – растворы матриц для ионизации), возможность экспресс-анализа (пробоподготовка занимает 5-10 минут на один образец, а непосредственно процедура снятия спектра приблизительно - 1-2 минуты на образец), а также возможность проведения анализа большого количества образцов. Кроме того, применение соответствующего программного обеспечения, позволяет автоматизировать процесс и избавляет от необходимости самостоятельно интерпретировать спектры.

Целью нашей работы было получение точных и воспроизводимых масс-спектров различных штаммов *Coccidioides* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. Наличие этих спектров позволило бы проводить внутривидовое типирование этих микромицетов или экспресс-диагностику материала, содержащего грибную культуру. Основные трудности для данной работы представляют наличие у грибов прочной клеточной стенки и принадлежность возбудителя кокцидиоидомикоза к II-й группе патогенности. Вирулентность возбудителей особо опасных микозов требует предварительного проведения обеззараживающей обработки, и последующей проверки материала на стерильность. А поскольку MALDI это метод белкового профилирования, прочная и химически устойчивая клеточная стенка клеток микромицетов снижает выход белка и, соответственно, качественные и количественные характеристики спектра. Эта проблема также требует разработки унифицированного метода пробоподготовки образцов. Первоначально, получали масс-спектры культуры *Coccidioides*, предварительно обеззараженной 0,5% раствором мертиолята натрия. В случае с дрожжевыми грибами, для эксперимента использовали интактный материал, взятый прямо с питательной среды. Полученные спектры имели достаточно характерный для всех микромицетов вид с наличием группы сливающихся нечетких пиков средней величины в районе до 3 кДа. Предположительно, это связано с тем, что клетки грибной культуры не разрушались, и пики на спектрах принадлежат не белкам, а полисахаридам, хитину, и другим компонентам клеточной стенки. Очевидно, что интактный клеточный материал не годился для получения характеристических спектров возбудителей грибковых заболеваний.

Было опробовано несколько различных методов пробоподготовки, описанных в литературных источниках. Следует отметить, что эти методы не были опробованы на возбудителях особо опасных микозов. Один из методов включал в себя экспозицию образца в 80%-м растворе трифторуксусной кислоты, и применялся для обеззараживания возбудителя сибирской язвы и получения его масс-спектров. Результаты испытания этого метода показали его эффективность в том, что касалось обеззараживания. Однако, значимого улучшения качества масс-спектра при этом не наблюдалось, что может быть обусловлено несколькими причинами. Во-первых, трифторуксусная кислота может быть недостаточно эффективной для комплексного разрушения грибной клеточной стенки. В том случае, если ТФУ все же разрушает клеточную стенку, причиной может являться негативное влияние кислоты на структуру высвободившихся белков. Характерным признаком обработки ТФУ является наличие на спектрах одного или двух очень высоких пиков на фоне достаточно интенсивного шумового

сигнала. Вполне вероятно, что этот реагент разрушает часть белков и способствует образованию значительного числа разнозаряженных фрагментов с низкой интенсивностью. А высокие пики соответствуют белкам, изначально присутствующим в клетке в большом количестве, поэтому не столь сильно страдающим от воздействия ТФУ. В целом метод явно требовал дальнейшей модификации.

Следующим использованным нами методом пробоподготовки был метод экстракции белков ацетонитрилом, после предварительной обработки этанолом и муравьиной кислотой. Этот метод использовался для пробоподготовки достаточно большого числа патогенных микроорганизмов, в том числе и некоторых микромицетов. В изначальном варианте этот метод использовался нами для пробоподготовки *Candida*spp. и *Cryptococcus*spp. Сравнение спектров показало улучшение качества при использовании метода, по сравнению с нативной культурой. Обработанный материал демонстрирует наличие большего количества высоких и четких пиков при меньшей интенсивности шумовых сигналов. Однако качества спектра было пока недостаточно для проведения автоматической идентификации по базе данных SARAMIS. В связи с полученными результатами, было решено дополнить или модифицировать изначальные протоколы описанных методов под работу с имеющимися микромицетами. В частности для пробоподготовки *Coccidioides*spp. мы использовали второй из описанных методов, заменив муравьиную кислоту более сильной трифторуксусной с последующим разбавлением образца после экспозиции. Также в пробирки с образцами добавлялись стеклянные бусы, а образцы прогревали 10 минут при 50°C. Каждый из образцов обработанного материала проходил обязательную проверку на стерильность. Результаты продемонстрировали видимое улучшение качества спектров по сравнению с первоначальным протоколом. Уровень шума был меньше, а количество и четкость пиков возросли.

В целом, можно сделать заключение о несомненной необходимости дальнейшей работы по дополнению и улучшению методов пробоподготовки культур микроскопических грибов. Пока проделана лишь часть работы в этой области, и качественные и количественные характеристики получаемых спектров недостаточны, однако существенные улучшения заметны уже сейчас, что свидетельствует о верном направлении исследования.

#### **Литература:**

1. C. Santos, R.R.M. Paterson, A. Venancio, N. Lima. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. 108 (2010) 375–385.
2. X. Iriart, R. Lavergne, J. Fillaux et al. Routine identification of medical fungi by MALDI-TOF: performance of the new VITEK® MS using a new time-effective strategy. *J. Clin. Microbiol.* 11 April 2012. doi:10.1128/JCM.06713-11.
3. A. Ferroni, S. Suarez, J. Beretti et al. Real-Time Identification of Bacteria and *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48(5):1542. DOI:10.1128/JCM.02485-09.
4. G. Marklein, M. Josten, U. Klanke et al. MALDI - TOF Mass-Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.00389-09.
5. S. Q. van Veen, E. C. J. Claas, and Ed J. Kuijper. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of clinical microbiology*, Mar. 2010, p. 900–907.

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АППАРАТА ДЛЯ СУХОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ  
«НОКОСПРЕЙ»**

*А.В. Шиповалов, О.П. Оськина, В.В. Золин*

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
г. Новосибирск, Россия*

**Аннотация.** В работе представлены результаты экспериментальной оценки эффективности дезинфекции поверхностей помещений «заразной» зоны аэрозолями перекиси водорода с использованием аппарата «Нокоспрей» (производитель ОХУРНАРМ). Выявлены закономерности действия пероксидных аэрозолей и отличительные особенности аппаратов подобного класса.

**Ключевые слова:** аэрозольная дезинфекция, оценка, газовая дезинфекция, тест-культуры

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (далее Центр) является крупным вирусологическим и биотехнологическим научным учреждением и сотрудничающим центром ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музеем штаммов и ДНК вируса оспы. В подразделениях Центра ведутся работы с патогенами I-IV групп опасности, отличающихся как по биофизическим свойствам, так и по устойчивости на объектах окружающей среды.

В организациях, работающих с особо опасными инфекциями, передающихся воздушно-капельным путем, в том числе и в ГНЦ ВБ «Вектор», обеззараживание формальдегидом в течение многих лет являлось общепринятым процессом стерилизации «заразных» зон микробиологически опасных помещений площадью более 1000м<sup>2</sup>, боксов микробиологической безопасности и другого лабораторного оборудования после аварийных ситуаций, при возникновении контаминации клеточных культур, при завершении цикла работ в помещениях «заразных» зон. Данный процесс имеет некоторые недостатки (длительная экспозиция, отложения остатков перманганата калия после возгонки, необходимость нейтрализации формальдегида после проведения обработки, токсичность, аллергенность и, по некоторым данным [1, С. 14-22], канцерогенность формальдегида). Однако попытки оптимизировать процесс стерилизации лабораторных помещений большого объема и сложной конфигурации или разработать методику проведения стерилизующей дезинфекции с применением других дезинфицирующих средств, предпринимаемые в Центре, не привели к ожидаемым результатам.

Тем не менее, за рубежом есть примеры использования растворов перекиси водорода различной концентрации для аэрозольной дезинфекции помещений «заразных» зон небольшого объема и простой конфигурации, например, в Центрах по Контролю и Профилактике Заболеваний (CDC), США.

В силу специфики работы, отдел биобезопасности ГНЦ ВБ «Вектор» следит за развитием новых технологий в области обеспечения биобезопасности при работе с ПБА I-IV групп. Поэтому большой интерес вызвало предложение протестировать аппарат «Нокоспрей» (производитель ОХУРНАРМ) для аэрозольной дезинфекции помещений объемом до 500м<sup>3</sup>. Принцип работы основан на использовании комбинации «аппарат–средство»: «Нокоспрей» – «Ноколиз». Активно действующими веществами «Ноколиза» являются перекись водорода (6%) и нитрат серебра (5 мг/л).

После получения результатов испытания аппарата «Нокоспрей» с дезинфицирующим средством «Ноколиз», не удовлетворяющих предъявляемым требованиям о полной стерилизации помещения, по согласованию с производителем, было решено использовать в эксперименте 30% перекись водорода, так как в установках для аэрозольной дезинфекции комплексов «чистых» помещений применяют именно такую концентрацию данного дез. раствора [2, С. 21-22].

Цель настоящей работы – изучение эффективности аппарата «Нокоспрей» при аэрозольной дезинфекции боксированных помещений «заразной» зоны ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

#### **Материалы и методы**

В работе использовали стандартные тест-культуры *Serratia marcescens* штамм В-10 (грамотрицательные бактерии семейства Enterobacteriaceae) и *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (грамположительные спорообразующие бактерии семейства Bacillaceae).

Для аэрозольной дезинфекции применялся аппарат «Нокоспрей» с рабочими дезинфицирующими средствами «Ноколиз» (перекись водорода (6%), нитрат серебра (5 мг/л)) и перекись водорода (30%).

В качестве нейтрализатора для кислородактивных дезинфицирующих веществ, согласно МУ 3.5.2431-08 [3, С. 5], был использован 0,3% раствор тиосульфата натрия.

Испытания проводили в боксированном помещении с предбоксником и термальной комнатой (общий объем помещения 144м<sup>3</sup>; приточно-вытяжная вентиляция отключена).

Культуры тестовых микроорганизмов, выращенные на плотной питательной среде в течение 36-48 часов, смывали 0,9% стерильным изотоническим раствором хлорида натрия. Батистовые тесты (по 30 шт на каждую тест-культуру) размером 1x1 см пропитывали суспензией тест-культур с исходной концентрацией 10<sup>9</sup> КОЕ/мл, приготовленной по стандарту мутности (ГИСК им. Тарасевича Л.А.), и размещали на объектах и поверхностях боксированного помещения на высоте от 0 до 3м. После аэрозольной обработки (регулятор «Нокоспрея» был выставлен на отметку 200м<sup>3</sup>, расход дез.средства 200мл, скорость распыления 10мл/мин) и 3-часовой экспозиции, тесты снимали и помещали в пенфлаконы с 5 мл 0,3% раствора тиосульфата натрия в качестве нейтрализатора дезинфектанта. Затем 0,5 мл жидкости из пенфлаконов высевали на чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА). Содержание бактерий на контрольных тестах определяли на МПА прямым посевом при разведении в физрастворе. Чашки Петри термостатировали в течение 2 суток при температуре 37°С для *B. thuringiensis* и 27°С для *S. marcescens*, после чего учитывали результаты.

Определение концентрации бактерий на тестах проводили в трех независимых повторах стандартным методом указанным выше; сравнение концентраций проводили при использовании t-теста Стьюдента на 95% уровне значимости отличий. Данные представляли в виде М (среднее значение) ± I<sub>95</sub> (доверительный интервал).

#### **Результаты и обсуждение**

При оценке эффективности аппарата «Нокоспрей» с дезинфектантом «Ноколиз» были получены следующие результаты. Максимальное полученное снижение концентрации *S. Marcescens* (p<0,05) в 20 раз ( $5\pm 3 \times 10^7$  КОЕ/тест) по сравнению с контролем ( $10\pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) наблюдали вдоль оси распыляемой струи дезинфектанта на расстоянии 5м от аппарата на высоте от 0 до 3м. Такие же результаты были получены возле входной двери в предбоксник боксированного

помещения. По нашему мнению, это могло быть следствием движения потоков воздуха в сторону вышеуказанной двери, обусловленного включенной в соседнем помещении вентиляцией. Среднее снижение концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) в целом по всем контрольным точкам составило по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) в 10 раз ( $10 \pm 5 \times 10^7$  КОЕ/тест). Максимальное снижение концентрации *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в 100 раз ( $10 \pm 5 \times 10^6$  КОЕ/тест) наблюдали вдоль оси распыляемой струи дезинфектанта на расстоянии 5 м от аппарата на высоте 3 м. Среднее снижение концентрации *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в целом по всем контрольным точкам составило по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) в 10 раз ( $10 \pm 5 \times 10^7$  КОЕ/тест).

Исследование эффективности аппарата «Нокоспрей» с 30% раствором перекиси водорода в качестве дезинфектанта показало максимальное снижение концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) в  $10^6$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^2$  КОЕ/тест) по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) вдоль оси распыляемой струи дезинфектанта на расстоянии 5-7 м от аппарата на высоте 3 м. Возле входной двери в предбоксник боксированного помещения наблюдалось снижение концентрации *S. marcescens* в  $10^5$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^3$  КОЕ/тест), что достоверно выше среднестатистического снижения концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) по всем контрольным точкам. Среднее снижение концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) в  $10^3$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^5$  КОЕ/тест). Максимальное снижение концентрации *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в  $10^7$  раз ( $100 \pm 50$  КОЕ/тест) наблюдали вдоль оси распыляемой струи дезинфектанта на расстоянии 5-7 м от аппарата на высоте 3 м. Среднее снижение концентрации *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в целом по всем контрольным точкам составило по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) в  $10^6$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^2$  КОЕ/тест). В результате испытания были получены данные, позволяющие судить о влиянии экранирующего действия конфигурации помещения и предметов интерьера. Так, на тестах, размещенных параллельно оси распыляемой струи дезинфектанта, на стене в 10 см по обе стороны от угла (высота размещения и расстояние от оси распыляемой струи дезинфектанта одинаковы), наблюдали снижение концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) в 100 раз ( $10 \pm 5 \times 10^6$  КОЕ/тест) в случае теста, расположенного ближе к аппарату, и в 10 раз ( $10 \pm 5 \times 10^7$  КОЕ/тест) в случае теста, расположенного за углом, снижение концентрации *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в  $10^6$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^2$  КОЕ/тест) по сравнению с контролем ( $10 \pm 5 \times 10^8$  КОЕ/тест) было одинаковым в обоих случаях. Тесты, размещенные за выступающей вертикальной частью Бокса Биологической Безопасности на оси распыляемой струи дезинфектанта на расстоянии 5 м от аппарата на высоте 1,5 м, показали снижение концентрации *S. marcescens* и *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в 10 раз ( $10 \pm 5 \times 10^7$  КОЕ/тест). Тесты, размещенные параллельно оси распыляемой струи дезинфектанта, один – на шкафу высотой 2 м, другой – свободно висел над шкафом на высоте 3 м, показали достоверное снижение концентрации *S. marcescens* ( $p < 0,05$ ) в  $10^3$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^5$  КОЕ/тест) и в  $10^4$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^4$  КОЕ/тест), *B. thuringiensis* ( $p < 0,05$ ) в  $10^4$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^4$  КОЕ/тест) и в  $10^6$  раз ( $10 \pm 5 \times 10^2$  КОЕ/тест) соответственно.

### **Выводы**

Применение аппарата «Нокоспрей» совместно с дезинфицирующим средством «Ноколиз» для аэрозольной дезинфекции при расходе препарата  $1 \text{ мл/м}^3$  оправдано только для помещений небольшого объема и при незначительной его обсемененности, на объектах, где не требуется полная стерилизация воздуха и поверхностей помещения и оборудования, для санации мест общего пользования. Использование 30% перекиси водорода малоэффективно из-за конструктивных особенностей прибора (одно сопло, узконаправленная струя дезинфектанта, угол распыления порядка  $45^\circ$  генерирование крупнодисперсных частиц

дезинфицирующего средства, рабочее положение – в максимально открытом углу помещения на полу), влияния воздушных потоков в конкретном помещении, экранирующего действия предметов интерьера и т.п.

Анализ полученных нами результатов показал, что применение оборудования для «сухой» дезинфекции аэрозолями «заразных» зон большой площади перспективно, но требует разработки методики проведения дезинфекции с учётом влияния вышеперечисленных факторов, дальнейших испытаний подобных аппаратов в различных условиях (влияние температуры, влажности в помещении и т.п.), подбора современных биоразлагаемых малотоксичных дезинфектантов, применимых для подобных аппаратов.

**Литература:**

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. Vol. 88. Lyon; France. – 2006. – 497 p.
2. Томас В. Стерилизация помещений и оборудования парами перекиси водорода (VHP)/Доклад на симпозиуме ICCCS//Технология чистоты, 2012. – №3. – С. 21-24.
3. МУ 3.5.2431-08 Изучение и оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств: Методические указания, 2008. – 30 с.