

Материалы
Всероссийской заочной
научно – практической
конференции с
международным участием
**«Микробиология в
современной медицине»**

Казань, 16 марта 2013 г.

Организаторы Всероссийской заочной научно – практической конференции с международным участием
«Микробиология в современной медицине»

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии:

Поздеев О. К. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского государственного медицинского университета

Мусина Л. Т. – д.м.н., профессор кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского университета

Савинова А. Н. – к.б.н., доцент кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского университета

Федорова Е. Р. – к.м.н., доцент кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского университета

Валеева Ю. В. – к.м.н., ассистент кафедры микробиологии Казанского государственного медицинского университета.

Оглавление

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К β -ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ <i>О.К. Поздеев</i>	10
ВЛИЯНИЕ ГАЛОГЕН-ПРОИЗВОДНЫХ ФУРАНОНОВ НА АЗОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ БАЦИЛЛ <i>Э.Н. Хакимуллина, Е.Ю. Тризна, А.Р. Курбангалиева, А.Р. Каюмов</i>	17
РОЛЬ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> В ЭТИОЛОГИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ <i>Т.И.Бурганова, И.Р.Валиуллина, З.З.Насыбуллова, М.П.Шулаева</i>	20
ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ <i>PROTEUS MIRABILIS</i> <i>И.Р. Галиева, Н.М. Замалютдинова, А.М. Марданова</i>	22
ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПИРОГЕНАЛ» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В СИСТЕМЕ <i>IN VITRO</i> <i>И.И. Долгушин, Т.Г. Смирнова, А.Ю. Савочкина, В.А. Маркова, И.В. Самусева</i>	24
ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ИЗ НЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ ГОРОДА АЛЬМЕТЬЕВСКА <i>К.И.Гарифулина, Р.Шах Махмуд</i>	26
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ <i>А.А. Сазанская</i>	28
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ АМБУЛАТОРНЫХ И ГОСПИТАЛЬНЫХ ПАЦИЕНТОВ г. КАЗАНИ <i>Ю.А. Тюрин, Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, Р.С. Фассахов</i>	29
ДЕТЕКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ МЕТОДОМ ЭПР <i>А.В. Макеева, А.П. Ложкин, А.А. Родионов, П.В. Зеленихин</i>	32

ДИНАМИКА РОСТА КУЛЬТУРЫ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> В ПРИСУТСТВИИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БАКТЕРИЦИДНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ <i>А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен, В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов.</i>	34
ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ <i>Н.В. Белоногова, А.Б. Маргулис.</i>	36
ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ <i>Е.А.Зайцева.</i>	39
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА VNTR-ТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР <i>Ю. А. Панфёрова, Т. А. Лукьянова.</i>	42
КАРИЕС ЗУБОВ И МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЕТА У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА <i>Н.И. Смоляр, К.Г. Мусий-Семенцев.</i>	46
ЛАКТОБАЦИЛЛЫ «НАРИНЭ»: ИНГИБИРОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА АЗИДА НАТРИЯ В ТЕСТЕ ЭЙМСА <i>Н.С. Карамова, М.А. Кириллова.</i>	48
МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ УСЛОВНО–ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА <i>PROVIDENCIA</i> <i>Е.В. Шляпникова, Н.М. Замалютдинова, А.М. Марданова.</i>	50
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ <i>М.У. Дусмагамбетов, А.М. Дусмагамбетова, М.П.Гаврилов, О.В.Гаврилова, М.Т.Бердюгин, О.С. Бутримова, Т.А. Дружинина.</i>	53
МИКРОБНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА ЗАЩИЩАЕТ <i>IN VITRO</i> КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ОТ ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1 <i>Р. Шах Махмуд, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская.</i>	56

МИКРОФЛОРА ПОЛОСТИ РТА <i>Р.М. Суфиярова</i>	58
ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУВ-ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В <i>В.Б. Сбойчаков, С.В. Борисенко, А.М. Сокурова</i>	62
ОТБОР ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ <i>Н.Л. Бруслик, Д.Р. Яруллина, С.А. Коннова, О.Н. Ильинская</i>	66
ОЦЕНКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>AUREUS</i> , КОЛОНИЗИРУЮЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ БИОТОПЫ ЧЕЛОВЕКА. <i>Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, А.А. Шарифуллина, Р.С. Фассахов</i>	68
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ СЕРОЗНЫМ МЕНИНГИТОМ <i>А.В. Устюжанин, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, И.К. Бессергенева, В.К.</i> <i>Слободенюк, А.В. Слободенюк, Т.Э. Снитковская</i>	70
РАЗРАБОТКА ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС– ДИАГНОСТИКИ И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОТУЛИЗМА МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ <i>Т.Р. Мустафин, А.В. Иванов, Н.С. Садыков, Э.Н. Мустафина, Р.Х. Юсупов</i> ...	74
РИБОНУКЛЕЗАНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ И НЕМАГНИТИЗИРОВАННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРЯМОЙ КИШКИ. <i>А.М. Валеева, Пхуен Нга, А.В. Макеева, П.В. Зеленихин</i>	78
СОЗДАНИЕ НОВОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ СИНТЕЗА НОВОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ <i>BACILLUS ALTIUTUDINIS</i> <i>Е.В. Дудкина, А.К. Гальцова, В.В. Ульянова, Р. Шах Махмуд, В.И. Вершинина,</i> <i>О.Н. Ильинская</i>	80
ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ <i>CANDIDA ALBICANS</i> В МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЯХ С МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ <i>С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.В.Халдеева</i>	84

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ АДГЕЗИИ И АНТАГОНИЗМА БИФИДОФЛОРЫ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ <i>Ю.В. Захарова, Л.А. Леванова, А.А. Марковская.</i>	<i>86</i>
ИЗУЧЕНИЕ ХОЛЕРОПОДОБНЫХ ВИБРИОНОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ г. КАЗАНИ 2004-2012г.г. <i>Л.А. Бакирова, А.Е. Ерастова, И.А. Григорьева, Р.Г. Валлиулина, Г.А. Неткач, И.Н. Иволга, О.А. Толстова.</i>	<i>91</i>
АНАЛИЗ РЕГИОНА IS6110 ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ. <i>Н.И. Хаммадов, Т.Х. Фаизов, Н.М. Алексадрова.</i>	<i>94</i>
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ–ИНФЕКЦИИ В г. КАЗАНИ <i>Н.И. Галиуллин, Ф.И. Нагимова, Л.В. Ставропольская, Р.Х. Зайнуллина.</i>	<i>96</i>
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БЕШЕНСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН <i>А.Н. Чернов.</i>	<i>97</i>
ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОКОКЛЮШНЫХ АНТИТЕЛ В СЛЮНЕ ДЕТЕЙ, КОНТАКТИРОВАВШИХ С БОЛЬНЫМИ КОКЛЮШЕМ <i>А.Н. Савинова, Е.Р. Федорова.</i>	<i>100</i>
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ ГНОЙНЫХ РАН <i>Г.Г. Ахметханова, М.П. Шулаева.</i>	<i>102</i>
ДИНАМИКА МИКРОФЛОРЫ МОЧИ БОЛЬНЫХ УРОЛОГИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ <i>Э.М. Акимбекова, Г.М. Сейтгалиев, М.У. Дусмагамбетов, А.М. Дусмагамбетова, М.Б. Каримова.</i>	<i>105</i>
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ <i>М.У. Дусмагамбетов, А.М. Дусмагамбетова, О.С Бутримова, М.Т. Бердюгин, М.П. Гаврилов, О.В. Гаврилова, Т.А. Дружинина.</i>	<i>108</i>

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ НА МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН С ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ <i>М.А. Зотова, О.С. Абрамовских, Л.Ф. Телешева, И.Ю. Орнер, И.Л. Батурина, К.В. Никушкина, О.И. Летяева.</i>	111
МНОЖЕСТВЕННАЯ И ОБШИРНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ <i>Н.М. Корецкая, Н.В. Пыринова.</i>	113
КОЛИЧЕСТВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ОБРАЗОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СЕКРЕТА В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ <i>Ю.С. Шишкова, В.А. Маркова, А.Ю. Савочкина, Т.Г. Смирнова, К.Е. Пряхина</i>	116
МИКРОБНАЯ ТРАНСЛОКАЦИЯ И АКТИВАЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ВИЧ–ИНФЕКЦИЕЙ <i>Г.Р. Хасанова, О.И. Биккинина.</i>	120
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ <i>N.</i> <i>GONORRHOЕAE</i> В РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН (2010-2011 гг.) <i>А.Р. Фахуртдинова.</i>	122
ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ: ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ВЛИЯНИЕ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ <i>Н.М. Корецкая, А.А. Наркевич.</i>	124
СПЕЦИФИКА ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ЖИВОТНЫХ В СМЕШАННОВИДОВЫХ ЭКСПОЗИЦИЯХ ЗООПАРКОВ <i>Р.Я. Гильмутдинов.</i>	129
ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ И УРЕАПЛАЗМ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ <i>Л.А. Крафт, Н.В. Куклина, Е.Б. Карабасова, А.А. Сазанская, В.А. Юрова . . .</i>	134
ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГРИБОВ РОДА <i>CANDIDA</i> ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ ПОЛОСТИ РТА <i>В.А. Юрова, Н.В. Куклина, Е.Б. Карабасова, Л.А. Крафт.</i>	135

РОЛЬ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НАСЕЛЕНИЯ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ <i>Д.В. Сбойчаков.</i>	137
САНИТАРНО–ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ БЛАГОПОЛУЧИЕ НА ОБЪЕКТАХ ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНОГО ТРАНСПОРТА РОССИИ <i>Н.Ю.Матюхина, Л.М.Смирнова, М.П.Шулаева.</i>	140
СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЁННОГО КИШЕЧНИКА <i>Е.О.Меренцова, Е.П.Корнейчук.</i>	142
МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЁТА ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ <i>Н.И. Смоляр, С.Е. Лещук, М.А.Панас.</i>	144
АНАЛИЗ ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВЫЗЫВАЮЩИХ РЕАКТИВНЫЕ АРТРИТЫ И ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ <i>Е.П. Корнийчук, О.В. Мельник, З.Д. Воробец</i>	146
ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО И ОЦЕНКА ЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ <i>Л.Т. Мусина, Р.Ш. Хазиев, А.С. Макарова.</i>	149
ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ГИПЕРФОРИНА В ИЗВЛЕЧЕНИЯХ ИЗ ТРАВЫ <i>H. PERFORATUM</i> И <i>H. MACULATUM</i> И ПРОЯВЛЯЕМОЙ ИМИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ <i>Л.Т. Мусина, Р.Ш. Хазиев, А.С.Макарова, Л.И. Насыбуллина.</i>	150
КИШЕЧНАЯ МИКРОБИОТА: ЕЕ СОСТОЯНИЕ У ДЕТЕЙ С ГАСТРОДУОДЕНИТАМИ <i>С.В. Соковнина, М.В. Кузьев, Е.Г. Вихарева.</i>	152
ГРИБЫ РОДА КАНДИДА ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА И ГЛОТКИ <i>А.А. Сазанская, В.А. Юрова.</i>	154
ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ПОРАЖЕНИЯ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ <i>М.А. Кучумова, Р.А. Файзуллина.</i>	156

ОПТИМИЗАЦИЯ СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НА ДО- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЭТАПАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЁГКОГО В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ С ЦЕЛЬЮ ПРОФИЛАКТИКИ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ.	
<i>В.В. Шевцов, С.Д. Митрохин, А.Ю. Миронов, А.Н. Жакот, А.А. Соколов</i>	158
СОСТОЯНИЕ ГИГИЕНЫ ПОЛОСТИ РТА И УРОВЕНЬ САНИТАРНОГО ОБРАЗОВАНИЯ У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА	
<i>О.В.Езерская, У.О.Стадник.</i>	162
СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗДОРОВЬЕ И УРОВЕНЬ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НАВЫКОВ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ПРИКАРПАТСКОМ ЭНДЕМИЧЕСКОМ ОЧАГЕ ЗОБА	
<i>О.В. Езерская, О.В. Гоняк.</i>	164
МИКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ НА ФОНЕ ЕЕ КОРРЕКЦИИ	
<i>М.Б. Каримова, А.М. Дусмагамбетова, М.У. Дусмагамбетов, Г.М. Сейтгалиев, Э.М. Акимбекова.</i>	166
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУРАНОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ	
<i>В.Е. Митько, А.Б.Маргулис.</i>	169
НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИМЕДИЦИНСКИХ СВОЙСТВАХ ПРОБИОТИКОВ	
<i>В. А. Емельяненко.</i>	171
МИКРОФЛОРА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ	
<i>Р.Я. Гильмутдинов, Е.С.Покровская, Н.Н.Хуснутдинов.</i>	177
МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЁТА У ДЕТЕЙ ДЕТСКИХ ДОМОВ И ШКОЛ-ИНТЕРНАТОВ	
<i>Н.И. Смоляр, О.Т. Нарепеха, Г.А. Лаврик.</i>	179
МОРФО – ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ НА ФОНЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .	
<i>Ю.В.Валеева, А.М. Хромова, А.О. Поздеева.</i>	181

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К β -ЛАКТАМНЫМ АНТИБИОТИКАМ

О.К. Поздеев

ГБОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Хрестоматийной истиной является тот факт, что проведение рациональной антибактериальной терапии невозможно без современных знаний о чувствительности их возбудителей к антимикробным препаратам. На практике это означает необходимость индикации и идентификации этиологического агента и оценки его антибиотикорезистентности. Только после этого можно обсуждать выбор оптимального антибактериального препарата.

Однако в практической медицине ситуация не так проста, и даже самые современные микробиологические методы зачастую не в состоянии дать клиницисту быстрый ответ или даже вообще уточнить возбудителя заболевания. В этом случае на помощь приходят знания о наиболее вероятных возбудителях конкретных инфекционных заболеваний, спектре природной активности антибиотиков и уровне приобретенной резистентности к ним в данном регионе и конкретном стационаре. Последнее представляется наиболее важным при планировании антибактериальной терапии инфекций в стационаре, где имеет место высокий уровень приобретенной резистентности, а недостаточная оснащенность микробиологических лабораторий и низкий уровень стандартизации исследований по оценке антибиотикочувствительности не позволяют сформировать реальное представление об эпидемиологической ситуации в медицинском учреждении и разработать взвешенные рекомендации по лечению.

При этом возросший уровень резистентности госпитальных возбудителей инфекций следует учитывать при планировании антибиотикотерапии. Знание основных тенденций резистентности наиболее важных возбудителей госпитальных инфекций необходимо при выборе антибиотика для конкретного больного, а также при разработке программ эмпирической антибактериальной терапии в стационаре.

Как известно, устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам может быть природной или приобретённой. Наиболее часто первая является видовым либо родовым признаком, ограничивающим спектр чувствительности к антибактериальным препаратам. Приобретенную резистентность можно наблюдать не только среди

отдельных видов различных родов, но и у отдельных штаммов одного вида, на основании чего выделяют резистенсвары. Как правило, бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам в результате генных мутаций в хромосомах или плазидах или после ассимиляции новой генетической информации, аналогичной приобретению «островов патогенности». Устойчивость бактерий к лекарственным средствам определяют четыре основных механизма: маскировка или изменение структуры мишени для действия антибактериального препарата; ферментативное расщепление его молекулы; нарушение или ингибирование проникновения препарата в бактериальную клетку; изменение или выключение метаболических путей, на которые может воздействовать лекарственное средство.

К концу XX века сложилась поистине драматическая ситуация, когда в десятку основных возбудителей нозокомиальных инфекций вошли четыре представителя семейства *Enterobacteriaceae* — *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, виды *Proteus* и *Citrobacter*. Среди них безусловным лидером является кишечная палочка. *E. coli*, *S. marcescens*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, виды *Citrobacter* и *Enterobacter* вызывают до 50% поражений мочевыводящих путей, до 35% госпитальных пневмоний и до 30% раневых. Существенно возросла частота выделения энтеробактерий при клинически выраженных бактериемиях с 34% (1975-1977 гг.) до 57% (в 1995-1997 гг.). Наиболее распространенные возбудители — *E. coli* (около 35% всех случаев), виды *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (около 27%) и *Proteus* (11%). Другие энтеробактерии выделяют несколько реже, но это не снижает их медицинской значимости.

У представителей семейства *Enterobacteriaceae* механизмы устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам принципиально не отличаются от таковых у других бактерий.

Основными факторами, определяющими устойчивость грамотрицательных бактерий к б-лактамным антибиотикам, является синтез б-лактамаз, разрушающих их структуру; снижение проникновения препаратов через поверхностную мембрану и активное выведение антибиотиков из бактериальной клетки. Меньшее значение имеют повышение активности пенициллин-связывающих белков (ПСБ) и изменение структуры мишеней для б-лактамных антибиотиков на клеточной стенке. Пенициллин-связывающие белки представлены транс- и карбоксипептидазами, участвующими в синтезе основного компонента клеточной стенки бактерий — пептидогликана. В отличие от грамположительных бактерий, протективные свойства ПСБ у грамотрицательных бактерий выражены слабо (у энтеробактерий они

полностью отсутствуют). Тем не менее, активность ПСБ может быть высокой у *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenza*, *Acinetobacter calcoaceticus* и некоторых других микроорганизмов. В большинстве случаев уменьшение числа мишеней для действия антибактериальных препаратов или ингибирование их проникновения внутрь клеток не обеспечивают выживание бактерий. Во многом это связано с тем, что реализация указанных процессов неизбежно переведёт бактериальную клетку в состояние покоя с последующим резким снижением интенсивности инфекционного процесса и повышением чувствительности к действию факторов иммунобиологической защиты организма. Поэтому более перспективным представляется переход от «пассивной обороны» к ферментативному разрушению молекул различных веществ с антибактериальной активностью (в данном случае — β -лактамных антибиотиков). Примечателен тот факт, что способность к образованию β -лактамаз у *E. coli* была отмечена ещё до начала эры антибиотикотерапии.

По механизму своего действия большинство β -лактамаз является гидролазами. У энтеробактерий они представлены индуцибельными ферментами, и их синтез (в отсутствие антибиотика) не является жизненно необходимым для бактериальной клетки. Пути выделения молекул β -лактамаз могут быть различными. Грамположительные бактерии выделяют их непосредственно в окружающую среду, а грамотрицательные — секретируют в периплазматическую полость.

В последние десятилетия между бактериями и фармакологами развернулась настоящая «гонка вооружений» — на каждое появление нового антибиотика, устойчивого в действие известных ферментов, возникали всё новые и новые β -лактамазы. В частности, интенсивное применение в 80-х годах XX века оксиминоцефалоспоринов, подавляющих жизнедеятельность многих грамотрицательных бактерий, привело к появлению соответствующих β -лактамаз. Первый фермент, получивший название SHV-2, был обнаружен в Германии уже в 1985 году у одного изолята *Klebsiella ozaenae*. Поскольку подобные ферменты проявляли широкий спектр активности в отношении имеющихся β -лактамных антибиотиков, они получили название β -лактамаз расширенного спектра. В настоящее время известно более 150 подобных ферментов, обнаруживаемых повсеместно у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В зависимости от региона частота их обнаружения может варьировать от 0 до 25% и выше.

Рост устойчивости к пенициллинам послужил причиной появления химически модифицированных β -лактамов — цефалоспоринов и монобактамов. Ответом на их широкое применение явилось появление β -лактамаз расширенного спектра, являющихся производными ферментов TEM-1 и SHV-1.

В настоящее время известно более 90 типов TEM. Впервые ферменты TEM были обнаружены у *E. coli*, выделенной в Греции из крови больного по фамилии Temoniera, послужившей для обозначения этой группы. Помимо *E. coli* β -лактамазы типа TEM наиболее часто выявляют у *K. pneumoniae*. Способность к их синтезу также отмечена и у других энтеробактерий, например, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, многих сальмонелл и др. Типичные TEM действуют на пенициллины и цефалоспорины узкого спектра действия, однако, некоторые из них могут более или менее эффективно гидролизовать цефалоспорины широкого спектра (например, цефотаксим), а также азтреонам и имипенем (слабо). В целом, их чрезмерное образование незначительно влияет на расширение спектра их действия. Однако существует вероятность появления способности разлагать молекулы новых цефалоспоринов и монобактамов за счет мутаций генов, кодирующих синтез этих β -лактамаз.

Действительно, молекулы многих цефалоспоринов широкого спектра способны гидролизовать и другие ферменты групп TEM и SHV, различающиеся между собой буквально замещением одной аминокислотной последовательности. Например, молекулы ферментов β -лактамаз TEM-1 и TEM-2 отличаются лишь по одной аминокислоте в положении 37. В противоположность этому, в структуре TEM-7 и SHV-2 аргинин в положении 162 и глицин в положении 236, присутствующие в молекулах ферментов TEM-1 и SHV-1, заменены на серин, что приводит к резкому увеличению спектра активности в отношении цефалоспоринов широкого спектра (включая цефтазидим и цефотаксим). Аналогичные замещения глутамин в положении 102 (TEM-2) на лизин (TEM-9) или глутамин в положении 237 (SHV-2) на лизин (SHV-4 и SHV-5) существенно повышают гидролитическую активность ферментов в отношении цефтазидима. Также фермент OXA-11 проявляет расширенный спектр активности, хотя является производным β -лактамазы OXA-10 (оксациллиназы класса D), отличающимся замещением лишь двух аминокислот. Однако, далеко не всегда изменение аминокислотных последовательностей обязательно необходимо для повышения ферментативной активности. Например,

TEM-7 разлагает цефтазидим и цефотаксим приблизительно с одинаковой скоростью, тогда как β -лактамазы SHV-2 гидролизуют цефотаксим почти в 10 раз быстрее, чем цефтазидим.

В начале 90-х годов среди была обнаружена группа ферментов, производных TEM, не являющихся истинными β -лактамазами расширенного спектра. Их основной особенностью явилась устойчивость к ингибиторам β -лактамаз, например, клавулановой кислоте. Эта группа ферментов получила название IRT-лактамаз (*inhibitor-resistant TEM-lactamase*, ингибитор-резистентные TEM-лактамазы). Позднее подобные ферменты были обнаружены и среди β -лактамаз расширенного спектра действия типов SHV и OXA. Ингибитор-резистентные TEM-лактамазы были выделены у большого числа клинических изолятов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* и *Citrobacter freundii*. IRT-лактамазы не только проявляют устойчивость к действию производных клавулановой кислоты, а также обеспечивают умеренную устойчивость бактерий к цефалоспорином широкого спектра действия. Таким образом, можно наблюдать формирование новой группы β -лактамаз с комплексным фенотипом, сочетающим свойства β -лактамаз расширенного спектра и IRT-лактамаз.

Практически одновременно с лактамазами TEM были обнаружены β -лактамазы группы SHV (*for sulphydryl variable*, вариабельные по SH-группам), которые отличаются значительно меньшим количеством типов ферментов и тем, что гены, кодирующие их синтез, располагаются в хромосомах. Большинство лактамаз SHV являются классическими β -лактамазами расширенного спектра действия, и на сегодняшний день лишь SHV-10 проявляет свойства IRT-лактамаз. Основные типы β -лактамаз SHV были обнаружены у штаммов *K. pneumoniae*; также их могут синтезировать некоторые изоляты *Citrobacter diversus* и *E. coli*. Ферменты группы TEM и SHV, активные против различных антибиотиков широкого спектра действия (исключая карбапенемы), появляются с интервалом 2-3 года. С приблизительно сходной скоростью появляются ферменты групп TEM (реже SHV), разлагающие ингибиторы β -лактамаз.

В 90-х годах было выявлено новое семейство плазмидных β -лактамаз расширенного спектра действия, получившее название CTX-M из-за своей способности гидролизовать цефотаксим (*cefotaxime-modifying*, модифицирующие цефотаксим). В настоящее время оно включает ферменты CTX-M-1 (ранее известный как MEN-1), CTX-M-2 - CTX-M-10. Наибольшее число продуцентов β -лактамаз CTX-M обнаружено среди штаммов *Salmonella typhimurium* и *E. coli*, но их также

могут синтезировать и другие энтеробактерии. Лактамазы СТХ-М не являются близко родственными ТЕМ и SHV (около 40% гомологии). Гораздо большее структурное сходство (73-77% гомологии) они проявляют с хромосомными цефалоспорииназами, продуцируемыми *K. oxytoca*, *C. diversus*, *Proteus vulgaris* и *Serratia fonticola*. Позднее также была установлена их высокая гомология с хромосомными лактамазами (цефалоспорииназами) AmpC *Kluyvera ascorbata*, *K. cryocrescens* и *K. georgiana* (обозначенными как Klu-1 и Klu-2). Это позволило предположить, что именно от хромосомных генов произошли плазмидные гены, кодирующие синтез лактамаз СТХ-М. Исследования последних лет показали, что среди госпитальных изолятов *E. coli* ферменты СТХ-М являются наиболее часто обнаруживаемой группой β -лактамаз расширенного спектра действия.

Как было указано выше, у многих энтеробактерий, имеющих медицинское значение, обнаружены индуцибельные цефалоспорииназы AmpC, кодируемые хромосомными генами. По химической структуре они также мало отличаются друг от друга и в естественных условиях образуются в незначительных количествах. Однако, в присутствии β -лактамов их синтез может увеличиваться в сотни раз. При этом, в генах, кодирующих их синтез, мутации могут происходить с повышенной частотой, что приводит к появлению высокорезистентных штаммов микроорганизмов. Энтеробактерии, не синтезирующие ферментов этого типа, обычно мало устойчивы к β -лактамам антибиотикам.

Регуляция образования цефалоспорииназ класса C остается до конца неизученной. Сам синтез кодирует ген *ampC*, его активность регулируют гены *ampR*, *ampG*, *ampD* и *ampE*. Продукт гена *ampR* и, возможно, *ampE* выполняет роль активатора транскрипции *ampC* в присутствии β -лактамов и репрессора при их отсутствии. Продукты *ampG* вовлечены в сигнальную трансмиссию (возможно в транспорт активированных лигандов). Белки, кодируемые *ampD*, ингибируют активность *ampC* при его гиперактивации.

Другой, перманентно увеличивающейся группой β -лактамаз расширенного спектра являются ферменты семейства ОХА, относящиеся к классу А (по классификации Р. Эмлера) и функциональной группе 2d (по классификации К. Буша). Ферменты обуславливают устойчивость ко многим цефалоспориинам II-IV поколений, но их главным отличием является высокая гидролитическая активность в отношении ампициллина, клоксациллина и оксациллина (oxacillin), а также выраженная устойчивость к ингибиторам β -лактамаз. Следует отметить, что семейство ОХА образовано скорее по фенотипическим признакам,

т.к. гомология его членов порой не превышает 20%, поэтому, возможно, в ближайшие годы его ожидает систематическая переработка. Среди энтеробактерий продуцентов лактамаз ОХА относительно немного. Значительно чаще способность к их синтезу отмечают у изолятов *Pseudomonas aeruginosa*. В семействе ОХА также выявлены ферменты, не являющиеся классическими β -лактамазами расширенного спектра: ОХА-20, ОХА-22, ОХА-24, ОХА-25, ОХА -26, ОХА -27 и ОХА-30.

У энтеробактерий также выявлены новые, пока не четко классифицированные β -лактамазы расширенного спектра, отличные от представителей семейств TEM и SHV. В частности, в Турции у госпитальных изолятов *P. aeruginosa* была выделена лактамаза PER-1, позднее также обнаруженная и у изолятов *S. typhimurium*. Сходный фермент PER-2 (86% гомологии аминокислот) был обнаружен у госпитальных изолятов *S. typhimurium* в Аргентине. Интересно, что до настоящего времени продуцентов PER-1 выявляют только в Старом Свете, а PER-2 — только в Южной Америке. Другой лактамазой, близкой к PER-1, является VEB-1, которую продуцировал изолят *E. coli*, выделенный от больного во Вьетнаме. Необычные свойства проявляет SFO-1 — лактамаза расширенного спектра класса А, впервые обнаруженная у штамма *Enterobacter cloacae*. Её синтез кодируют плазмидные гены, легко переносимые в популяции и обуславливающие высокую устойчивость к имипенему. Кроме того, плазмиды, кодирующие синтез SFO-1, несут регуляторный ген *ampR*, также необходимый для индукции синтеза β -лактамаз класса С. В отличие от последних, SFO-1 не гидролизует цефамицины и легко подавляется клавуланатами. Другой, пока редко встречающейся β -лактамазой расширенного спектра, является плазмидная GES-1, выявленная у *K. pneumoniae*, отличающаяся от прочих плазмидных лактамаз, но проявляющая 36% гомологии с карбенициллиназой *Proteus mirabilis*.

Как было указано выше, другим важным фактором устойчивости энтеробактерий к β -лактамам является торможение проникновения и ускорения их выведения из бактериальной клетки. С одной стороны, прежде чем преодолеть цитоплазматическую мембрану β -лактамы попадают в периплазматическую щель, куда секретируются β -лактамазы и где они аккумулируются в высоких концентрациях. С другой — β -лактамы проникают через внешнюю мембрану энтеробактерий по каналам, образованным особыми белками-поринами. Например, у *E. coli* выделено два таких белка, обозначенных как OmpF и OmpC. Мутации в генах кодирующих их синтез может приводить к снижению или нарушению транспорта

антибиотиков. Разумеется, эти механизмы играют второстепенную роль и при отсутствии способности к синтезу β -лактамаз не в состоянии обеспечить достаточной уровень устойчивости бактерий.

ВЛИЯНИЕ ГАЛОГЕН-ПРОИЗВОДНЫХ ФУРАНОНОВ НА АЗОТНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ БАЦИЛЛ

Э.Н. Хакимуллина, Е.Ю. Тризна, А.Р. Курбангалиева, А.Р. Каюмов

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Грамположительные бактерии являются причиной многих инфекционных заболеваний, кроме этого, они гораздо быстрее вырабатывают устойчивость к антибиотикам, а также образуют биопленки. Биопленки представляют собой очень тесно приросшее к субстрату сообщество дифференцированных микробных клеток, заключенных в полисахаридный матрикс. В таком состоянии бактерии становятся чрезвычайно устойчивыми к внешним воздействиям и представляют большую опасность с эпидемической точки зрения. Поэтому, актуальной проблемой является поиск новых препаратов, как подавляющих рост грамположительных бактерий, так и угнетающих горизонтальный перенос генов и образование биопленок.

Одними из перспективных соединений являются фураноны. Так, австралийская красная водоросль *Delisea pulchra* синтезирует галогенизированные фураноны, обладающие антибактериальными свойствами и препятствующие колонизации этой водоросли морскими бактериями. Ранее было известно, что галоген-производные фуранонов подавляют чувство кворума у грамотрицательных бактерий, вследствие чего подавляется и образование биопленок. Интересно, что эти же фураноны подавляют рост и грамположительных бактерий в концентрациях, не токсичных для эукариот.

Целью работы явилось установить влияние галоген-производных фуранонов (5-гидрокси-4[(4-Метилфенил)тио]-3-хлор-2(5Н)-фуранона (Ф1) и 3,4-дихлор-5-(4-метилфенилсульфонил)-2(5Н)-фуранона) (Ф2) на азотный метаболизм клеток *B. subtilis*.

В прежних работах было показано, что концентрация фуранонов 5 мкг/мл подавляет рост бактерий в 2 раза. Мы исследовали влияние фуранонов Ф1 и Ф2 на рост клеток *B. subtilis* на минимальной синтетической среде SMM. Для этого клетками *B. subtilis* GP250 засеивали среду SMM с концентрациями исследуемого фуранона 1, 2,5, 5 мкг/мл. Клетки культивировали 6 часов до достижения контрольной

культурой (выращенной на среде без содержания фуранона) поздней стационарной фазы роста ($ОП_{590}=0.8$). Затем инкубирование прекращали и измеряли оптическую плотность культуры при $ОП_{590}$ в кювете с длиной оптического пути 1 см. При концентрации фуранона Ф1 1 мкг/мл уже наблюдалось подавление роста бактерий в 2 раза по сравнению с контролем. Фуранон Ф2 в исследованных концентрациях рост клеток не подавлял. Таким образом, фуранон Ф1 может представлять интерес в качестве бактериостатического средства.

Представляло интерес выяснить механизм его воздействия. Мы предположили, что он должен оказывать влияние на обмен веществ бактерий. Фактор транскрипции TngA является одним из ключевых белков-регуляторов азотного метаболизма в клетках бацилл и активен в условиях азотного голодания. Для установления влияния фуранонов на активность фактора TngA, исследовали активность β -галактозидазы в рекомбинантном штамме *B. subtilis* GP250. В этом штамме ген β -галактозидазы находится под контролем промотора *prg*, который позитивно регулируется белком TngA. Это позволяет судить об активности фактора транскрипции по величине галактозидазной активности в клетках. Наши данные показали, что фуранон Ф1 значительно подавляет активность β -галактозидазы в клетках. Механизм подавления ферментативной активности в клеточном экстракте может быть обусловлен как снижением активности фактора транскрипции TngA и, следовательно, низким уровнем транскрипции с промотора *prg*, так и прямым действием фуранона на молекулы β -галактозидазы. Чтобы выяснить механизм воздействия, в экстракт, полученный из контрольных клеток, вносили фуранон до конечных концентраций 1, 2.5, 5 мкг/мл и измеряли уровень активности β -галактозидазы. Наши данные показали, что внесение этого соединения также вызывало снижение активности фермента. Однако, если в условиях *in vivo* активность фермента снижалась до 6% и 5% от контроля при концентрациях фуранона 1 и 2.5 мкг/мл соответственно, то в условиях *in vitro* фермент подавлялся лишь на 40% и 20%. Это свидетельствует о том, что снижение β -галактозидазной активности в клетках бацилл в присутствии фуранона Ф2 вызвана в большей степени снижением активности фактора транскрипции TngA. В отличие от фуранона Ф1, фуранон Ф2 не вызывал подавления активности β -галактозидазы ни в клетках бацилл, ни ингибировал фермент в условиях *in vitro*. Этот факт хорошо согласуется с отсутствием подавления роста бактерий этим фураноном в исследованных концентрациях.

Глутаминсинтетаза в клетках бактерий осуществляет АТР-зависимый синтез глутамина из глутамата и аммония. Поскольку

глутамин является основным компонентом азотного метаболизма микробной клетки, регуляция активности и синтез ГС в клетке подвержена строгому контролю, который позволяет сохранить количество фермента на необходимом уровне при разных условиях роста. Чтобы охарактеризовать воздействие фуранонов на азотный метаболизм бацилл, мы исследовали активность глутаминсинтетазы в экстракте клеток, выращенных в присутствии фуранонов. Исследования показали, что фуранон Ф1 подавляет глутаминсинтетазу в клетках бацилл. Фуранон Ф2 не вызывал подавления активности глутаминсинтетазы ни в клетках, ни в условиях *in vitro*.

Ранее было показано, что фактор транскрипции TnrA в клетках бацилл связан с мембраносвязанным комплексом белков AmtB-GlnK. В условиях избытка азота ГС ингибируется по типу обратной связи избытком глутамина и АМФ, и в этой форме связывает TnrA. В случае если фактор транскрипции TnrA не связан с ГС или белком GlnK, он подвергается протеолитическому расщеплению. Мы решили проверить, оказывают ли влияние исследованные фураноны на процесс взаимодействия фактора TnrA с ГС. Мы инкубировали очищенные рекомбинантные белки TnrA и ГС в присутствии фуранона Ф1 в концентрациях 1, 2.5, 5 и 10 мкг/мл. Эффективность взаимодействия белков исследовали методом PullDown анализа на Strep-tactinсефарозе. Смесь белков (250 мкл с концентрацией каждого белка 6.5 мкг/мл), инкубированную 20 минут при температуре 20°C с разными концентрациями фуранона Ф1 наносили на колонку со Strep-tactinсефарозой объемом 0.1 мл и элюировали буфером, содержащим дестиобиотин. Элюат собирали фракциями объемом по 0.4 мл и анализировали с помощью методов DotBlot и WesternBlot анализа с использованием антител против TnrA и ГС. Результаты показали, что присутствие фуранона Ф1 в буфере приводило к полному подавлению взаимодействия глутаминсинтетазы с фактором транскрипции TnrA. Этот факт позволяет предположить, что данное соединение будет оказывать высокое бактерицидное действие на клетки, поскольку, по-видимому, оказывает сильное воздействие на белки – регуляторы азотного метаболизма в клетках бацилл. Фуранон Ф2 не оказывал влияния на взаимодействие белков *in vitro*.

Таким образом, наши эксперименты позволили установить, что фуранон Ф1 оказывает негативный эффект на связывание фактора транскрипции TnrA с глутаминсинтетазой. Это позволяет предположить высокий бактериостатический эффект данного соединения на клетки бацилл за счет нарушения регуляции азотного обмена. Молекулярные же

механизмы влияния этого фуранона на процесс взаимодействия белков пока остаются неизвестным и требуют дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» и гранта РФФИ 12-04-31472 мол_а.

РОЛЬ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ЭТИОЛОГИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Т.И. Бурганова, И.Р. Валиуллина, З.З. Насыбуллова, М.П. Шулаева

ГАУЗ Республиканская клиническая
больница, г. Казань
ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»

Бактериальные инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) являются одними из наиболее распространённых инфекционных заболеваний. Так, в США ИМВП становятся причиной обращения к врачу 7 миллионов пациентов в год, а для миллиона пациентов являются причиной госпитализации. Мочевые инфекции представляют собой серьезную проблему здоровья, частично из-за своей распространенности. Клинические и экспериментальные данные подтверждают то, что продвижение микроорганизмов по уретре является самым частым способом инфицирования мочевых путей, особенно для микроорганизмов, происходящих из кишечника, т. е. *Escherichia coli* и другие *Enterobacteriaceae*. Клебсиеллы вызывают широкий спектр поражений у человека. Если ранее бактерии рассматривали только как возбудителей инфекций респираторного тракта, то к концу XX века была доказана способность клебсиелл вызывать самые разнообразные заболевания, включая поражения мочевыводящих путей, бактериемии, септикопиемии, поражения мозговых оболочек, суставов и позвоночника, глаза и др. *K. pneumoniae* относится к основным возбудителям поражений мочевой системы. Основной предрасполагающий фактор – катетеризация мочевыводящих путей. Заболевания чаще развиваются как госпитальные инфекции, и их клиника варьирует от бессимптомной бактериурии до циститов, пиелонефритов и абсцессов почек. В условиях стационара возбудители урологических инфекций подвергаются селективному «давлению» антибиотиков и антисептиков и представляют собой весьма

значительный резервуар антибиотикорезистентных штаммов. Широкое распространение приобретенной резистентности вызывает необходимость привлечь повышенное внимание практических врачей, к этому вопросу учитывая, что рациональность антибиотикотерапии и адекватность лечения напрямую зависят от точности микробиологического анализа. В этой связи решающее значение имеет выявление всех видов этиологически значимых микроорганизмов – возбудителей ИМВП и определение их антибиотикорезистентности.

Цель исследования: установление видового состава выделенных возбудителей ИМВП и изучение их резистентности к антибиотикам.

Материалы и методы: проведен бактериологический анализ 1532 образцов мочи как с неосложненными, так и с осложненными вариантами, за 1 полугодие 2012 года из различных отделений стационара РКБ.

Материалом для микробиологических исследований служила моча. Для оценки степени бактериурии использовался метод секторных посевов по Голду. Все культуры были изолированы с кровяного агара. Концентрация клинических изолятов, взятых в работу, превышала диагностический титр 10^5 КОЕ/мл. Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью масс-спектрометра MALDI – Biotyper. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводилось диско-диффузионным методом с использованием дисков фирмы Bio-Rad (Франция) на агаре Мюллер - Хинтона. Результаты интерпретировали при помощи экспертной системы CLSI- «ADAGIO» фирмы Bio-Merieux, которая устанавливает наличие любых устойчивых фенотипов, по введенной идентификации микроорганизма. Продукцию бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) подтверждали методом двойных дисков.

Результаты. Сравнительный анализ результатов идентификации выделенных микроорганизмов выявил, что в подавляющем большинстве случаев из мочи пациентов выделялись представители семейства *Enterobacteriaceae*. Они выделялись в 34% случаев (332 штамма) из всех выделенных микроорганизмов. Из них *E. coli* составляла 44,5% (148 штаммов), а *Klebsiella pneumoniae* – 37% (124 штамма). 117 изолятов *Klebsiella pneumoniae* (94%) были выделены в монокультуре со значимой степенью бактериурии (10^5 - 10^6 КОЕ/мл). Для оценки чувствительности к антибактериальным препаратам данного возбудителя инфекции мочевыводящих путей, сформирован отдельный набор, с учетом возможной продукции БЛРС.

В набор были включены: ингибиторзащищенный аминопенициллин; амоксициллин/клавуланат; цефтриаксон;

цефтазидим; цефепим; цефтазидим/клавуланат;
цефоперазон/сульбактам; гентамицин; амикацин; ципрофлоксацин;
карбапенемы (имипенем).

По результатам чувствительности к антибиотикам, выделенных изолятов *Klebsiella pneumoniae* in vitro, к амоксициллину/клавуланату, всем цефалоспорином, устойчивы (100%) штаммов. Цефтазидим/клавуланату - умеренно устойчивых 15 (12%), устойчивых - 8 (6%) Устойчивы к аминогликозидам: гентамицину - 60 штаммов (48%); амикацину- 25 штаммов (20%). Ципрофлоксацину-20 (16%). Но все штаммы обладали высокой, (100%), чувствительностью в отношении карбапенемов (имипенему).

Выводы:

1. За последние два года этиологическая структура возбудителей мочевыводящих путей изменилась. Ведущая роль возбудителей инфекций мочевыводящих путей, кроме *E. coli* стала принадлежать *Klebsiella pneumoniae*.

2. Отмечен высокий уровень резистентности *K. pneumoniae* к ингибиторозащищенным пенициллинам (амоксициллин/клавуланату), цефалоспорином, аминогликозидам 2 и 3 поколения.

3. Резистентность штаммов *K. pneumoniae* к цефалоспорином 3-4 поколения (цефтриаксону, цефепиму) связана с продукцией БЛРС.

4. Все штаммы *K. pneumoniae* in vitro были высокочувствительны (100%) к карбапенемам, (имипенему, меропенему).

ВЛИЯНИЕ МОЧЕВИНЫ НА БИОСИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ *PROTEUS MIRABILIS*

И.Р. Галиева, Н.М. Замалютдинова, А.М. Марданова

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Proteus mirabilis – грамотрицательные, полиморфные, подвижные палочки, не образующие спор и капсул – могут вызывать различные заболевания мочеполовых органов, в частности, острый и хронический простатит, цистит, пиелонефрит, являются частой причиной образования камней в почках и мочевом пузыре у людей с ослабленным иммунитетом. *P. mirabilis* является одним из самых распространенных возбудителей «госпитальных» оппортунистических инфекций с характерным хроническим течением болезни. К основным факторам вирулентности протеев относятся эндотоксин, фимбрии, бактериальные протеазы, уреазы, гемолизины и гемагглютинины. Внеклеточная

протеиназа *P. mirabilis* расщепляет иммуноглобулины разных классов, казеин, желатин и другие субстраты.

Настоящая работа посвящена характеристике продуктивности внеклеточных металлопротеиназ уропатогенных бактерий *P. mirabilis* в присутствии мочевины.

В работе использовали клинический изолят *Proteus sp.*, выделенный из мочи урологического больного. Бактерии были идентифицированы по микробиологическим тестам и гомологии 16S РНК как *P. mirabilis* шт.№17. Бактерии выращивали на следующих средах: искусственная моча (пептон, дрожжевой экстракт, лимонная кислота, мочевины, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , FeSO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NH_4Cl , $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$), объединенная детская моча (возраст детей 1–3 года), среда Лурия–Бертони (LB), среда LB с добавлением мочевины в различных концентрациях (10–90 мМ; 100, 300 и 600 мМ). Культивирование бактерий проводили при соотношении среды к объему колбы 1:4 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин, при температуре 37°C. Протеолитическую активность определяли по расщеплению азоказеина.

Была исследована динамика роста бактерий и накопление протеолитической активности на средах разного состава. Изучение динамики накопления протеолитической активности в среде LB показало, что активность появляется в культуральной среде на 8–10 часы роста и достигает максимума на стационарной фазе роста (24 час) и сохраняется на высоком уровне до 48 часа. На 24 час культивирования максимальный рост бактерий наблюдался на среде LB 2 опт.ед. Рост на натуральной и искусственной моче был значительно ниже и составлял 0,39 и 0,54 опт.ед соответственно. Протеолитическая активность в культуральной жидкости была максимальна на среде LB (0,448 ед/мл). В тоже время протеолитическая активность на натуральной и искусственной моче составляла 0,176 и 0,186 ед/мл соответственно. Продуктивность культуры по биосинтезу внеклеточной протеиназы была наибольшей на натуральной и искусственной моче (0,45 и 0,34). Это в 1,5–2 раза выше, чем на контрольной среде (LB). Для выяснения зависимости биосинтеза фермента в культуральной среде от мочевины исследовали накопление протеиназы в среде в присутствии различных концентраций мочевины: 10–90 мМ; 100, 300 и 600 мМ, что соответствует нормальному содержанию мочевины в моче человека. В присутствии в среде LB мочевины в концентрации от 10 мМ до 50 мМ происходит увеличение продуктивности протеаз. В тоже время, повышение в среде концентрации мочевины до 90 мМ ведет к снижению роста бактерий. При добавлении в среду мочевины в высоких

концентрациях (100, 300 и 600 мМ) происходит значительное снижение протеолитической активности (в 2–5 раз по отношению к контролю). При этом наблюдается резкое подавление роста культуры. Однако продуктивность при этом увеличивается в 3–4 раза к контролю.

Таким образом, можно предположить, что продуктивность внеклеточных металлопротеиназ зависит от концентрации мочевины в среде. Однако большие концентрации мочевины угнетают рост клеток и уменьшают протеолитическую активность. Вероятно, что при попадании *P.mirabilis* в мочеполовой тракт синтез факторов вирулентности может усиливаться.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2012-2013 гг. соглашение №14.А18.21.1516.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «ПИРОГЕНАЛ» НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

И.И. Долгушин, Т.Г. Смирнова, А.Ю. Савочкина, В.А. Маркова, И.В. Самусева.

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

Актуальность. Нейтрофильные гранулоциты являются самыми многочисленными из лейкоцитов. Они играют очень важную роль в антимикробных реакциях врожденного иммунитета и первыми мигрируют в направлении очага воспаления. Хорошо известна их фагоцитарная, бактерицидная и киллинговая активность. В 2004 году были открыты нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) и установлен их антимикробный эффект. Показано, что НВЛ – это внеклеточные структуры, образованные хроматином и белковыми гранулами, которые образуются в ответ на стимуляцию, связывают и уничтожают микроорганизмы.

Пирогенал – иммуноотропный препарат, представляет собой липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi*, оказывающий пирогенное и интерферогенное действие. Мишенями для пирогенала являются система фагоцитарных клеток: моноцитов, макрофагов и нейтрофилов.

Известно, что липополисахариды стимулируют многие защитные реакции организма: увеличивают количество лейкоцитов и их фагоцитарную активность, повышают активность системы комплемента,

резистентность клеточных и субклеточных мембран к действию повреждающих агентов. Под влиянием ЛПС макрофаги, полиморфно-ядерные нейтрофилы и другие клетки продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), простагландины, оксид азота (NO), кислородные радикалы и др.

Считают, что действие ЛПС на организм встречается гораздо чаще, чем мы традиционно привыкли представлять. Толстый кишечник служит естественным резервуаром грамотрицательных бактерий, содержащих эндотоксины. Вследствие нарушения барьерной функции слизистой оболочки кишки при ишемии, воспалительных процессах и в ряде других случаев бактерии могут попасть в портальную и лимфатическую системы.

В связи с вышесказанным целью данной работы явилось изучение влияния пирогенала на фагоцитарную, внутриклеточную кислородзависимую функцию нейтрофилов и на их способность образовывать внеклеточные ловушки в системе *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании использовали чистую фракцию нейтрофилов периферической крови здоровых не беременных женщин в возрасте от 18 до 35 лет в первую фазу менструального цикла. Взвесь нейтрофилов получали из гепаринизированной венозной крови центрифугированием на двойном градиенте плотности фиколл – верографина с плотностью верхнего–1,077г/см³ и нижнего–1,093г/см³. После центрифугирования на границе между градиентами собирали кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, которое дважды отмывали стерильным физиологическим раствором. Концентрацию клеток доводили до $5 \cdot 10^6$ кл/л. Полученные таким образом клетки инкубировали 30 минут при 37⁰С с пирогеналом. Действие пирогенала исследовали в концентрации 0,02 мкг/мл, что соответствует разовой терапевтической дозе. В качестве контроля использовали взвесь нейтрофилов, инкубируемых в тех же условиях, без пирогенала. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов периферической крови проводили с помощью НСТ–теста в модификации Маянского А.Н. и Виксмана М.Е. (1979). Изучение способности нейтрофилов периферической крови к фагоцитозу проводили по методу Фрейдлин И.С. (1986). Для количественной оценки уровня внеклеточных ловушек нами был использован метод индикации НВЛ при окраске акридиновым оранжевым в фиксированных препаратах нейтрофилов [Долгушин И.И., Андреева Ю.С., патент РФ на изобретение № 2384844 «Способ обнаружения НВЛ»]. Учет проводили с помощью люминисцентного микроскопа и определяли процент нейтрофильных внеклеточных ловушек от общего количества нейтрофилов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных компьютерных программ Statisticafor Windows (v. 8.0; StatsoftInc.).

Результаты исследования. Установлено, что пирогенал увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов, выделенных из периферической крови женщин в первую фазу менструального цикла: (44,1% – в контроле и 52,0% – в опыте), фагоцитарную интенсивность (0,91 у.е. в – контроле и 1,18 у.е. – в опыте) и фагоцитарное число (2,03 у.е. – в контроле и 2,29 у.е. – в опыте). Кроме того, пирогенал стимулирует образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (12,5% – в контроле и 22,1% – в опыте), не влияя на активность спонтанного НСТ–теста (13,4% – в контроле и 14,0% – в опыте), индекс спонтанного НСТ–теста (0,170 у.е. – в контроле и 0,169 у.е. – в опыте); активность индуцированного НСТ–теста (10,2% – в контроле и 8,8% – в опыте), индекс индуцированного НСТ–теста (0,130 у.е. - в контроле и 0,109 у.е. – в опыте).

Таким образом, пирогенал в концентрации, соответствующей разовой терапевтической дозе, стимулирует фагоцитарную функцию нейтрофилов и формирование внеклеточных ловушек, что, возможно, связано с общностью рецепторов, определяющих оба типа функциональных ответов полиморфно-ядерных лейкоцитов.

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ИЗ НЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ ГОРОДА АЛЬМЕТЬЕВСКА

К.И. Гарифулина, Р.Шах Махмуд.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Антибиотики, применяемые в лечебной практике, помимо общеизвестных побочных эффектов, влекут за собой возникновение форм бактерий, которые устойчивы к вновь синтезированным препаратам. В сложившейся нелегкой ситуации достойную альтернативу антибиотикам в терапии множества заболеваний бактериального происхождения способны составить бактериофаги – вирусы бактерий, избирательно поражающие виды бактерий. Вышедшие во внешнюю среду в результате лизиса бактериофаги повторно инфицируют и лизируют другие бактериальные клетки, действуя до полного уничтожения патогенных бактерий в очаге воспаления.

Для большей наглядности выделим основной ряд преимуществ бактериофагов перед антибиотиками:

- фаготерапия является этиотропной, специфической, это значит, что бактериофаги высокоспецифичны при лечении инфекций, не подавляют нормальную микрофлору и не нарушают естественный баланс внутренней среды организма;
- кроме этого, бактериофаги не имеют противопоказаний к применению, потому что их можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, даже включая недоношенных;
- бактериофаги могут использоваться не только для лечения, но также и для профилактики бактериальных инфекций;
- что необычайно важно, бактериофаги не вызывают развития резистентности микроорганизмов;
- большим плюсом является то, что бактериофаги не обладают токсическим, аллергическим эффектами;
- помимо всего прочего, бактериофаги эффективны в монотерапии, но также могут применяться в комбинации с другими препаратами, в т.ч. с антибиотиками и пробиотиками.

Целью данной работы было выделение бактериофагов из незагрязненной почвы города Альметьевска. Использовались образцы почвы, которые смешивались с ночной культурой бактерий определенной концентрации и выращивались при определенных условиях. Затем, полученную смесь тщательно очищали от земли и бактерий при помощи центрифугирования, пропускания через фильтр, прогревания при 65°C в течении получаса и обработкой хлороформом. Концентрации почвы и ночной культуры определялись заранее. Полученная суспензия была проверена на наличие бактериофагов путем посева модифицированным методом Грации.

В результате были получены бактериофаги трех видов бактерий: *Salmonella typhimurium* TA 100, *Providencia spp.*, *Bacillus amilozyma* 9a. Полученные бактериофаги могут успешно использоваться в лечебной практике в качестве достойной альтернативы антибиотикам, а порой и замены, поскольку бактериофаги высокоспецифичны и поражают только ту бактерию, к рецепторам которой имеют сродство. Тем самым обеспечивается неприкосновенность полезной микрофлоры и полное уничтожение определенной патогенной. Вполне перспективной является идея о восстановлении масштабного производства бактериофагов, в связи с их необычайной эффективностью и безвредностью.

Выводы: На основании полученных исследований были получены положительные результаты по выделению бактериофагов из почвы. Удивительным оказалось то, что в относительно чистой почве имеются бактериофаги. Ведь, как известно, чем загрязненнее и плодородней почва, тем больше в ней бактерий и бактериофагов,

соответственно. В дальнейшем планируется более полное исследование полученных бактериофагов и внедрение их в лечебную практику. В частности, *Salmonella typhimurium* ТА 100, имеющая условно-патогенный характер, является причиной заболеваний, *Providencia spp* – распространенные возбудители больничных инфекций мочевых путей; они часто устойчивы ко многим антибиотикам. Получение бактериофагов, способных лизировать данные бактерии, во многом облегчит лечебную практику.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ

А.А. Сазанская

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский
университет» Минздрава России, г. Барнаул

В последние годы наблюдается повышенный интерес к изучению генетики молочнокислых бактерий. Это связано прежде всего с тем, что молочнокислые бактерии широко используются для производства разнообразных кисломолочных продуктов. Кроме того, молочнокислые бактерии, в том числе лактококки, являются важным элементом экологической ниши человека. Эти бактерии в кишечнике человека ограничивают развитие неблагоприятной микрофлоры, действуя в качестве пробиотиков.

У стрептококков группы N, или, по современной классификации, у бактерий рода *Lactococcus*, способность к сквашиванию молока, а также продуктов растительного происхождения преимущественно детерминруется плазмидами. Последние, в частности, детерминируют такие свойства лактококков, как потребление лактозы, протеолитическая активность, ароматообразование, антагонизм в отношении бактерий других видов, устойчивость к вирулентным бактериофагам и др.

В работе изучена коллекция из 14-ти, ранее не исследованных, производственных штаммов *L. Lactis ssp. lactis*. Установлено, что штаммы *L. lactis* обнаруживают повышенную нестабильность по сбраживанию лактозы. Обнаружены штаммы, одновременно теряющие способность к утилизации лактозы и галактозы. Показано, что сегреганты, чувствительные к фагам, сохраняли системы рестрикции-модификации ДНК. Выделены сегреганты, чувствительные к летальному действию препаратов фагов в высоком титре, сохраняющие предположительно системы защиты от фагов типа abortивной инфекции. Изучены плазмидные наборы у исходных производственных

штаммов, а также у их мутантов по способности к утилизации лактозы, галактозы и по фагоустойчивости. Для многих сегрегантов установлены изменения плазмидного профиля, предположительно ответственные за их фенотип. У ряда штаммов определена плазида с характерным размером 8,3 тпн, ответственная за сбраживание цитрата и образование диацетила. Выделены две конъюгативные плазмиды, детерминирующие утилизацию лактозы и галактозы, а также понижение чувствительности к вирулентным фагам.

В работе заложены основы генетического подхода к изучению производственных характеристик лактококков. Результаты этой работы могут быть использованы для разработки скрининга производственных штаммов с целью создания качественных стартерных культур лактококков.

**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ
АМБУЛАТОРНЫХ И ГОСПИТАЛЬНЫХ ПАЦИЕНТОВ
г. КАЗАНИ**

Ю.А. Тюрин, Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, Р.С. Фассахов.

ГБОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации
ФБУН Казанский НИИЭМ

ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»

По данным одного из авторитетных американских журналов по эпидемиологии, каждый год в США, примерно, у 2 млн. госпитализированных пациентов развиваются различные внутрибольничные инфекции, в том числе вызванные MRSA. В России, при отсутствии систематического исследования распространённости внебольничных и госпитальных штаммов MRSA, оценить истинные масштабы этого явления достаточно трудно. Необходимо отметить, что, начиная с 90-х годов прошлого века, одними из наиболее значимых внутрибольничных инфекций являются инфекции, вызванные *S. aureus*. Золотистый стафилококк лидирует среди этиологических агентов госпитальных инфекций дыхательных путей, хирургических инфекций в ожоговых и травматологических отделениях, а также занимает второе место среди ангиогенных инфекций, развивающихся у пациентов в

стационарах и во внебольничных условиях. Не меньшую актуальность сегодня представляют инфекции, вызываемые внебольничными штаммами метициллинорезистентных стафилококков у амбулаторных пациентов. Учитывая рост числа как госпитальных, так и внебольничных инфекций, вызванных метициллинорезистентными штаммами *S. aureus*, а также объективными трудностями в эпидемиологическом плане при разграничении этих штаммов, исследования по генотипированию метициллинорезистентности у штаммов, циркулирующих среди различных групп пациентов в г. Казани представляют практическую актуальность.

Цель исследования – сравнить генотипы метициллинорезистентных *S. aureus* по SCCmec комплексу у различных по источнику выделения штаммов для идентификации их происхождения.

Материалы и методы. В выборочном исследовании были включены 191 клинический штамм *S. aureus*. Штаммы выделены в 2007–2011 гг. от амбулаторных и госпитальных пациентов, проходивших лечение и обследование в условиях специализированной поликлиники ФБУН КНИИЭМ, Роспотребнадзора и многопрофильного стационара г. Казани. Идентификацию *S. aureus* осуществляли по морфологическим, биохимическим методам в соответствии с нормативными документами. Чувствительность к оксациллину определяли по стандартам NCLS, 2008. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК₉₀) определяли к оксациллину по МУК 4.2.1890-04 "Определение чувствительности штаммов *Staphylococcus aureus* к антибактериальным препаратам". Генотипирование *Staphylococcus aureus* проводили по протоколу представленному в методических рекомендациях Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. Идентификация типов SCCmec осуществляли методом ПЦР –амплификации с использованием 12 пар праймеров (олигонуклеотидов), синтезированных в ЗАО "Синтол", Москва, Россия.

Результаты. У амбулаторных пациентов со слизистой носоглотки и гладкой кожи были выделены 166 штаммов *S. aureus*. Нозологическая структура амбулаторных пациентов, колонизированных золотистым стафилококком (*S. aureus*) включала в себя пациентов с атопическим дерматитом (n=28), аллергическим ринитом (n=16), неаллергическим ринитом (n=12). В данной группе амбулаторных пациентов частота MRSA штаммов по данным фенотипической идентификации составила 27,1%. Характерной особенностью всей совокупности выделенных штаммов от данной группы пациентов было преобладание (72,9%) метициллинчувствительных штаммов (MSSA), по

сравнению с группой госпитальных пациентов (44,0%). Штаммы *S. aureus*, выделенные с кожи и раневого отделяемого госпитализированных больных (n=28), характеризовались преобладанием метициллинорезистентных изолятов (56,0%). Нами выявлено, что некоторые штаммы, выделенные как от амбулаторных, так и госпитальных пациентов, фенотипически были чувствительны к оксациллину, при этом молекулярно–генетический анализ ДНК выявил праймер – специфические ампликоны *mecA*-гена: это отмечено у 30,1% случаев для амбулаторных и в 64,0% – госпитальных изолятов. На втором этапе исследования проведено молекулярно –генетическое типирование позитивных по *mecA* гену ДНК штаммов и установлены типы SCCmec кассет. Изучение генотипа всех выделенных MRSA штаммов от амбулаторных и госпитальных пациентов позволило установить существенные типовые различия. Выявленное распределение типов SCCmec кассет показало, что штаммы, выделенные от амбулаторных пациентов, содержали в своем составе генетические элементы SCCmec IVa, c, d типов, тогда как в метициллинорезистентных штаммах, выделенных от пациентов госпитального профиля, были идентифицированы только SCCmec кассеты II типа. При определении минимальной подавляющей концентрации (МПК₉₀) оксациллина для всех генотипированных MRSA штаммов нами установлено, что высокие показатели МПК₉₀ к оксациллину были характерны только для штаммов, выделенных от пациентов госпитального профиля (МПК₉₀>0,256 мг/л), получавших высокоинтенсивную антибактериальную терапию с применением антибиотиков широкого спектра действия, тогда как низкие показатели МПК₉₀– от 0,008 до 0,032 мг/л – выявлялись в MRSA штаммах, выделенных от амбулаторных пациентов.

Обсуждение. Генетической характеристикой всех MRSA и MRSE штаммов, независимо от генотипов SCCmec элемента, является наличие гена *mecA*, обуславливающего устойчивость данных штаммов к оксациллину и другим бета-лактамам антибиотикам, и генов *сsc*-комплекса, которые кодируют белки, осуществляющие эксцизию и сайт–специфическую интеграцию *mecA* в геном стафилококков. Мобильные генетические элементы SCCmec, к которым относятся кассеты IV и V типов, могут переноситься от одних штаммов *S. aureus* к другим достаточно свободно, по сравнению с SCCmec кассетами I, II и III типов, как правило, не обладающих мобильностью. Необходимо отметить, что штаммы, содержащие SCCmec IV–V типов в составе своего генома вследствие выраженной мобильности и способности к горизонтальному переносу, представляют большую эпидемиологическую опасность при

распространении MRSA и передаче данного признака между стафилококками, колонизирующими организм человека.

Мобильные генетические элементы SCCmec I, II и III типов, присутствуют, как правило, в госпитальных клонах метициллинорезистентных стафилококков (HA-MRSA) и характеризуются наличием генов устойчивости к антибиотикам других групп (тобрамицину, канамицину, тетрациклину, эритромицину). Таким образом, изоляты метициллинорезистентных штаммов золотистых стафилококков, выделенные от госпитальных пациентов, в составе своего генома содержали SCCmec кассеты II типа, а штаммы выделенные от амбулаторных пациентов – кассеты IV типа SCCmec элемента.

Выводы. Выявлены генотипические различия по типу SCCmec между MRSA штаммами, выделенными от разных по эпидемиологической значимости источников.

ДЕТЕКЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ МЕТОДОМ ЭПР

А.В. Макеева, А.П. Ложкин, А.А. Родионов, П.В. Зеленихин

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) – метод, позволяющий регистрировать наличие в образце неспаренных электронов в составе свободных радикалов и металлов с переходной валентностью, что делает его привлекательным для биологических и медицинских наук. Свободные радикалы входят в состав ферментных комплексов электрон – транспортных цепей, и качественные и количественные изменения в данных парамагнитных центрах являются важной характеристикой патологических процессов, происходящих в клетках. РНКазы обладают цитотоксическим действием по отношению к малигнизированным клеткам, что делает эти ферменты перспективными объектами для создания противоопухолевых препаратов. Целью нашего исследования стала детекция изменений в лиофилизированных и замороженных клетках типичного представителя кишечной микрофлоры человека *E. coli* под действием цитотоксической и нецитотоксической нуклеаз – биназы (РНКаза *Bacillus intermedius*) и РНКазы А – методом ЭПР.

Первый тип сигнала от замороженных образцов детально исследовался при малой развертке магнитного поля вблизи $g=2$. Интенсивность сигнала при добавлении к культуре биназы в концентрации 300 мкг/мл значительно увеличивалась по сравнению с контролем, в то время как внесение РНКазы А не приводило к значительному увеличению интенсивности.

Также в спектрах детектировалась линия с $g=1.93$ и шириной $\Delta H \sim 25 \text{ Э}$, интенсивность которой не коррелировала с сигналом от радикала, но имела тенденцию к увеличению в образцах, подвергшихся воздействию биназы и РНКазы А, по отношению к контролю. Помимо вышеперечисленных сигналов наблюдались шесть линий одинаковой интенсивности в области $g \sim 2$, равноудаленных друг от друга на величину порядка 90 Э . Предположительно, они соответствуют спектру ЭПР сверхтонкой структуры (СТС) ионов двухвалентного марганца Mn^{2+} . Спектр марганца хорошо различим в образцах, обработанных РНКазой, в то время как в контроле его интенсивность меньше. Перечисленные сигналы не наблюдались в негативных контролях (среда, буферы до внесения РНКаз). В спектрах супернатантов, полученных после центрифугирования бактериальных суспензий, инкубированных с РНКазой, сигналы также не детектировались.

При температуре $T=15\text{K}$ в спектрах ЭПР лиофилизированных образцов присутствуют сигналы с $g=4,27$ $g=5,84$. Схожие сигналы наблюдались нами в биологических объектах и ранее, их мы относим к парамагнитным комплексам в железосодержащих белках.

Узкий сигнал радикала вблизи $g=2$ является сдвоенным (более интенсивный с $g=2,01$, и менее интенсивный с $g=2,02$). При уменьшении мощности наблюдается относительное изменение интенсивности сигналов, а именно, интенсивность сигнала с $g=2,01$ увеличивается. Такое возможно в случае эффекта «насыщения» – при длительном времени релаксации и при увеличении мощности СВЧ происходит выравнивание населенности энергетических уровней и, как следствие, уменьшение интенсивности сигнала. Таким образом, сигнал с $g=2,01$ насыщается, сигнал с $g=2,02$ не насыщается, что указывает на различную природу соответствующих парамагнитных центров. Сигнал на g -факторе 2.02, возможно, соответствует радикалам, содержащим серу.

Охарактеризованы изменения в парамагнитных центрах клеток *E. coli*, обработанных цитотоксической и нецитотоксической РНКазой. Спектры, детектированные вблизи g -фактора 2 и соответствующие радикалам, содержащим серу, предположительно принадлежат Fe-S белкам. Повышение интенсивности данного сигнала в клетках, инкубированных с биназой, возможно, связано с нарушением

функционирования электрон –транспортной цепи бактерий. Согласно данным литературы для эукариотических клеток, обработанных биназой, характерно снижение электрического потенциала митохондрий. Поскольку митохондрии эукариот имеют бактериальное происхождение, вероятно, наблюдаемое нами повышение интенсивности сигнала имеет схожую причину.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-31022 мол_а.

ДИНАМИКА РОСТА КУЛЬТУРЫ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ПРИСУТСТВИИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БАКТЕРИЦИДНЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ: СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

*А.Г. Мирошниченко, В.М. Брюханов, Л.Ю. Бутакова, И.Е. Госсен,
В.Ю. Перфильев, П.В. Смирнов*

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный
медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул

Проблема резистентности возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным агентам приобретает с течением времени все большую актуальность. В связи с этим важным является изучение особенностей поведения патогенных бактерий в присутствии антибактериальных средств. Традиционно влияние последних на микроорганизмы оценивается по конечному результату инкубации в течение 24 часов без учета динамики роста бактериальной культуры. Это касается и диско – диффузионного метода, и реже применяемого метода серийных разведений (согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»).

Цель исследования – сравнительная оценка динамики роста культуры *Klebsiella pneumoniae* в присутствии сублетальных концентраций бактерицидных антибактериальных средств – цефтазидима, ципрофлоксацина, гентамицина.

Материалы и методы. Работа выполнена на штамме *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, депонированном на кафедре микробиологии с вирусологией Алтайского государственного медицинского университета - контрольный штамм. Из указанного штамма готовили суточные культуры инкубацией на скошенном агаре при 35 °С, которые использовали для приготовления инокулятов – бактериальных суспензий в 0,9% растворе хлорида натрия с оптической плотностью 1,0 по Мак-Фарланду. Перед инокуляцией методом разведения определяли

минимальную подавляющую концентрацию (МПК) изучаемых антибактериальных средств – цефтазидима (Sigma-Aldrich, США), ципрофлоксацина (Sigma-Aldrich, США), гентамицина (AppliChem, Германия).

После инокуляции бактериальной суспензии смесь инкубировали в воздушном термостате при 35 °С в течение 24 часов в присутствии сублетальной концентрации антибактериальных средств, равной половине МПК. Для оценки развития штаммов использовали аппарат для определения оптической плотности бактериальных взвесей Densi-lameter (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Измерение проводили через 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 24 часа после начала инкубации. Полученные данные сравнивали с данными контрольных инкубационных смесей, не содержащих антибактериальные средства. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни с помощью программы SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., США), различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты. В присутствии гентамицина в сублетальной концентрации 0,5 мг/л развитие культуры подчиняется классической кривой роста, характеризующейся стадиями лаг-фазы, лог-фазы, стационарной фазы и фазы отмирания. В контроле лог-фаза начинается в промежутке между третьим и четвертым часом, в опытных смесях – через 6 часов. Вход в стационарную фазу в присутствии антибиотика наступает через 10 часов (в контроле – через 6 часов).

Ципрофлоксацин (13 мг/л) вызвал резкое увеличение лаг-фазы – более 12 часов. Лог-фаза и вход в стационарную фазу наступил в промежутке между 12 и 24 часами инкубации.

Особый интерес представляет собой динамика роста культуры в присутствии цефтазидима (4 мг/л). Кривая роста носит не традиционный (фазный), а волнообразный характер. Максимум оптической плотности достигается на 6 час эксперимента, затем идет ее снижение (на 30% к восьмому и на 60% к двенадцатому часу). Через 24 часа вновь зафиксировано повышение оптической плотности бактериальной биомассы. С учетом того, что динамическое наблюдение за культурой в промежутке между 12 и 24 часами не проводилось, мы не исключаем повторных пиков роста в указанный временной период.

Выводы. С учетом изложенного следует отметить, что для характеристики действия вещества на штамм *Klebsiella pneumoniae*, и, вероятно, другие бактерии, недостаточно однократной оценки по результатам инкубации в течение 24 часов. На примере цефтазидима продемонстрированы резкие изменения кривой роста, которые могут объяснять несоответствие результатов лабораторных исследований и

клинической эффективности препарата. По-видимому, при неправильном дозировании антибактериального средства и совпадении времени низкой концентрации препарата с очередным пиком размножения бактерий, может происходить еще большее усиление размножения микроорганизмов и приобретение ими резистентности.

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Н.В. Белоногова, А.Б. Маргулис

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Золотистый стафилококк часто входит в состав нормальной микрофлоры человека. Подавляющее число стафилококковых инфекций носит эндогенный характер, связанный с активацией аутомикрофлоры. Этот факт подчеркивает безусловную важность исследований, связанных с возможностью направленной регуляции интенсивности жизнедеятельности такого рода бактерий.

Активация аутомикрофлоры может происходить вследствие ослабления иммунитета, а также при различных стрессовых воздействиях окружающей среды. Таким образом, важным аспектом в исследовании физиологии золотистого стафилококка является изучение его реакций на различные стрессоры.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось оценить изменения физиологических и биохимических характеристик *Staphylococcus aureus* при действии биологических, химических и физических стрессоров.

В ходе работы решались следующие задачи:

Выявить стресс-индуцированные морфологические изменения *Staphylococcus aureus* при действии стрессоров различной природы. Оценить изменение ферментативной активности *Staphylococcus aureus* при стрессе. Охарактеризовать развитие стафилококковой инфекции у мышей, вызванной штаммом *S. aureus*, обработанным ацилированным гомосеринлактоном. Оценить возможность индукции сигнальных молекул клетками *S. aureus* при действии стрессоров.

Ацилированные лактоны гомосерина (АГЛ) являются сигнальными молекулами плотносно – зависимых процессов у грамотрицательных бактерий. По данным литературы грамположительные бактерии, в частности золотистый стафилококк,

способны реагировать на экзогенный АГЛ. В связи с этим, в качестве условно биологического стрессора был выбран ацилированный гомосеринлактон.

Ранее нами уже было показано, что микробный сигнальный агент гомосеринлактон (ГСЛ) не проявляет токсических и генотоксических эффектов в диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкг/мл по отношению как к про-, так и к эукариотам. Также было показано, что ГСЛ не влияет на морфологию колоний стафилококка и на переход клеток стафилококка в гипометаболическое и некультивируемое состояние в процессе длительного инкубирования культуры.

Основываясь на этих данных, мы оценили возможность синергетических эффектов АГЛ в отношении клеток стафилококка при действии теплового шока. Было показано, что воздействие теплового шока (ТШ) 45 °С на культуру *S. aureus* после ее предварительной обработки ГСЛ вызывает более раннее наступление стационарной фазы роста культуры, что, вероятно, связано с накоплением токсичных метаболитов.

Также нами было показано, что двухчасовая предобработка стафилококка гомосеринлактоном перед ТШ не влияет на лецитиназную активность, но приводит к повышению устойчивости протеаз к тепловому шоку 60 °С и к повышению чувствительности гемолизинов к действию ТШ, за счет чего ингибируется гемолитическая активность. Кроме того, мы определяли участие ГСЛ в развитии стафилококковой инфекции у мышей *in vivo*. Процент выживаемости мышей, зараженных необработанным ГСЛ стафилококком, в 2–3 раза ниже процента выживаемости мышей, зараженных стафилококком, прошедшим двухчасовую предобработку ацилированным гомосеринлактоном.

Методом масс-спектрометрии показано достоверное увеличение концентрации железа (в 35 раз) и кремния (в 2 раза) в крови больных мышей по сравнению со здоровыми. Установлено, что печень зараженных мышей содержит в 2 раза больше калия, чем печень здоровых мышей. При этом очень важно отметить, что количественное содержание исследованных катионов для мышей, зараженных культурой стафилококка, обработанной ацилированным гомосеринлактоном, значимо не отличалось от контроля.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать главное предположение о том, что предварительная обработка стафилококка ацилированным гомосеринлактоном приводит к снижению вирулентности, что, в первую очередь, видно по подавлению выработки гемолизинов, которые являются одним из основных факторов патогенности стафилококка.

Одним из новых направлений в регуляции кворум–эффектов у микроорганизмов является использование искусственно синтезированных химических агентов – фуранонов. Мы в своей работе использовали галогенированные фураноны. По своей химической природе они являются аналогами ГСЛ, способными регулировать плотностно – зависимые процессы у бактерий.

Было определено влияние Фуранона 1 в различных концентрациях на стафилококк при ТШ. В варианте Фуранон 1 в концентрации 10 мкг/мл при ТШ 45 °С отмечалось снижение числа КОЕ в 2 раза. В варианте фуранон 1 в концентрации 1 мкг/мл при ТШ 45°С на ЖСА на 72 час роста появились мелкие круглые колонии стафилококка без лецитиназной активности, составившие 80% от всех колоний.

При высеве культуры стафилококка на агаризованные среды, в которые предварительно был внесен фуранон 1 в исследуемых концентрациях, отмечали небольшую стимуляцию роста в вариантах 1 и 20 мкг/мл, изменение ферментативной активности не наблюдали.

При росте стафилококка на жидкой среде, содержащей 5–гидрокси–4–(4–метилфенилсульфонил)–3–хлор–2(5Н)–фуранон (Фуранон 1) в концентрациях 1, 10 и 20 мкг/мл, оптическая плотность культуры и общее число клеток на 24 час роста не отличалось от контрольного варианта (без вещества). Но в вариантах, содержащих фуранон, наблюдали снижение числа КОЕ примерно в 2 раза по сравнению с контролем. В варианте «Фуранон 1 в концентрации 1 мкг/мл» 17 % колоний имели отличную морфологию. Это были большие кремовые колонии с неровным краем.

Таким образом, Фуранон 1, в отличие от АГЛ, при совместном действии с ТШ45С снижает лецитиназную активность стафилококка, а также приводит к появлению новых морфотипов колоний и снижает способность к колониеобразованию при инкубировании культуры в жидкой среде в его присутствии.

В качестве физического стрессора нами было выбрано рентгеновское излучение. Воздействие рентгеновским излучением на собственную микрофлору человека потенциально может спровоцировать ее активацию.

Был проведен эксперимент по обработке *S. aureus* рентгеновским излучением в различных режимах. В качестве контроля использовали необработанную культуру. Наблюдали снижение числа КОЕ в образцах, подвергшихся обработке, в 1.5–2.5 раз, изменения ферментативных активностей по сравнению с контролем не наблюдали. Различные дозы приводили к стимуляции роста культуры, о чем можно судить по увеличению числа КОЕ. По этим данным можно предположить, что

данные дозы облучения являются стрессом средней силы, активирующим жизненные силы организма. В некоторых вариантах отмечалось снижение гемолитической и протеолитической активности.

По данным литературы стафилококк не способен вырабатывать собственный ГСЛ, поэтому наши предыдущие эксперименты оценивали влияние экзогенно внесенного ГСЛ на стафилококк. Но хроматографический анализ образцов, подвергшихся облучению, показал наличие АГЛ в образцах. Таким образом было показано, что данный стрессор индуцирует синтез собственных ГСЛ или их гомологичных структур.

Исходя из всех полученных данных каждый вид стрессоров вызывает свои реакции у стафилококка: ГСЛ снижает вирулентность, Фуранон 1 снижает способность к колониеобразованию и изменяет морфологию колоний, рентгеновское облучение индуцирует синтез ГСЛ. Общим для всех этих стрессоров является изменение у стафилококка той или иной ферментативной активности. Все перечисленные эффекты, в свою очередь, можно рассматривать как промежуточные этапы перехода клеток стафилококка в состояние гипометаболизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК 14.740.11.1040).

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

Е.А. Зайцева

ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет» Минздрава России, Владивосток
ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии» СО РАМН, г. Владивосток

Как известно под патогенностью принято считать способность микроорганизма вызывать патологические изменения, обусловленные сочетанным действием его различных свойств и факторов патогенности. Патогенные бактерии используют целый арсенал вирулентных факторов, определяющих узнавание специфического хозяина, проникновение и освоение среды обитания внутри хозяина, способность преодолевать его защитные механизмы. Большинство известных факторов патогенности имеет белковую природу, обладают метаболической и ферментативной активностью.

Листериоз – тяжелое инфекционное заболевание человека, вызываемое грамположительной бактерией *L. monocytogenes*, которое представляет наибольшую опасность для беременных женщин, новорожденных, людей с иммунодефицитами и лиц пожилого возраста. В последние годы достигнут существенный прогресс в изучении различных факторов патогенности листерий. Без учета патогенного потенциала невозможно оценить клинико-эпидемиологическое значение того или иного штамма *L. monocytogenes*.

Цель исследования - изучить патогенные свойства *L.monocytogenes*, выделенных из различных источников в Дальневосточном регионе с целью оценки их эпидемического потенциала.

В работе использованы культуры *L. monocytogenes* (118 изолятов), выделенные из клинического материала (n=20), животных (n=48), пищевых продуктов (n=50) на Дальнем Востоке России. Микробиологические исследования факторов патогенности проводили по общепринятым методам, описанным в справочниках по микробиологическим методам исследования, а также согласно методов, сред, рекомендованных ГОСТ Р 51921-2002 и МУК 4.2.1122-02 для выделения листерий. Экспериментальная часть работы выполнена на неинбредных мышах массой 14 - 18 г, морских свинках весом 150 - 200 г. Работа выполнена с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

С помощью микробиологических методов у культур *L. monocytogenes* (n=118) были исследованы такие связанные с патогенностью ферментативные активности, как лецитиназная, гемолитическая, гиалуронидазная и ДНКазная, липазная активность по отношению к трем твинам 20, 60 и 80, патогенность для животных (белых мышей, морских свинок).

Для выявления отличительных особенностей среди *L. monocytogenes* в зависимости от источника изоляции было выделено 4 группы культур: 1) из клинического материала, 2) от мышевидных грызунов, 3) из морских гидробионтов, 4) пищевых продуктов (как контроль).

Установлено, что все исследуемые изоляты *L. monocytogenes* независимо от источника выделения обладали каталазной, гемолитической, ДНКазной активностью. Выявлены отличия в ферментативной активности у листерий в зависимости от источника выделения такой, как гиалуронидазной, лецитиназной и липазной.

Отмечено, что гиалуронидазная активность определялась у всех *L. monocytogenes*, изолированных из клинического материала и грызунов, и реже выявлялась у культур, выделенных из пищевых продуктов ($94,7 \pm 3,6\%$) и морских гидробионтов ($66,7 \pm 11,4\%$).

Лецитиназная активность была выявлена у всех исследуемых культур *L. monocytogenes*, изолированных из клинического материала и грызунов, и вариабельна у культур из морских гидробионтов ($90,0 \pm 6,9\%$) и пищевых продуктов ($68,4 \pm 7,5\%$).

Сравнительный анализ липазной активности у *L. monocytogenes*, изолированных из разных источников, показал, что отношение листерий к твинам было вариабельным. Все изучаемые культуры *L. monocytogenes* (100%) ферментировали твин 60 независимо от источника выделения.

По отношению к твину 80 культуры листерий, изолированные из клинического материала, такой активностью не обладали, тогда как изолированные от грызунов ($90,0 \pm 6,9\%$) и из пищевых продуктов ($82,6 \pm 6,1\%$) в большей степени обладали липолитической активностью. Меньше всего клинические изоляты *L. monocytogenes* ($20,8 \pm 8,5\%$, $p < 0,001$) были активны в отношении твина 20, а культуры листерий, изолированные из органов грызунов и пищевых продуктов (мясные и рыбные продукты отечественного и импортного производства), показали высокую липолитическую активность в отношении твина 20 ($95,0 \pm 5,0$ и $73,7 \pm 8,5\%$ соответственно).

В то же время важно отметить, что некоторые изоляты *L. monocytogenes* гидролизуют твин 20 от 4 до 10 дней, а твин 80 в течение 5 – 14 дней. Быстрее всего идет гидролиз твина 60: через 24 часа его гидролизovali - $78,1\%$ культур *L. monocytogenes*, двое суток – $7,3\%$ и четверо суток – $14,6\%$ культур, что согласуется с данными литературы о длительности ферментации твинов до 10 - 14 дней (Бакулов И.А., Васильев Д.А., 1999).

Кроме ферментативных свойств, в экспериментах *in vivo* изучали вирулентность культур *L. monocytogenes* на неинбредных мышах с вычислением LD_{50} и постановкой кератоконъюнктивной пробы на морских свинках.

С этой целью использовали 48 культур *L. monocytogenes*, выделенных на Дальнем Востоке из клинического материала, разных видов грызунов, морских гидробионтов, пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Вирулентность 48 изученных изолятов *L. monocytogenes*, выраженная величиной LD_{50} , колебалась в пределах $10^2 - 10^8$ микробных клеток.

По степени вирулентности для белых мышей культуры *L. monocytogenes* чрезвычайно неоднородны. Встречались листериозные

культуры как вирулентные, так и слабовирулентные независимо от источника выделения. Кроме того, часть изолятов *L. monocytogenes* вызывала развитие парезов или параличей у белых мышей, а у морских свинок развивался конъюнктивит, кератоконъюнктивит или кератит через 24 – 48 часов после внутриглазного заражения, протекавший с различной длительностью и выраженностью процесса (от 6 до 30 суток). Один изолят *L. monocytogenes* из пищевого продукта, вызвал гибель морской свинки на 12 день после ее заражения. Заражение этой культурой *L. monocytogenes* белых мышей приводило к параличу задних конечностей, а LD₅₀ составила 1,2x10⁸ КОЕ/мл. Возможно, что такие разнообразные клинические проявления и гибель животных связаны не только с патогенными свойствами самих культур *L. monocytogenes*, но и с состоянием и восприимчивостью макроорганизма.

В целом, полученные результаты показали, что подавляющее большинство культур *L. monocytogenes*, изолированных в Дальневосточном регионе из различных источников, обладали однотипными свойствами. Отмеченная вариабельность ферментативной активности факторов, связанных с патогенностью, выявила фенотипическую неоднородность листерий. В то же время данные, полученные при исследовании факторов патогенности у *L. monocytogenes*, показывают их определенную диагностическую значимость и позволяют охарактеризовать эпидемическую опасность обнаруженных культур.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА VNTR-ТИПИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР

Ю.А. Панфёрова, Т.А. Лукьянова

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

Лептоспироз представляет собой эмерджентное природно-очаговое инфекционное заболевание с практически повсеместным распространением. Возбудителем заболевания могут быть некоторые виды патогенных лептоспир (преимущественно *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*). Наиболее распространенным видом патогенных лептоспир, вызывающих заболевания человека и животных, является *L. interrogans*, при этом серогруппа *Icterohaemorrhagiae* ассоциирована примерно с половиной случаев заболевания у людей.

Виды *L. kirschneri* и *L. borgpetersenii* чаще связаны с лептоспирозом животных. Установлено, что одним из факторов, оказывающих значительное влияние на тяжесть болезни, является систематическая принадлежность возбудителя. В то же время, типирование возбудителя лептоспироза в подавляющем большинстве случаев проводится с помощью серологических методов, то есть определения серогруппы на основании реакции микроагглютинации. Хотя серологическая классификация, основой которой служит определение антигенного состава, не имеет определяющего значения для таксономии микроорганизма (лептоспиры разных видов могут принадлежать к одной серогруппе), она достаточно удобна для определения источника заболевания, поэтому в настоящее время разделение лептоспир на серогруппы и серовары продолжает сосуществовать параллельно с генетической классификацией, основанной на молекулярной филогении. Молекулярно-биологические исследования являются важным звеном в эпидемиологии лептоспироза, поскольку позволяют установить, являлся ли источником вспышки клональный вариант патогена, а также участие в эпидпроцессе переносчиков.

Наиболее перспективным методом генотипирования лептоспир в настоящее время считается анализ tandemных повторов переменной копийности (VNTR, *variablenumbertandemrepeats*). Данный метод основан на избирательной амплификации локусов генома, несущих в составе tandemные повторы, число которых в ходе мутаций у разных штаммов может увеличиваться или уменьшаться, при этом продукты амплификации будут различаться по длине, что может быть выявлено в стандартном агарозном электрофорезе. Для анализа tandemных повторов характерна высокая дискриминационная способность, в то же время он является доступным для большинства исследовательских лабораторий методом. Стоит отметить, что большее число локусов tandemных повторов было выявлено в геноме лептоспир вида *L. interrogans*, анализ локусов других видов может быть затруднен из-за ограниченных данных о нуклеотидных последовательностях.

Учитывая вышеизложенное, данное исследование ставило своей целью изучить генетическую структуру штаммов лептоспир, выделенных преимущественно от пациентов на территории Санкт-Петербурга в современный период (1990–2006 гг.). Лептоспиры серогрупп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola* доминировали в этиологической структуре лептоспироза за указанный период. Был определен геномовид штаммов и проведен анализ локусов tandemных повторов VNTR-4 и VNTR-10. Для исследования было отобрано 13 штаммов, выделенных от пациентов с диагнозом «лептоспироз» (на

основании клинической картины и серологических исследований в динамике; серогруппа *Icterohaemorrhagiae* – 11 штаммов и серогруппа *Canicola* – 2 штамма), одного штамма, выделенного в ходе эпидемиологического мониторинга от серой крысы (серогруппа *Canicola*), и два типовых штамма серогрупп *Icterohaemorrhagiae* (RGA, выделен в Нидерландах) и *Canicola* (HondUtrechtIV, выделен в Бельгии).

Выделение ДНК из живых культур лептоспир проводилось методом нуклеосорбции с использованием коммерческого набора «DiatomDNAPrep100» («Лаборатория ИзоГен») согласно рекомендациям производителя. Для определения геновида проводилась амплификация фрагмента гена *lipL32*, кодирующего липополисахарид наружной мембраны лептоспир и характеризующейся наличием видоспецифичных участков, с последующим прямым секвенированием полученного продукта. Для анализа локусов VNTR–4 и VNTR–10 оптимизировали реакцию полимеразной цепной реакции (ПЦР) с олигонуклеотидными праймерами, фланкирующими данные локусы (по материалам *L. salaun*, F.Merinet. al., 2006), в термоциклере «MyCycler» (BioRad) с использованием готовой реакционной смеси для ПЦР «HotStartPCR-mix» («Евроген»). В результате оптимизации режим термостатирования составил цикл денатурации (94°C, 1 мин) и 35 циклов «денатурация–отжиг–синтез» (94°C, 20 с; 55°C, 40 с; 72°C, 1 мин). Анализ продуктов реакции производился после электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, размер ампликонов определялся при сравнении с маркером молекулярного веса ДНК (100–1000 п.н., «Евроген»).

При анализе нуклеотидных последовательностей фрагмента 750 п.н. гена *lipL32* установлено, что все исследуемые штаммы принадлежат к геномвиду *Leptospira interrogans*. При анализе локуса VNTR–4 было выявлено два варианта локуса: 800 п.н. (серогруппа *Canicola*, выделен от крысы) и 430 п.н. (прочие штаммы). Таким образом, по данному генетическому маркеру штаммы образовали достаточно однородную группу, единственный варибельный аллель был отмечен в серогруппе *Canicola*. При анализе локуса VNTR–10 также было выявлено два варианта: 500 п.н. (у всех штаммов серогруппы *Icterohaemorrhagiae*, включая референс-штамм RGA) и 800 п.н. (у всех штаммов серогруппы *Canicola*, включая референс-штамм HondUtrechtIV).

В результате проведенного исследования, была установлена относительно невысокая гетерогенность штаммов лептоспир, циркулирующих на территории Санкт–Петербурга и ассоциированных со случаями заболевания людей. Различий в генотипах по данным

маркерам у штаммов серогруппы *Icterohaemorrhagiae* (доминирующей по частоте заболеваний у людей), выделенных в разные годы за период 1990–2006 гг., не выявлено. Уникальным профилем при анализе двух локусов tandemных повторов обладал лишь штамм серогруппы *Canicola*, выделенный от серой крысы, среди выделенных от пациентов штаммов той же серогруппы аналогичный профиль не встречался. Локус VNTR–4 был представлен двумя аллельными вариантами; наиболее распространенный вариант (размер локуса 430 п.н.) обнаружен у лептоспир серогрупп *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola*, ассоциации с географическим регионом выделения при этом не выявлено, в силу отсутствия различий по сравнению с западноевропейскими референс-штаммами. Возможная ассоциация альтернативных аллелей локуса VNTR–4 с источником выделения штамма требует более детального изучения. При анализе локуса VNTR–10 аллельные варианты были ассоциированы с антигенными вариантами лептоспир, при этом серогруппа *Canicola* во всех случаях дистанцировалась от *Icterohaemorrhagiae*, а ассоциации с географическим районом и источником выделения штамма не наблюдалось.

Таким образом, штаммы патогенных лептоспир вида *L. interrogans*, преимущественно вызывающие заболевания людей в Санкт-Петербурге на протяжении последних двух десятилетий, характеризуются невысоким уровнем генетической гетерогенности при маркировании локусов tandemных повторов 4 и 10. В то же время в регионе могут циркулировать и иные клональные популяции патогена, как в природных, так и в антропоургических очагах (за счет синантропных грызунов), исследование которых в настоящее время ограничено. Ассоциация таких генетически дистанцированных вариантов с лептоспирозом у людей также может существовать, поскольку диагностика лептоспироза в подавляющем большинстве случаев проводится при использовании серологического метода, на относительно поздних сроках заболевания, когда выделение возбудителя практически невозможно. Использование мультилокусного анализа VNTR, включающего большее число (5–7) локусов, а также сочетание методов анализа VNTR и секвенирования отдельных генов может быть более перспективным для исследования молекулярной эпидемиологии лептоспироза в современный период.

КАРИЕС ЗУБОВ И МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЕТА У ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

Н.И. Смоляр, К.Г. Мусий-Семенцев

Львовский национальный медицинский
университет имени Данила Галицкого,
г. Львов.

На сегодняшний день общепринятая модель развития кариеса зубов, согласно которой главным этиологическим фактором является микрофлора полости рта, которая осуществляет кариесогенное влияние при наличии благоприятной среды и субстрата – углеводов, способных к ферментированию. Ведущим микробным этиологическим фактором кариеса считается *Streptococcus mutans*, однако молекулярно–генетические методы исследования обнаруживают в составе дентальной биопленки десятки видов микроорганизмов. Выявлено, что у детей в дентальной биопленке преобладают грамположительные кокки при наличии как аэробной так и анаэробной микрофлоры. Однако многообразие видов можно объяснить гигиеническими привычками, состоянием зубов, возрастом и другими факторами. Доказано, что состав микрофлоры дентальной биопленки у детей с кариесом и с интактными зубами существенно отличается, поэтому микробиологические исследования могут иметь прогностическое значение для развития и оценки эффективности профилактических мероприятий кариеса зубов у детей.

Цель исследования: Исследовать состояние микрофлоры зубного налета у детей раннего возраста.

Материал и методы исследования. Проведено микробиологическое исследование зубного налета в 138 детей 2–5 лет. Исследования проводились по стандартным бактериологическим и бактериоскопическим методикам. Проводилась микроскопия мазков и микробиологическое исследование аэробной микрофлоры зубного налета.

Результаты исследования: Согласно полученным данным, у детей с интактными зубами по сравнению с группой детей с кариесом молочных зубов, в среднем, в большем количестве выделялись нейссерии ($67,57 \pm 5,41\%$ и $46,88 \pm 6,24\%$). Поэтому у детей с пораженными зубами в значительном количестве преобладали α -гемолитические стрептококки ($89,06 \pm 3,90\%$ и $60,81 \pm 5,64\%$) ($p < 0,02$), негемолитические стрептококки ($90,63 \pm 3,64\%$ и $74,32 \pm 5,04\%$) ($p < 0,001$) ($p < 0,001$), β -гемолитические стрептококки ($17,19 \pm 4,72\%$ и $9,46 \pm 3,38\%$)

($p>0,05$), *S. aureus* ($15,63\pm4,54\%$ и $6,76\pm2,90\%$) ($p>0,05$), а также коагулазоотрицательные стафилококки ($45,31\pm6,22\%$ и $32,43\pm5,41\%$) ($p>0,05$). Такие бактерии как эшерихии, клебсиеллы и псевдомонасы выделялись только у детей с кариесом молочных зубов.

У детей с интактными зубами в возрасте 2-3 года количество α -гемолитических стрептококков составляет $39,13\pm9,96\%$ и возрастает до $70,59\pm6,38\%$ в 4-5 лет ($p<0,001$). В группе детей с кариесом молочных зубов в 2-3 года α -гемолитические стрептококки оказываются в значительно большем количестве и равны $80,95\pm8,57\%$ и их процент возрастает до $93,02\pm3,89\%$ в 4-5 лет ($p>0,05$). Количество негемолитических стрептококков в обеих группах детей с возрастом существенно не меняется. Однако, их процент у детей с интактными зубами составляет $73,91\pm8,96\%$ в 2-3 года и $74,51\pm6,10\%$ в 4-5 лет. У детей с пораженными зубами несколько выше и равна $90,48\pm6,40\%$ в 2-3 года и $88,47\pm4,89\%$ в 4-5 лет. Процент β -гемолитических стрептококков у детей 2-3 года с интактными зубами составляет $8,69\pm5,75\%$ и $8,90\pm4,16\%$ в 4-5 лет. У детей с кариесом молочных зубов в 2-3 года равна $9,52\pm6,40\%$, но увеличивается в возрасте 4-5 лет ($20,93\pm6,20\%$) ($p>0,05$). В группе детей 2-3-летнего возраста с интактными зубами обнаружено $65,22\pm9,72\%$ лактобактерий, однако их количество возрастает до $88,24\pm4,51\%$ в 4-5 лет. У детей с кариесом молочных зубов их количество значительно больше и соответственно равно $95,24\pm4,65\%$ в 2-3 года и несколько уменьшается до $83,72\pm5,63\%$ в 4-5 лет. Количество нейссерий выше у детей с интактными зубами. Так, в возрасте 2-3 года их процент составляет $78,26\pm8,42\%$ и уменьшается до $62,75\pm6,77\%$ в 4-5 лет ($p>0,05$). Количество нейссерий у детей с пораженными зубами существенно не меняется с возрастом и соответственно равна $42,86\pm10,8\%$ в 2-3 года и $48,84\pm7,62\%$ в 4-5 лет. *S. aureus* у детей с интактными зубами выделялись только в возрасте 4-5 лет ($9,80\pm4,16\%$). У детей с кариесом зубов их количество возрастает с $4,16\pm1,55\%$ в 2-3 года до $18,60\pm5,93\%$ в 4-5 лет. Часть коагулазоотрицательных стафилококков у детей 2-3 года с интактными зубами значительно меньше чем у детей с кариесом молочных зубов ($26,09\pm8,96\%$ и $57,14\pm10,8\%$) ($p<0,05$). В группе 4-5-летних детей с интактными зубами их количество несколько увеличивается и равно $35,29\pm6,69\%$, а с пораженными зубами уменьшается и равна $39,53\pm7,46\%$. Эшерихии, клебсиеллы и псевдомонасы выделялись только у детей 2-3-летнего возраста с кариесом молочных зубов.

Таким образом, с возрастом растет количество детей с устойчивыми биоценозами бактерий, имеющих кариесогенное действие.

У детей с кариесом молочных зубов оказывается высокий процент группировки кариесогенных бактерий.

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ «НАРИНЭ»: ИНГИБИРОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА АЗИДА НАТРИЯ В ТЕСТЕ ЭЙМСА

Н.С. Карамова, М.А. Кириллова

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Загрязнение окружающей среды мутагенами физической, химической и биологической природы является серьезным фактором риска, способствующим развитию многих хронических заболеваний, в том числе и онкологических.

Одним из наиболее серьезных заболеваний является колоректальный рак, который по распространенности занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний у населения развитых стран. В связи с этим особую актуальность представляет изучение антигенотоксических свойств лактобацилл, представителей естественной микрофлоры кишечника, для оценки роли данных бактерий в естественной профилактике канцерогенеза.

Целью данной работы явилось исследование антимутагенных свойств штамма *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ep. 317/402, используемого для приготовления кисломолочного продукта «Наринэ», в тесте Эймса. На антимутагенную активность были исследованы:

- 1) культура *L. acidophilus* n.v.Ep. 317/402 экспоненциальной фазы роста в среде MRS (КЛБ);
- 2) супернатант культуральной жидкости *L. acidophilus* n.v.Ep. 317/402;
- 3) суспензия клеток *L. acidophilus* n.v.Ep. 317/402 в изотоническом растворе (солевой концентрат – СК).

В экспериментах использовали культуру лактобацилл экспоненциальной фазы роста. Часть культуры переносили в стерильные центрифужные пробирки и центрифугировали 20 мин. при 4400 g. Супернатант пропускали через мембранные фильтры (размер пор 0.4 мкм). Клетки отмывали центрифугированием и перерастворяли в изотоническом растворе.

Антимутагенную активность оценивали в тесте Эймса на тестерном штамме *Salmonella typhimurium* TA100 (his G46, rfa-, pKm 101, Δuvr Bbio-), полученном из коллекции микроорганизмов кафедры генетики МГУ. Метод позволяет определить способность химических соединений индуцировать обратные мутации к гистидиновой

прототрофности у тестерных штаммов *Salmonella typhimurium*, ауксотрофных по гистидину. Также тест Эймса позволяет определить антимуtagenную активность исследуемых агентов, т.е. их способность снижать уровень мутаций, индуцируемых известным мутагеном. В наших экспериментах в качестве стандартного мутагена (положительный контроль) был использован азид натрия (4 мкг/чашку). Для оценки десмутaгенного и биоантимуtagenного эффектов *L. acidophilus* п.в.Ер. 317/402 тест Эймса проводили в двух модификациях. При изучении десмутaгенных свойств *Lactobacillus acidophilus* п.в.Ер. 317/402, стандартный мутаген, тестерный штамм и агент, исследуемый на антимуtagenность, одновременно добавляются в инкубационную среду. При оценке биоантимуtagenного потенциала клетки тестерного штамма предварительно (в течение 20 мин.) инкубируются с потенциальным антимуtagenом и далее в инкубационную среду добавляется стандартный мутаген. Антимуtagenный эффект рассчитывали по формуле:

$$\text{Антимуtagenный эффект (\%)} = \frac{(a - b) * 100}{a - c} ;$$

где а – число His⁺ ревертантов в положительном контроле (азид натрия),
 b - число His⁺ ревертантов в опытном варианте (азид натрия + исследуемый агент),
 c - число His⁺ ревертантов в негативном контроле (дистиллированная вода или среда MRS).

Согласно Negi с соавторами, ингибирование мутагенного эффекта менее чем на 25% свидетельствует о слабой, от 25% до 40% о средней, выше 40 % - о сильном антимуtagenном эффекте исследуемого агента.

Поскольку лактобациллы проявляют антагонистическую активность в отношении патогенных и условно–патогенных микроорганизмов, предварительно нами было исследовано влияние лактобацилл «Наринэ» на выживаемость тестерного штамма *S. typhimurium* TA100. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что супернатант культуральной жидкости *L. acidophilus* п.в.Ер. 317/402 практически не подавляет рост штамма *S. typhimurium* TA100. Процент выживаемости тестерного штамма составил 92.7 %.

Нами установлено что культура лактобацилл, супернатант и суспензия *L. acidophilus* п.в.Ер. 317/402 в СК в экспоненциальной фазе роста обладают выраженным десмутaгенным действием и вызывают статистически значимое снижение уровня мутаций, индуцированных

азидом натрия. Следует отметить, что супернатант и культура лактобацилл «Наринэ» проявили более высокий антимутагенный эффект, соответственно 67,39% и 68,9% по сравнению с суспензией клеток лактобактерий в СК (42%).

Исследование биоантимутагенных свойств штамма *L. acidophilus* n.v.Ер. 317/402 в специальной модификации теста Эймса показало, что суспензия клеток в СК, супернатант и культура лактобацилл в экспоненциальной фазе роста проявляют слабый антимутагенный эффект в отношении азиды натрия. После предварительной преинкубации тестерного штамма *S. typhimurium* TA100 с *L. acidophilus* n.v.Ер. 317/402 при последующем добавлении азиды натрия мы не наблюдали заметного снижения мутагенного эффекта последнего. Суспензия клеток лактобацилл в СК снизила уровень мутаций, индуцированных азидом натрия у *S. typhimurium* TA100 на 8,2%, супернатант – 2,7%, а КЛБ - 2,1%.

Анализ полученных нами результатов показывает, что штамм *L. acidophilus* n.v.Ер. 317/402 в экспоненциальной фазе роста проявляет сильный десмутагенный эффект в отношении азиды натрия. Следует подчеркнуть, что наивысший антимутагенный эффект нами установлен для культуры *L. acidophilus* n.v.Ер. 317/402, выращенной в среде MRS и супернатанта культуральной жидкости. Полученные результаты позволяют нам предположить, что обнаруженный антимутагенный эффект прежде всего обусловлен метаболитами, выделяемыми лактобактериями *Lactobacillus acidophilus* n.v.Ер. 317/402 в культуральную жидкость, которые непосредственно связываются с азидом натрия и инактивируют его.

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PROVIDENCIA*

Е.В. Шляпникова, Н.М. Замалютдинова, А.М. Марданова

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Одной из важнейших проблем современной клинической микробиологии является поиск новых методов борьбы и профилактики внутрибольничных инфекций. Повсеместно наблюдается рост оппортунистических инфекций, вызванных различными видами энтеробактерий. Одними из таких возбудителей являются бактерии рода *Providencia*. Условно-патогенные бактерии рода *Providencia* вызывают

различные гнойно-воспалительные инфекции и, в том числе, диарею у детей, заболевания мочеполовых путей, бактериемию, кератит и др. Бактерии рода *Providencia* обладают различными факторами вирулентности, такими как адгезины, уреазы, способность инвазировать эукариотические клетки и др. В настоящее время отсутствуют данные о роли внутриклеточных протеиназ *Providencia* в патогенезе оппортунистических инфекций. Можно предположить, что эти ферменты играют важную регуляторную роль в контроле экспрессии генов вирулентности. Известно, что инвазия бактерий рода *Providencia* сопряжена с реорганизацией актинового цитоскелета клетки-мишени. Поэтому важными факторами вирулентности могут быть бактериальные протеиназы, расщепляющие актин. В клетках *Escherichia coli* A2 была идентифицирована металлопротеиназа ECP32, специфически расщепляющая актин, что приводило к потере способности актина к полимеризации. Позднее бактерия-продуцент была заново идентифицирована как штамм *Serratia grimesii*, а фермент назван гримелизином. Было показано, что бактерии-продуценты протеазы ECP32 способны к инвазии в эукариотические клетки.

Первый этап работы был посвящен генно-информационному поиску в геномах различных видов бактерий рода *Providencia* последовательностей гомологичных гену гримелизина. Использовали последовательность гена гримелизина *S. grimesii*, имеющуюся в свободном сервере (<http://www.ncbi.nlm.gov/sites/gquery>), а также последовательности геномов разных видов бактерий рода *Providencia* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Биоинформационный анализ проводили с помощью программ сайта NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Использовали программы GenBank, Blast, Sanger, а также Asap (<http://asap.ahabs.wisc.edu/>), coliBASE (colibase.bham.ac.uk/). Поиск гомологов гена гримелизина в геномах *Providencia* не выявил сколько-нибудь протяженных гомологичных последовательностей. В геноме *Providencia rettgeri* была найдена последовательность с 78% гомологией к гену гримелизина при длине выравниваемых последовательностей всего 50 н.о. Однако Blast-анализ выявил в геномах различных видов *Providencia* последовательности, кодирующие пептиды со значительной гомологией к белку гримелизину. Так в геноме *P. alkalifaciens* ATCC 9886 обнаружена последовательность, кодирующая гипотетический белок с гомологией 45%/60% (идентичность/сходство) к гримелизину. В геноме *P. rustigianii* ATCC 33673 обнаружена последовательность, кодирующая белок аннотированный как пептидаза семейства M4 с гомологией 44%/59% (идентичность/сходство). В геноме *P. burhodogranariae*

АТССВАА-1590 обнаружен гомолог гримелизина (38%/56% (идентичность /сходство)). В других видах *Providencia* также выявлены гомологи, но длина выравниваемых последовательностей в этих случаях менее 50% от длины белка. Полученные данные свидетельствуют о том, что в клетках *Providencia* имеются последовательности, кодирующие металлопротеиназы. Однако эти протеиназы, видимо, значительно отличаются от гримелизина.

Изоляты бактерий рода *Providencia* sp.1 и 2 были идентифицированы на основе микробиологических тестов и гомологии 16 S рПНК как штаммы *P. stuartii* (99% гомологии к шт. *P. stuartii* ATCC 29914) и *P. rettgeri* (98% гомологии). В клеточных экстрактах бактерий *P. stuartii*, полученных с помощью ультразвуковой дезинтеграции, была определена протеолитическая активность по расщеплению азоказеина (0, 179 ед. мл). Зимография клеточных экстрактов обоих штаммов в SDS-PAGE с желатином выявила зоны протеолитической активности (3-4 пептида), что может свидетельствовать о наличии в клетках этих бактерий нескольких разных протеиназ, активных по отношению к желатину. Характер распределения зон расщепления желатина в геле и интенсивность расщепления субстрата различаются у двух видов *Providencia*, что свидетельствует о видовых различиях в протеолитической активности этих бактерий.

Следующий этап работы заключался в выделении гена металлопротеиназы из клеток *P. rettgeri*. Для идентификации гена использовали последовательность, гомологичную к гену гримелизина, идентифицированную с помощью BLAST-анализа. Эта последовательность была использована как матрица для конструирования праймеров (dir: cag-gca-ttc-caa-ata-gag-cct-ttt-a; rev: aat-taa-tat-gta-cgc-cgc-cat-tat-c). Был проведен анализ гомологичной последовательности *P. rettgeri* помощью программы поиска сайтов рестрикции Spin(http://staden.sourceforge.net/manual/spin_unix_toc.html) и отобраны рестриктазы для фрагментации геномной ДНК (BamH1, EcoR1), которые не имели сайтов расщепления в пределах этой последовательности. Рестрикты геномной ДНК лигировали и проводили ПЦР-анализ. ДНК-электрофорез показал, что продукт амплификации имеет размер около 1000 н.о, что близко к размерам генов исследуемых металлопротеиназ (1014-906 н.о). Полученные результаты могут свидетельствовать о присутствии в клетках *P. stuartii* протеиназы гомологичной гримелизину. Исследование роли внутриклеточной протеиназы *P. stuartii* в вирулентности бактерии важно с точки зрения поиска новых мишеней для антибактериальной терапии.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2012-2013 гг. соглашение № 14.А18.21.1118.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩЕЙ СИСТЕМЫ

*М.У. Дусмагамбетов, А.М. Дусмагамбетова, М.П. Гаврилов, О.В. Гаврилова,
М.Т. Бердюгин, О.С. Бутримова, Т.А. Дружинина*

АО «Медицинский университет Астана», г. Астана,
Бактериологическая лаборатория ЦСЭЭ
г. Степногорска, Республика Казахстан

Диагностика и лечение урологических заболеваний не теряет своей актуальности и в наши дни. По данным литературы около 2% обращающихся к врачу пациентов составляют больные с инфекциями почек и мочевыводящих путей. Микробиологические исследования играют важную роль в диагностике заболеваний, рациональном выборе антибактериальных препаратов, оценке и контроле эффективности проведенной терапии, а также в профилактике осложнений.

По данным ряда авторов ведущей микрофлорой при инфекциях мочевыводящих путей (ИМВП) являются грамотрицательные бактерии (до 83%).

Выделение микроорганизмов должно быть направлено на получение достоверных данных об их этиологической значимости. Поэтому, при дифференциации бактериурии от контаминации мочи, учитывают вид возбудителя, многократность его выделения и его концентрацию в 1 мл мочи. С этой целью в лабораторной практике используют количественные методы исследования. Показано, что если в моче содержится 10^5 и более колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий в 1 мл, то такие результаты обычно бывают клинически значимыми, а такая степень бактериурии указывает на воспалительный процесс.

Было проведено исследование видового состава микрофлоры, выделенной у урологических больных, и оценка эффективности их антибактериальной терапии.

Всего изучено 1334 проб мочи от больных, поступивших в урологическое отделение Центральной городской больницы (ЦГБ) г. Степногорска с инфекцией мочевыводящих путей, протекающей в

острой или хронической форме. Возраст больных был от 25 до 75 лет. Мочу собирали до назначения антибактериальной терапии в количестве 20-30 мл средней порции утренней мочи. Время от момента забора до проведения исследования не превышало 2 часа. Посев проводился по методу Gould бактериологической петлей с диаметром 2 мм на 5% кровяной агар. У больных с хроническими уроинфекциями, а также после окончания курса лечения проводился дополнительный посев 0,1 мл мочи. Через 18-24 часа инкубации посевов при 37⁰С подсчитывалось количество выросших колоний отдельно по видам. По таблице определялась степень бактериурии. Идентификация проводилась по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам.

Чувствительность к антибиотикам определялась диско – диффузионным методом с использованием критериев NCCLS. К категории «нечувствительные» были отнесены умеренно резистентные и устойчивые к антибиотикам микроорганизмы.

По данным ряда авторов у больных пиелонефритом удается выделить микроорганизм, вызывающий заболевание от 40 до 75%. В последние годы наметилась тенденция к снижению высеваемости микробов из мочи. В результате проведенного исследования бактериурия была обнаружена у 47,6% больных, в том числе у больных с острыми заболеваниями – в 67,9%, а с хроническими – 41,2%.

Отсутствие посева микроорганизмов может быть связано с переходом бактерий в L-формы и протопласты, а также не исключен прием антибиотиков до поступления в стационар. Если при острых процессах выявление бактериурии является правилом, то при хронических инфекциях мочевыводящих путей в связи с низкой контаминацией мочи микроорганизмами необходимы повторные исследования для выявления инфекционного фактора воспалительного процесса. Как правило, неосложненные острые инфекции мочевыводящих путей вызываются одним микроорганизмом. Определение в образцах нескольких видов бактерий объясняется нарушением техники сбора и транспортировки материала. А вот при хронических урологических заболеваниях возможны микробные ассоциации. Согласно литературным данным, при исследовании микробного пейзажа, наиболее частыми возбудителями уроинфекций являются энтеробактерии и главным образом *E. coli* (в 70-95%). Главным патогенетическим механизмом ИМВП является адгезия *E.coli* к клеткам эпителия, выстилающего мочевыводящие пути.

Из 478 выделенных из мочи культур энтеробактерий, наиболее часто встречались следующие виды: *E. coli* - 353 (73,8%) штамма,

Klebsiella – 48 (10,0%), *Enterobacter* – 42 (8,8%), *Proteus* – 35 (7,4%). Из неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб) преобладали штаммы *Pseudomonas aeruginosa* – 51 (83,6%), остальные культуры относились к родам *Acinetobacter*, *Alcaligenes*. Этиологически значимые стафилококки были отнесены к виду *Staphylococcus epidermidis* (45,1%), *Staphylococcus aureus* (37,3%), *Staphylococcus saprophiticus* (17,6%). Из стрептококков встречались *Enterococcus faecalis* – 75,7%, *Streptococcus pyogenes* – 24,3%. По данным литературы роль грамположительных кокков спорна, эти микроорганизмы не обладают патогенными для мочевыводящих путей свойствами, редко вызывают бактериурию и, таким образом являются причиной воспаления в небольшом числе случаев.

По данным Лопаткина Н.А., Деревянко И.И. при хронических урологических заболеваниях у 30–35% больных наблюдается низкая степень бактериурии, а также микробные ассоциации. Это отмечается и в наших исследованиях: у третьей части обследованных были выделены микробные ассоциации: *E. coli* + *St. saprophiticus* в 28,4% образцах, *Klebsiella* + *St. epidermidis* – в 24,2%, *Enterobacter* + *Enterococcus* – в 18,7%, *E. coli* + *Candida* – в 16,8%, *E. coli* + *Enterococcus* – в 11,9%.

В настоящее время в урологии широко используются антибактериальные препараты с лечебной и профилактической целью. При этом, однако, часто не учитывается чувствительность основных представителей естественной микрофлоры кишечника к данному препарату. Поэтому во многих случаях назначение урологическим больным антибиотиков приводит к возникновению дисбактериоза кишечника, сопровождающегося транслокацией условно-патогенных бактерий из кишечника в мочеполовую систему и развитием реинфекции. Кроме того, в урологической практике существует высокий риск инфицирования при проведении трансуретральных эндоскопических операций. Основным условием для успешного лечения больных является чувствительность микробной флоры к антибактериальному препарату, отсутствие его нефротоксичности.

Проведенное изучение чувствительности возбудителей уроинфекций к антибиотикам показало, что ни один из применяемых антибиотиков не был эффективен в 100%. Распространенность уропатогенных штаммов *E. coli*, устойчивых к ампициллину и ко-тримоксазолу, является весьма высокой и составляет 30 и 18% соответственно. Фторхинолоны II поколения (ципрофлоксацин, норфлоксацин) являются наиболее активными препаратами в отношении штаммов *E. coli*, резистентность к ним составляет 2,6%. Чувствительность этого возбудителя к гентамицину и канамицину

составила 94% и 85% соответственно. Самая высокая резистентность *E. coli* выявлена к карбенициллину – 58%.

Синегнойная палочка была резистентна к ципрофлоксацину в 58%, в 64% – к гентамицину и амикацину, в 16% – к цефтазидиму, 15% – к меропенему, в 78% – к карбенициллину, в 26% – к пиперациллину.

Клебсиелла, выделенная от урологических больных, резистентна к гентамицину и амикацину в 33%, ципрофлоксацину и норфлоксацину в 21%, цефалексину в 28%. Полученные антибиотикограммы согласуются с заключениями ряда авторов. Несмотря на очевидные успехи антибактериальной терапии, проблема лечения больных с ИМВС является актуальной. Особенно быстрое развитие резистентности нозокомиальных штаммов микроорганизмов обуславливает трудности лечения тяжелых урологических инфекций. Для исключения возможности формирования резистентных штаммов важно избегать необоснованного назначения антибиотиков.

Таким образом, выявлено, что наибольшее этиологическое значение в возникновении ИМВП имеют грамотрицательные энтеробактерии (в 81,7% при острых и в 69,9% при хронических заболеваниях). Из энтеробактерий наиболее чаще выделялась *E. coli* в 73,8%, а реже всего *Proteus* – в 7,4%. Острые урологические инфекции связаны с высокой степенью бактериурии и выделением монокультуры. При хронических заболеваниях отмечалась низкая степень бактериурии и микробные ассоциации. Наиболее активными препаратами в отношении выделенных штаммов являются фторхинолоны II поколения (ципрофлоксацин, норфлоксацин).

МИКРОБНАЯ РИБОНУКЛЕАЗА ЗАЩИЩАЕТ *IN VITRO* КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА ОТ ВИРУСА ГРИППА А/Н1N1

Р. Шах Махмуд, В.В. Ульянова, О.Н. Ильинская

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Рибонуклеаза грамположительных бактерий *Bacillus pumilus* (биназа) каталитически расщепляет РНК с образованием моно- и олигонуклеотид-3'-фосфатов. Фермент выделен в гомогенном состоянии, изучены и охарактеризованы его основные каталитические и биохимические свойства. Получены генно – инженерные штаммы *E. coli* – суперпродуценты по рибонуклеазе. На сегодняшний день биназа привлекает внимание ученых благодаря своей уникальной

биологической активности, направленной против РНК –содержащих патогенных вирусов. Установлено, что биназа подавляет репродукцию вирусов бешенства, ящура и разных типов сезонного гриппа, что приводит к снижению титра вирусов у зараженных животных. Таким образом, долготлетние исследования свидетельствуют о перспективности использования биназы в медицине в качестве противовирусного препарата. С целью создания первого противовирусного препарата на основе рибонуклеазы бактериального происхождения в качестве объекта исследования мы выбрали один из опаснейших вирусов - пандемический (свиной) вирус гриппа А/Н1N1. В работе решали следующие задачи: 1) установить цитотоксическую концентрацию биназы (CC_{95}), вызывающую гибель 5% клеток; 2) подобрать оптимальную концентрацию биназы, в которой она оказывает наиболее выраженное противовирусное действие.

В работе использовали клетки легких человека линии А549 и пандемический вирус “свиного гриппа” А/Hamburg/04/09 (H1N1), любезно предоставленные профессором С. Плешка, Гиссен, Германия. Установлено, что биназа в высокой концентрации является цитотоксичной по отношению к клеткам А549 при инкубации в течение 24 часов. CC_{95} фермента составила 132,4 мкг/мл. Активность фермента в концентрации 250 мкг/мл в культуральной среде клеток А549 через 48 часов снижалась на 14,8%. Это означает, что в течение двух суток биназа остается активной в культуре клеток.

Эксперимент по изучению противовирусного действия биназы проводили следующим образом: вирус пре–инкубировали с биназой, затем этой суспензией инфицировали клетки. Установлено, что биназа в концентрации 1–10 мкг/мл оказывает выраженное подавляющее действие на размножение вируса гриппа А как в одноцикловой, так и в многоцикловой инфекции. Установлено, что с увеличением концентрации биназы титр вируса в культуре клеток А549 при множественности 0.1 уменьшается обратно пропорционально. Отмечено, что после 30 минут пре–инкубации биназы с вирусом репродукция вируса подавлялась биназой в концентрации 1 мкг/мл больше, чем в концентрации 10^{-2} мкг/мл или 10 мкг/мл. Однако в случае пре-инкубации фермента с вирусом в течение часа вирус–подавляющее действие биназы было более выражено в концентрации 10 мкг/мл.

При изучении влияния биназы на многоцикловую инфекцию вируса установлена аналогичная тенденция, как и при одноцикловой инфекции. В отличие от предыдущих опытов при множественности 0.1 отмечено полное подавление репродукции вируса рибонуклеазой при пре-инкубации вируса с ферментом в течение получаса, что доказывает

высокую эффективность этого фермента против пандемического вируса гриппа H1N1.

Таким образом, установлено, что биназа в концентрации 1–10 мкг/мл, не являющейся токсичной по отношению к клеткам A549, проявляет противовирусное действие против пандемического вируса “свиного гриппа” A/Hamburg/04/09 (H1N1).

Авторы выражают глубокую признательность профессору Плешке С. и доценту Вершининой В.И. за предоставленные для работы материалы.

МИКРОФЛОРА ПОЛОСТИ РТА

Р.М. Суфиярова

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

Заболевания тканей пародонта и твердых тканей зубов очень тесно связаны с нарушением нормального микробиоценоза полости рта. Уникальность сложных многокомпонентных систем полости рта и механизмов их работы состоит в сложнейших постоянных взаимодействиях нескольких регуляторов. С одной стороны это воздействие организма на микробиоценоз, с другой – сложные взаимоотношения между бактериями внутри биоценоза. Кроме того, они находятся под многофакторным влиянием внешней среды. Сохранение здоровья полости рта представляется крайне важным, поскольку одновременно является началом и функциональным составляющим двух жизненно важных систем - пищеварительной и дыхательной.

Одним из наиболее информативных показателей состояния здоровья полости рта, как впрочем, и всего организма, является микрофлора, которая представлена здесь наибольшим количеством видов микроорганизмов. Обилие микроорганизмов, тем не менее, не означает их неподчинение общим законам функционирования экосистем в живой природе. Нарушение баланса в микробиоценозе, изменение его качественного и количественного состава приводит, как и в других полостях организма человека, к возникновению и развитию воспалительных заболеваний. Многофакторность причин нарушения микробиоценотических взаимосвязей, в результате которых происходит размножение патогенных культур микроорганизмов и возникновение патологии, побуждает к использованию комплексного подхода к лечению и профилактике воспалительных заболеваний пародонта.

Видовой состав микрофлоры полости рта в норме довольно постоянен, однако количество микроорганизмов значительно изменяется в зависимости от слюноотделения, консистенции и характера пищи, а также от гигиенического содержания полости рта, состояния тканей и органов полости рта и наличия соматических заболеваний.

Расстройства слюноотделения, жевания и глотания всегда приводят к нарастанию количества микроорганизмов в полости рта. Тот же эффект наблюдается при различных аномалиях и дефектах, затрудняющих вымывание микроорганизмов током слюны (кариозные поражения, пародонтальные карманы, плохо пригнанные зубные несъемные протезы и др.).

Микрофлора полости рта крайне разнообразна и включает бактерии, актиномицеты, грибы, простейшие, спирохеты, риккетсии, вирусы. При этом надо отметить, что значительную часть микроорганизмов полости рта взрослых людей составляют анаэробные виды.

Самую большую группу постоянно обитающих в полости рта бактерий представляют кокки – 85–90 % от всех видов. Они обладают значительной биохимической активностью, разлагают углеводы, расщепляют белки с образованием сероводорода. Стрептококки являются основными обитателями полости рта: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*. Большинство из них – факультативные анаэробы, но встречаются и облигатные анаэробы (пептококки). Обладая значительной ферментативной активностью, стрептококки сбраживают углеводы по типу молочнокислого брожения с образованием значительного количества молочной и некоторых других органических кислот. Кислоты, продуцируемые стрептококками, подавляют рост некоторых гнилостных микроорганизмов, попадающих в полость рта из внешней среды.

В зубном налете и на деснах здоровых людей присутствуют также стафилококки – *St. epidermidi*, иногда *St. aureus*.

Палочковидные лактобактерии также постоянно вегетируют в определенном количестве в здоровой полости рта. Подобно стрептококкам они продуцируют молочную кислоту. В аэробных условиях лактобактерии размножаются значительно хуже, чем в анаэробных, так как выделяют пероксид водорода, но не каталазу. Образованная ими в процессе жизнедеятельности молочная кислота задерживает рост других микроорганизмов: стафилококков, кишечной, брюшнотифозной и дизентерийной палочек. Количество лактобактерий в полости рта при кариесе зубов значительно возрастает пропорционально величине кариозных поражений. Для оценки «активности» кариозного

процесса предложен «лактобацил-лентест» (определение количества лактобактерий).

Лептотрихии относятся также к семейству молочнокислых бактерий и являются возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения. Они имеют вид длинных нитей разной толщины с заостренными или вздутыми концами, их нити сегментируются, дают густые сплетения. Лептотрихии являются строгими анаэробами.

Актиномицеты почти всегда присутствуют в полости рта здорового человека. Внешне они сходны с нитевидными грибами: состоят из тонких ветвящихся нитей – гифов, которые, переплетаясь, образуют видимый глазом мицелий. Некоторые виды актиномицетов, так же как и грибы, могут размножаться спорами, но основной путь – простое деление, фрагментация нитей.

В полости рта здоровых людей в 40–50 % случаев встречаются дрожжеподобные грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. crusei*). Они имеют вид овальных или удлинённой формы клеток размером 7–10 мкм, часто с отпочковывающейся новой клеткой. Патогенные свойства наиболее выражены у *C. albicans*. Дрожжеподобные грибы, интенсивно размножаясь, могут вызвать кандидоз или местное поражение полости рта (у детей его называют молочницей). Заболевания эти носят эндогенный характер и возникают как результат неконтрольного самолечения антибиотиками широкого спектра действия. При этом рост нормальной бактериальной микрофлоры подавляется, а рост устойчивых к большинству антибиотиков дрожжеподобных грибов, наоборот, бурно усиливается.

Спирохеты заселяют ротовую полость с момента прорезывания временных зубов у ребенка и с того времени становятся постоянными ее обитателями. Спирохеты очень подвижны, совершают сгибательные, вращательные, прямолинейные и сократительные движения. Их легче всего обнаружить при микроскопии нативного препарата в темном поле. Спирохеты являются строгими анаэробами. Они усиленно размножаются в полости рта при значительном размножении других анаэробных микроорганизмов и вызывают патологические процессы в ассоциации с некоторыми штаммами фузобактерий, вибрионов. Много спирохет обнаруживается при язвенно-некротических поражениях слизистой оболочки (язвенный стоматит, ангина Венсана), в патологических десневых карманах при тяжелых формах пародонтита, в кариозных очагах и некротизированной пульпе.

У 50 % здоровых людей в полости рта могут вегетировать простейшие, а именно *Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas*. Они

локализуются преимущественно в зубном налете, криптах миндалин, в гнойном содержимом пародонтальных карманов, усиленно размножаясь при негигиеническом содержании полости рта. В очень большом количестве трихомонады обнаруживаются при гингивите и пародонтите.

Нормальная микрофлора полости рта достаточно устойчива к действию антибактериальных факторов ротовой жидкости. Вместе с тем она сама участвует в защите макроорганизма от микроорганизмов, поступающих извне. Антибактериальная активность слюны способствует сохранению динамического равновесия обитающих в полости рта микроорганизмов.

Таким образом, слюна не уничтожает микрофлору в полости рта, а обеспечивает ее количественное и качественное постоянство.

Важнейшим источником антибактериальной активности слюны служат мигрировавшие в полость рта лейкоциты. Попавшие на поверхность слизистой оболочки нейтрофильные лейкоциты сохраняют способность к фагоцитозу. Кроме того, в ротовой жидкости находятся антибактериальные вещества, продуцируемые Т- и В-лимфоцитами, которые мигрируют через лимфатическое глоточное кольцо.

Гуморальные и клеточные факторы антибактериальной защиты находятся в тесной взаимосвязи. Ряд компонентов слюны – фермент оксидаза, калликреин слюны и образующиеся при его участии кинины – обладает выраженной хемотаксической активностью, обеспечивая регуляцию миграции лейкоцитов в полости рта. Помимо хемотаксического действия кинины также способствуют миграции лейкоцитов путем повышения проницаемости сосудов тканей полости рта. Неспецифическую антибактериальную защиту полости рта обеспечивают секретируемые, преимущественно слюнными железами, и освобожденные мигрировавшими лейкоцитами ферменты: лизоцим, РНКаза, ДНКаза, пероксидаза. Следует указать на чрезвычайно широкий спектр антибактериальной активности этих ферментов, подавляющих рост бактерий, вирусов, грибов и простейших.

Ротовая жидкость обладает коагулирующими свойствами, что обусловлено наличием в ней ряда факторов коагулянтной и фибринолитической систем. Эти свойства играют важную роль в обеспечении местного гомеостаза, очищении полости рта, развитии воспалительных, регенеративных и других процессов.

В ротовой жидкости обнаружены также тромбопластин, и античный тканевому, антигепариновая субстанция, факторы, входящие в протромбиновый комплекс, фибриназа и др.

Развитие воспаления в тканях пародонта большинство исследователей объясняет влиянием "зубной бляшки" и последующей инвазией микробной флоры. Наличие более 300-500 видов

микроорганизмов в полости рта, возможность их сочетанного действия и изменчивость состава представляет значительные трудности при оценке роли бактерий как этиологического и патогенетического факторов в развитии заболеваний пародонта.

Основная масса микроорганизмов не только не вредит тканям пародонта, но и помогает поддерживать их в нормальном состоянии. Они заполняют определенную экологическую нишу, препятствуют проникновению патогенов, благодаря постоянной конкурентной борьбе за факторы роста.

Многие микроорганизмы, встречающиеся при пародонтите, продуцируют мощные некротизирующие экзотоксины и ферменты, такие, как коллагеназа, эластаза, фибринолизин, гиалуронидаза и пр., оказывающие разрушающее действие на ткани пародонта.

Бактероиды выделяют летучие серные соединения, которые увеличивают проницаемость слизистой полости рта. Многие виды бактериоидов способны продуцировать ферменты, инактивирующие антибиотики – β -лактамазу, цефалоспориназу и пенициллиназу. Штаммы АА, выделенные из ротовой полости, продуцируют токсин, индуцирующий костную резорбцию.

Из чего можно предположить, что возникновение, степень тяжести, а также интенсивность развития воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта напрямую зависят от качественного и количественного состава микрофлоры полости рта.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУV-ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА В

В.Б. Сбойчаков, С.В. Борисенко, А.М. Сокурова.

Военно-медицинская академия имени
С.М. Кирова, Санкт-Петербург
Санкт-Петербургская государственная медицинская
педиатрическая академия
Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток

АУV-технологии (технологии с использованием желточных антител птиц) довольно успешно развиваются. В 1996 г. Европейский центр по оценке альтернативных методов (ECVAM) рекомендовал использование IgY (желточные иммуноглобулины птиц, от англ. yolk – желток) вместо иммуноглобулинов млекопитающих в качестве альтернативных методов иммунодиагностики.

Желточные иммуноглобулины птиц – Ig Y являются аналогами Ig G млекопитающих и состоят из Fab– и Fc–фрагментов, H-цепей (молекулярный вес ~ 65 кДа) и L-цепей (молекулярный вес ~ 30 кДа). Особенностью этих иммуноглобулинов является повышенное содержание углеводов. Период полураспада Ig Y в среднем составляет четверо суток, при этом наблюдается высокая скорость их синтеза в организме птицы.

Несмотря на принципиальное сходство этих двух антител, IgY обладает рядом преимуществ, особенно ценных для использования в диагностических целях (в качестве иммунных реагентов):

- высокая иммунореактивность по отношению к чужеродным белкам как инфекционного происхождения (вирусных, бактериальных, паразитарных), так и к белкам токсинов;
- низкая перекрестная реактивность с белками млекопитающих за счет далекого филогенетического родства между птицами и млекопитающими: неспособность IgY активировать систему комплемента млекопитающих, связываться с ревматоидным фактором, Fc-рецепторами, что обеспечивает высокую специфичность диагностических тестов;
- довольно высокий уровень содержания IgY в желтке, то есть возможность получения IgY в высоких количествах – из одного яйца можно получить 50–100 мг IgY, что соответствует количеству IgG, полученному из сыворотки 50 – 100 мышей;
- экономическая рентабельность и легкость процедуры иммунизации птиц, а также принципиальная простота получения препаратов IgY из яичного желтка;
- гуманность самой процедуры иммунизации, отсутствует необходимость тотального обескровливания животных-продуцентов.

Целью настоящего исследования было получение иммуноглобулинов из желтков яиц иммунизированных перепелов (*Coturnix japonica*) и разработка на их основе тест–системы для индикации HBsAg, основного маркера вируса гепатита В.

В условиях вивария содержалось 26 самок перепелов породы «Фараон», каждая массой 100–140 г. Самки перепелов были получены из ОАО «Перепелочка» (Ленинградская область) в возрасте 20 суток. Предварительно экспериментальное птицепоголовье для определения эпизоотического (эпидемического) статуса было проверено на 12 инфекций. Положительно реагирующих птиц в ходе серологического обследования не выявлено. Это дало нам основание утверждать, что экспериментальное птицепоголовье можно отнести к категории SPF, что является необходимым и основным условием при получении

лекарственных средств на основе иммуноглобулинов животных-доноров. Вышеперечисленные технологические положения производства лекарственных средств соответствуют требованиям GMP.

Полученное птицепоголовье находилось в условиях опыта 86 суток.

В процессе выполнения исследований были созданы две экспериментальных группы: опытная, в которой проводилась иммунизация птиц HBsAg, сорбированным на гидроокиси алюминия и заключенным в обратную эмульсию «вода–масло», и контрольная. Опытная группа была предназначена для получения специфических желточных иммуноглобулинов к HBsAg вируса гепатита В. Контрольная группа предназначалась для определения влияния условий содержания и кормления на здоровье перепелов и их яичную продуктивность.

Для приготовления препаратов для иммунизации перепелов использовали рекомбинантную вакцину против вируса гепатита В фирмы «Энджерикс В» (Бельгия), содержащую поверхностный антиген вируса гепатита В (HBs Ag) в концентрации 20 мкг/мл, сорбированный на гидроокиси алюминия. Антиген вводили однократно в верхнюю треть дорсальной поверхности шеи по 200 мкг на инъекцию для каждого животного в возрасте 20 сут. в непосредственной близости от тимуса, не травмируя его.

По истечении 30 сут производили пробный забор проб крови для определения титра специфических антител к HBsAg вируса гепатита В. Титр антител оказался достаточным и составлял 1:8000 в тИФА, что соответствовало уровню антител в сыворотке крови перепелов. После получения результатов определения уровня антител к HBsAg в сыворотке крови, начали производить сбор перепелиного яйца. Сбор яйца начали производить по достижении птицей возраста в 50 сут. При этом ежедневный сбор яйца в пересчете на одну несушку составил около 0,75 яйца. Концентрация иммуноглобулинов в желтках перепелиных яиц составила 10–12 мг/мл. При перерасчете на одну несушку количество антител, выделенных из желтков перепелиных яиц, за месяц составило 270 мг. Каждые 30 сут проводили серологические исследования экспериментального птицепоголовья на соответствие статусу SPF. В течение всего опыта положительно реагирующих на возбудителей заболеваний, регламентируемых статусом SPF, не выявлено.

Суммарный объем желточной массы перепелиных яиц за весь период опыта полученной от птиц опытной группы, составил 655,2 мл. Масса желточных иммуноглобулинов составила 6,5 г. В процессе проведения опыта клинически больной и павшей птицы не

зарегистрировано. Нарушений в физиологическом процессе яйцекладки не обнаружено.

Титры специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови и желтках яиц в группе перепелов, иммунизированных HBsAg, сорбированным на гидроокиси алюминия, составили 1:8400 в сыворотке крови и 1:8100 – в желтках яиц. В группе перепелов, иммунизированных HBsAg, сорбированным на гидроокиси алюминия, титры составили 1:5400 и 1:5100 соответственно. Использование для иммунизации HBsAg, сорбированного на гидроокиси алюминия и введённого в обратную эмульсию «вода-масло», позволяет получать более высокие титры специфических антител по сравнению с иммунизацией HBsAg, сорбированным на гидроокиси алюминия.

С целью изучения диагностической ценности тест-системы определяли ее чувствительность, специфичность, прогнозируемое положительное и отрицательное значения и диагностическую эффективность.

Были сформированы опытная и контрольная группы исследуемых сывороток. В опытную группу вошли 35 сывороток больных, у которых был выявлен HBsAg, в контрольную – 32 сыворотки, где HBsAg выявлен не был. Сыворотки крови контрольной группы принадлежали больным с другими видами патологии.

Чувствительность разработанной тест-системы составила 91,4%, специфичность 87,5%. В целом, эффективность тест-системы для выявления HBsAg составила 89,6%.

Таким образом, тест-система обладает высокой чувствительностью, специфичностью, достоверностью и эффективностью. Основным лимитирующим фактором внешней среды, влияющим на динамику яйцекладки перепелов, а соответственно и количество получаемых иммуноглобулинов, является долгота дня.

Разработанная схема получения и выделения специфических диагностических иммуноглобулинов для индикации HBsAg из желтков яиц иммунизированных перепелов является эффективной и экономически рентабельной, так как содержание перепелов в десятки раз менее затратно, чем содержание лабораторных животных-млекопитающих.

ОТБОР ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ, НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОБИОТИКОТЕРАПИИ

Н.Л. Бруслик, Д.Р. Яруллина, С.А. Коннова, О.Н. Ильинская

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Лактобациллы являются основными представителями резидентной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Отмечено их положительное влияние на макроорганизм: обеспечение колонизационной резистентности по отношению к патогенным бактериям, иммуностимулирующие, противоопухолевое действие, понижение уровня холестерина в крови. Благодаря своим свойствам лактобациллы нашли широкое применение в пробиотикотерапии. Однако, вследствие элиминации бактериальных клеток из кишечника, использование пробиотических препаратов не всегда эффективно. Поэтому скрининг адгезивных свойств лактобацилл является необходимым условием при отборе штаммов, наиболее подходящих для использования в качестве пробиотиков. В данной работе проведен анализ гидрофобности, кислотно-основных свойств и заряда клеточной поверхности лактобацилл, как факторов, оказывающих влияние на их способность к адгезии.

Объектами исследования служили 19 штаммов лактобацилл, выделенных из кисломолочных продуктов и пробиотических препаратов. Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* проводили согласно ГОСТ 10444.11-89: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию спорообразования и каталазы. Для оценки адгезивных свойств лактобацилл использовали метод адгезии клеток на углеводородных носителях: степень гидрофобности клеток определяли по адгезии на неполярном углеводороде *n*-гексадекане, вклад кислотно-основных свойств оценивался по адгезии на монополярном кислотом углеводороде хлороформе. Измерение заряда клеточной поверхности проводили методом микроэлектрофореза на анализаторе MalvernZetasizerNano.

Для 11 из 19 исследованных штаммов (58%) была характерна низкая степень адгезии на *n*-гексадекане, для 2 штаммов (10%) – средняя и для 6 штаммов (32%) – высокая. Уровень адгезии на хлороформе был высоким для 13 штаммов (68%), для 4 штаммов (22%) – средним и у 2 (10%) – пониженным. Заряд клеточной поверхности у всех штаммов был отрицательным, максимальное значение составило -30 mV. Среди исследованных штаммов величина ζ -потенциала распределилась

следующим образом: высокие значения (-30 mV – -21 mV) наблюдались у 5 штаммов (26%), средние (-20 mV – -11 mV) – у 2 штаммов (10%), и низкие значения (-10 mV – 0 mV) обнаружены у 12 штаммов (64%). Поскольку поверхность эпителиоцитов заряжена отрицательно, отрицательный ζ -потенциал бактериальных клеток за счёт сил отталкивания снижает их адгезию на стенках кишечника. Таким образом, для более адгезивных штаммов лактобацилл свойственны низкие значения ζ -потенциала.

Полученные результаты позволили выделить пять штаммов лактобацилл, которые являются наиболее перспективными для использования в пробиотикотерапии по всем исследованным параметрам, то есть обладают высокой степенью адгезии на н-гексадекане и хлороформе, но характеризуются низкими значениями ζ -потенциала. Для 8 штаммов было характерно сочетание двух показателей, соответствующих наиболее высокой адгезивной способности, при этом третий показатель отвечал или за низкую, или за среднюю способность клеток к адгезии. У остальных штаммов ни один из параметров по своей величине не входил в интервал высокой адгезивности, измеренные показатели соответствовали либо средней, либо низкой способности клеток к адгезии, образуя между собой различные комбинации.

Данные исследования свидетельствуют о наличии высокой вариабельности степени выраженности неспецифических факторов адгезии среди исследованных штаммов лактобацилл. Причиной таких различий может служить разное соотношение компонентов в составе клеточной стенки лактобацилл. В исследованиях было продемонстрировано, что белки S-слоя отвечают за уровень гидрофобности бактериальных клеток. Степень проявления основных свойств клеточной поверхностью зависит от присутствия в её структуре карбоксильных групп. Тейхоевые кислоты за счёт наличия свободных гидроксильных групп фосфорной кислоты обуславливают отрицательный заряд клеточной поверхности грамположительных бактерий. Таким образом, адгезивность клеток является суммарным показателем, который определяется влиянием различных факторов. Отсутствие выраженной корреляции между исследованными параметрами у разных штаммов лактобацилл свидетельствует о целесообразности их комплексного определения при проведении отбора пробиотических штаммов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

ОЦЕНКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, КОЛОНИЗИРУЮЩИХ РАЗЛИЧНЫЕ БИОТОПЫ ЧЕЛОВЕКА.

Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, А.А. Шарифуллина, Р.С. Фассахов

ФБУН «Казанский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии»
Роспотребнадзора г. Казань

Рост устойчивости *Staphylococcus aureus* к антимикробным препаратам (АМП) является серьезной проблемой последних лет. Инфекции, вызванные антибиотикостойчивыми штаммами, отличаются длительным течением, чаще требуют госпитализации, ухудшают прогноз для пациента. Распространение нозокомиальных патогенов за пределы стационара, и, как следствие, приобретение внебольничными штаммами детерминант резистентности, осложняют эпидемическую ситуацию.

Цель исследования – оценка распространенности метициллинрезистентных штаммов и антибиотикочувствительности штаммов *Staphylococcus aureus*, колонизирующих носоглотку, кожные покровы и инфицированные раны.

Материалы и методы. Проведено изучение спектра чувствительности к антимикробным препаратам (АМП) 205 клинических изолятов *S. aureus*. Забор биоматериала производился из носоглотки и кожных покровов 78 пациентов, проходивших лечение и обследование в условиях специализированной поликлиники ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора; и из раневого отделяемого инфицированных ран у 27 пациентов многопрофильных стационаров г. Казани. Идентификацию *S. aureus* осуществляли по морфологическим, биохимическим методам в соответствии с нормативными документами. Изучение у клинических изолятов *S. aureus* метициллин (оксациллин) резистентности и тестирование чувствительности к АМП определяли согласно МУК 4.2.1890 – 04. "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам".

Результаты. Установлено, что в носоглотке амбулаторных пациентов количество метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus* (MRSA) составило 14,2%; встречаемость MRSA в микробиоценозе кожи – 22,0%. Значительно чаще высевались MRSA в раневом отделяемом у стационарных больных – 56,0 %.

Анализ антибиотикочувствительности штаммов золотистого стафилококка, выделенных из носоглотки, выявил, что

метициллинчувствительные изоляты характеризуются более высоким уровнем чувствительности к АМП. Так, к азитромицину были чувствительны 79,1%; к ципрофлоксацину – 81,3%, к цефтриаксону – 96,6%, гентамицину – 82,8%, клиндамицину – 76,8% исследованных штаммов. В отношении метициллинрезистентных стафилококков проявляли активность ципрофлоксацин, азитромицин, гентамицин.

Изоляты *S. aureus*, контаминирующие кожные покровы и оказавшиеся оксациллин (метициллин) чувствительными по результатам скрининга резистентности к оксациллину 1 мкг, характеризовались низкой резистентностью к АМП. К азитромицину были чувствительны 72,8%, ципрофлоксацину – 78,3%, к цефтриаксону – 92,8%, гентамицину – 85,8%, клиндамицину – 73,2% изолятов. MRSA штаммы были чувствительны к азитромицину (68,4%); фторхинолонам (67,2%), гентамицину (81,0%).

Штаммы золотистого стафилококка, контаминирующие инфицированные раны пациентов, находящихся на стационарном лечении, обладали более низким уровнем чувствительности к АМП по сравнению со стафилококками, высеянными из носоглотки и кожи амбулаторных больных. Выявлено, что в популяции MRSA штаммов частота встречаемости полирезистентных стафилококков была выше. Так, доля штаммов, устойчивых к 3 видам АМП, составила – 15,5%; к 4 видам АМП – 12,1%; к 5 видам АМП – 5,8% штаммов. Культуры *S. aureus*, высеянные из инфицированных ран, как метициллинчувствительные, так и метициллинрезистентные, обладали более высоким уровнем устойчивости к АМП. Так, к азитромицину были устойчивы 39,1%, ципрофлоксацину – 31,1%, к цефтриаксону – 28,9%, гентамицину – 22,1%, клиндамицину – 32,3% метициллинчувствительных штаммов. В отношении MRSA штаммов сохраняли активность фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды. Все исследованные штаммы стафилококков были ванкомицинчувствительными.

Заключение. Колонизация носоглотки и кожных покровов амбулаторных пациентов метициллинрезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* является незначительной и составляет 14,2 – 22,0%. Высеваемость MRSA штаммов из раневого отделяемого у стационарных больных отмечена в 56% случаев. Для выбора оптимального антистафилококкового средства определяющее значение имеет скрининг метициллин (оксациллин) резистентности стафилококков. Эти факты свидетельствуют о необходимости контроля, за частотой распространенности антибиотикорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* в микробиоценозе биотопов человека.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО– ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ СЕРОЗНЫМ МЕНИНГИТОМ

*А.В. Устюжанин, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев, И.К. Бессергенева,
В.К. Слободенюк, А.В. Слободенюк, Т.Э. Снитковская.*

ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России,
ФГУН ЕНИИВИ Роспотребнадзора,
ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области,
Центральный Екатеринбургский отдел Управления
Роспотребнадзора по Свердловской области, г. Екатеринбург

Энтеровирусы человека (семейство *Picornaviridae*, род *Enterovirus*) включают в себя более ста серотипов. Согласно современной классификации, основанной на молекулярно-генетических характеристиках, энтеровирусы человека подразделены на четыре вида: вид А (вирусы Коксаки А2–8, –10, –12, –14, –16, энтеровирусы 71, 76, 89–92 серотипов), вид В (вирусы Коксаки А9, В1–6, все вирусы ЕСНО, энтеровирусы 69, 73–75, 77–88, –95, –97, 100–101 серотипов), вид С (полиовирусы, вирусы Коксаки А1, –11, –13, –15, 17–22, –24, энтеровирус 96 серотипа) и вид D (энтеровирусы 68, 70 и 94 серотипов) НепOLIомиелитные энтеровирусные инфекции (ЭВИ) характеризуются многообразием клинических проявлений. В большинстве случаев они протекают бессимптомно или в лёгкой форме, сопровождаясь лихорадочным состоянием и/или кишечным расстройством, однако возможны и тяжелые формы заболевания, такие как серозный менингит, менингоэнцефалит, миокардит, острый вялый парез, острый геморрагический конъюнктивит, энтеровирусный увеит и другие.

Наиболее часто диагностируемой формой энтеровирусной инфекции является серозный менингит. За последние 10 лет в г. Екатеринбурге ежегодно регистрировались сезонные подъемы заболеваемости серозным менингитом с уровнем заболеваемости от 4,5 до 35,9 на 100 тысяч населения. С 2008 по 2011 наблюдалось ежегодное снижение заболеваемости с 35,9 до 4,5 случаев на 100 тысяч населения. В 2012 г. зарегистрирован рост заболеваемости в 3 раза, по сравнению с предыдущим годом.

В анализируемый период на территории Свердловской области было зарегистрировано 2 крупные вспышки ЭВИ. В 2006 году в

Алапаевске показатель заболеваемости на 100 тысяч населения составил 203, в 2005 году в Североуральске – 110.

В связи с тем, что неполиомиелитные энтеровирусы относятся к числу возбудителей неуправляемых инфекций, вопросы разработки методов прогнозирования уровня заболеваемости и профилактики эпидемических вспышек среди населения остаются актуальными.

Одним из подходов к решению задачи прогнозирования эпидемиологической ситуации по неполиомиелитным вирусным инфекциям является мониторинг интенсивности циркуляции энтеровирусов среди здорового населения. Индикаторную группу составляют дети в возрасте 3–6 лет, у которых частота носительства энтеровирусов в межэпидемический период по данным разных авторов колеблется в пределах 5–10%. Однако, ввиду чрезвычайно широкого спектра различий по степени вирулентности не только отдельных серотипов, но даже штаммов одного и того же серотипа энтеровирусов, информация о частоте носительства и типовом составе циркулирующих вирусов требует дополнительных сведений о происхождении и генетическом родстве выделенных вирусов.

В последние годы все более широкое применение в практике диагностических исследований находит метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который способен выявить минимальные концентрации вирусной РНК в исследуемом материале, а в комбинации с методом секвенирования нуклеотидных последовательностей позволяет не только идентифицировать энтеровирус, но и определить его происхождение и степень генетического родства со штаммами, ранее выделенными на разных территориях.

Таким образом, мониторинг циркуляции энтеровирусов среди детского населения с использованием генетического анализа открывает перспективу прогнозирования заболеваемости серозным менингитом.

Предлагаемый нами метод оценки степени вирулентности и эпидемиологической значимости энтеровирусов основан на сравнительном анализе интенсивности циркуляции штаммов неполиомиелитных энтеровирусов среди детского населения и частотой встречаемости генетически родственных штаммов в качестве этиологических агентов заболевания серозным менингитом.

Целью настоящего исследования явилась оценка эпидемической значимости циркулирующих на территории г. Екатеринбурга штаммов неполиомиелитных энтеровирусов как вероятных этиологических агентов серозного менингита в летне-осеннем периоде 2013 г. с

использованием современных высокотехнологичных методов молекулярно–генетического анализа.

Материалы и методы исследования.

Исследовано 1007 проб фекалий, собранных в январе–декабре 2010-2012 г.г. от клинически здоровых детей в возрасте 3–6 лет, проживающих на территории г. Екатеринбурга, и 82 пробы ликвора от больных, госпитализированных в 2012 г. с диагнозом: «Серозный менингит».

Выделение вирусной РНК с последующей обратной транскрипцией и амплификацией к ДНК проводили с помощью ПЦР.

Для идентификации обнаруженных энтеровирусов секвенировали участок генома, включающий часть 5'– нетранслируемой области, всю последовательность белка VP4 и начальную часть последовательности белка VP2 (всего 658 оснований).

Секвенирование ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems, США). Выравнивание последовательностей нуклеотидов и аминокислот, а также филогенетический и молекулярно–эволюционный анализ и статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 3.1.

Результаты исследования.

Установлено, что частота носительства неполиомиелитных энтеровирусов среди практически здоровых детей г. Екатеринбурга в 2012 г. существенно не отличалась от показателей двух предыдущих лет и составляла, в среднем, 11,1%.

Следует отметить, что трехкратное повышение уровня заболеваемости серозным менингитом в 2012 г., по сравнению с 2011 г., не сопровождалось увеличением частоты носительства энтеровирусов у здоровых детей.

Всего с марта по ноябрь 2012 г. от 540 практически здоровых детей было выделено 62 штамма, принадлежащих к 8 серотипам энтеровирусов, среди которых доминировал вирус ЕСНО 6 (47%). Носительство остальных серотипов энтеровирусов отмечено в единичных случаях.

В исследуемый период наблюдалось изменение пейзажа циркулирующих штаммов. Только 4 из 14 выявленных серотипов НПЭВ удалось обнаружить в течение двух лет подряд (Коксаки А 1, 5, 9, и ЕСНО 6).

Генетический анализ позволил определить происхождение штаммов, обнаруженных у здоровых детей. Оказалось, что наряду с местными штаммами, в течение последних 3–х лет в циркуляцию включились энтеровирусы, имеющие, в основном, восточно-азиатское происхождение.

От 82 больных серозным менингитом было выделено и типировано 66 штаммов энтеровирусов, большинство из которых составили вирусы ЕСНО (60,6%). Доминирующими серотипами оказались вирусы ЕСНО 6 (33%) и Коксаки А9 (21,2%). Четыре серотипа энтеровирусов (Коксаки А9, Коксаки В3, ЕСНО 6, ЕСНО 18) были выделены как от больных серозным менингитом, так и от здоровых лиц. Полученные данные свидетельствуют о том, что наибольшую эпидемическую значимость на территории г. Екатеринбурга в 2012 г. имели вирусы ЕСНО 6 и Коксаки А9.

Генетический анализ показал, что все изоляты вируса ЕСНО 6, выделенные в 2012 г. имеют общее происхождение со штаммами, которые встречались на территории г. Екатеринбурга в качестве этиологических агентов серозного менингита в 2005–2011г.г., а также с вариантами, вызвавшими крупные эпидемические вспышки серозного менингита в 2005-2006 г.г. в г. Североуральске и Алапаевском районе Свердловской области.

Второй по эпидемической значимости вирус – Коксаки А9, впервые был обнаружен у больных серозным менингитом из Екатеринбурга в 2005 г., а затем в 2008 и 2009г.г. Генетический анализ штаммов, выделенных в 2012 г. показал их общее происхождение с обнаруженными ранее.

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие **выводы:** Среди детского населения г. Екатеринбурга в течение последних 3–х лет (срок наблюдения) имеет место циркуляция как местных, так и завозных (преимущественно восточно–азиатских) штаммов неполиомиелитных энтеровирусов. В 2012 г. наиболее активно циркулировал вирус ЕСНО 6 (47% выделенных штаммов).

Наибольшую эпидемическую значимость на территории г.Екатеринбурга в 2012 г. имели вирусы ЕСНО 6 и Коксаки А9, выделенные из ликвора больных серозным менингитом в 33% и 21,2% случаев, соответственно.

По данным генетического анализа штаммы вирусов ЕСНО 6 и Коксаки А9, выделенные в 2012 г. от больных и здоровых лиц, имели общее происхождение с вирусами, изолированными от больных серозным менингитом из г. Екатеринбурга и Свердловской области в

2005–2011 г.г., что свидетельствует о длительной циркуляции указанных вирусов на территории Свердловской области.

Учитывая волнообразный характер эпидемического процесса, в 2013 г. следует ожидать повышение уровня заболеваемости серозным менингитом среди населения г. Екатеринбурга в 1,5–2 раза, по сравнению с 2012 г. (23–30 на 100 тыс). Наиболее вероятными эпидемически значимыми этиологическими агентами серозного менингита являются вирусы ЕСНО 6 и Коксаки А9.

РАЗРАБОТКА ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС–ДИАГНОСТИКИ И ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ БОТУЛИЗМА МЕТОДОМ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

Т.Р. Мустафин, А.В. Иванов, Н.С. Садыков, Э.Н. Мустафина, Р.Х. Юсупов

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической
безопасности», г. Казань

Ботулизм – остропротекающая кормовая токсикоинфекция, вызываемая токсином анаэробного спорообразующего микроба *Clostridium botulinum*. Эпидемиология ботулизма исключительно специфична и не укладывается в классические представления об эпидемиологии инфекционных болезней. Источником заболевания может служить только больной человек или больное животное, представляющих серьезную угрозу для здоровья человека, птиц и животных. Тяжелая интоксикация возникает в результате употребления в пищу продуктов, содержащих токсины *Clostridium botulinum*, характеризующаяся преимущественно поражением центральной и вегетативной нервной системы. В настоящее время известно 7 типов возбудителя ботулизма (А, В, С, D, Е, F, G), которые отличаются между собой по антигенным свойствам вырабатываемых ими токсинов и некоторыми другими признаками. В природе ботулизм чаще встречается спорадически, когда факторами передачи *Clostridium botulinum* служат продукты питания, консервированные в домашних условиях или при не соблюдении технологии их приготовления в пищевой промышленности, а также корма. Возникновение заболевания у животных связано с поеданием чрезмерно утрамбованного сена, силоса, зерна, комбикорма, в которых клостридии в условиях анаэробноз, повышения температуры, влажности интенсивно размножаются и продуцируют один из сильнейших в природе токсинов. Причем, корма, содержащие токсин в

отдельных участках, не отличаются по физическим свойствам от остального фуража, чем и объясняется спорадичность отравления отдельных животных.

Высокая патогенность возбудителя ботулизма для человека и животных обуславливает необходимость изучения его действия на организм и разработку высокоэффективных методов диагностики и индикации. В настоящее время общепринятыми методами индикации бактериальных токсинов являются биопроба с последующей постановкой реакции нейтрализации со специфическими сыворотками.

Самое главное – моделирование на животных не всегда позволяет дать ответ, какой микробный токсин содержится в материале. Поэтому многими исследователями стали проводятся эксперименты на органном или же на клеточном и субклеточном уровнях.

При исследовании различных объектов внешней среды на наличие возбудителя ботулизма используются также иммуносерологические методы: реакция непрямой гемагглютинации, метод определения фагоцитарного показателя, люминесцентно–серологический метод и реакция агломерации ализариновых суспензионных агглютининов.

В микробиологической диагностике значительное распространение получил люминесцентный анализ с применением флуоресцирующих антител. Одно из главных преимуществ метода по сравнению с обычными серологическими реакциями состоит в том, что при применении этого метода значительно сокращается время, затрачиваемое на обнаружение микробов, и не требуется накопления большой массы антигена или выделения чистых культур. В связи с этим целью наших исследований было получение полиспецифической флуоресцирующей ботулинической сыворотки.

Для решения данной проблемы были поставлены следующие задачи:

- наработка экзотоксина типов А, В, С, Д, Е, F, G из штаммов *Clostridium botulinum* для гипериммунизации кроликов типами (А, В, С, Д) с целью получения полисывороток, а также ботулинического анатоксина и антигена для экспресс индикации возбудителя ботулизма и его токсина;
- получение полиспецифической флуоресцирующей ботулинической сыворотки из поливалентной сыворотки.

Материалы и методы. Для получения и наработки экзотоксина типов А, В, С, Д, Е, F, G были взяты музейные штаммы: А–98; 16–Я; „Prevot“; 165; 153; 5964; 1352, которые предварительно были пассажированы через организм морских свинок для получения токсина. Для этого животным вводили ботулиническую культуру,

внутрибрюшинно в концентрации 200 млн./мл в дозе 3 см³. У павших животных отбирали органы (тонкий, толстый отдел кишечника и др.) и растирали в ступке с добавлением физиологического раствора. Полученную гомогенную взвесь оставляли на 1,5–2 часа при комнатной температуре для экстрагирования, затем профильтровывали и высевали в питательную среду Хоттингера (рН 5,0 под вазелиновым маслом), а также в среду Китта–Тароцци с 1% глюкозой (рН 7,4 под вазелиновым маслом) для получения бактериальной массы. Посевы культивировали в термостате при температуре 26–35⁰С (в зависимости от штамма) в течение 8 суток для получения токсина.

В том и другом случае с поверхности сред удаляли вазелиновое масло, после этого культуральную жидкость, полученную со среды Хоттингера, центрифугировали при 6 тыс. об/мин в течение 20 минут, полученную надосадочную жидкость, содержащую токсин, использовали для получения ботулинического анатоксина. А со среды Китта–Тароцци чистые культуры получали путем центрифугирования при 6 тыс. об/мин в течение 20 минут – надосадочную жидкость удаляли, а сам осадок растворяли в физиологическом растворе, тем самым получали антиген.

При получении ботулинического анатоксина и ботулинического антигена из возбудителя к общему объему добавляли 0,35–0,55% формалина и выдерживали в термостате в течение 4 недель, периодически проверяя остаточную токсичность на белых мышах, на наличие роста возбудителя в среде Китт–Тароцци с 1% глюкозой и микроскопией мазков.

Для получения корпускулярных антигенов, культуру возбудителя ботулизма типов А, В, С, Д, Е, F, G высевали на МПА с 2% глюкозы и культивировали в анаэроостате при температуре 34⁰С в течение 3^х суток. После чего культуру смывали 0,85% изотоническим раствором NaCl. Инактивацию культур проводили двумя методами: радиационным и химическим (формалинизация).

Радиационный метод – заключается в воздействии гамма–лучей на бактериальную клетку с целью инактивации, при этом определена доза поглощения, которая составила 30 кГр.

Химический метод – заключается в инактивации бактериальной взвеси путем внесения в нее 40–го% формалина и культивирования в термостате в течение 4^х недель.

Для получения гипериммунной сыворотки использовали антигены (из 4^х культур *Clostridium botulinum* тип А – штамм А–98; тип В – 16–Я; тип С – № 91; тип Д – SHU), приготовленные тремя методами: 1) живая взвесь; 2) гамма – облученный; 3) инактивированный

формалином. Из живой и инактивированной культур, готовили 200 млн. нативную взвесь, которая состояла из смеси четырех (А, В, С, Д) типов, в соотношении 1:1:1:1, для гипериммунизации. В опыт было взято 3 группы кроликов, которых гипериммунизировали различными методами.

Результаты исследований. Интервал между введениями составлял 4 дня. За день до следующего введения у кроликов брали кровь, для определения титра ботулиновых антител в РНГА. После последнего введения взвеси, кровь брали на 3 день, тотальное обескровливание проводили на 7 день после последнего введения антигена. Титр антител в сыворотках крови кроликов, в 1 группе составил – 1: 64, 2 группе- 1:16, в 3 группе - 1: 16. Это говорит о том, что при трехкратном внутривенном введении (1 группа), а также однократном подкожном и двукратном – внутривенном введении (2 группа), по сравнению с 3 группой – титр сывороток крови выше на два разведения, поэтому в дальнейшей работе будет использоваться 1 схема гипериммунизации животных. Наиболее перспективным при получении полиспецифических сывороток является использование живых культур возбудителя, по сравнению с инактивированными формами возбудителя. При этом титр антител в сыворотке крови был на два разведения выше.

Определение специфичности полиспецифической сыворотки проводили на белых мышах, вводя им полученную сыворотку внутрибрюшинно по 1 см³, после чего мыши через трое суток были заражены 1 см³ внутрибрюшинно экзотоксинами *Clostridium botulinum* типов А, В, С, Д, Е, F, G. Наблюдение за мышами вели 10 суток. Белые мыши зараженные типом А, В, С, Д, Е, G– остались живы, а типом F– пала на 4 сутки.

Поливалентную сыворотку использовали для получения полиспецифической флуоресцирующей ботулинической сыворотки, по общепринятой методике в нашей модификации. Принцип метода МФА заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфические реакции с соответствующими антигенами. Этот комплекс благодаря присутствию в нем флуорохрома обнаруживается при люминесцентной микроскопии.

Активность и специфичность полученной полиспецифической флуоресцирующей ботулинической сыворотки изучали при люминесцентной микроскопии. Для этого готовили мазки из штаммов *Clostridium botulinum*, имеющих различные типы (А, В, С, D,E,F,G), а также мазки от других видов возбудителей: *Bacillus anthracis* штамм 55, *E. coli*, *Clostridium perfringens*. Мазки фиксировали метанолом и дальнейшее действие проводились по методике постановки МФА.

Результаты исследований показали высокую активность полиспецифической сыворотки. При люминесцентной микроскопии мазков *Clostridium botulinum* наблюдалось свечение микробных клеток со всеми типами А, В, С, D,E,F,G, при рабочем разведении сыворотки 1:128 в 4– креста и не вступала в перекрестную реакцию с гетерогенными культурами *Bacillus anthracis* штамма 55, *E. coli*, *Clostridium perfringens*.

Заключение. На основании проведенных исследований нами разработан метод гипериммунизации кроликов культурами возбудителя *Clostridium botulinum*, продуцирующих 4 типа токсина (А, В, С, Д) с целью получения поливалентной сыворотки и на ее основе получена полиспецифическая флуоресцирующая ботулиническая сыворотка для экспресс – индикации возбудителя в объектах внешней среды и патологическом материале.

РИБОНУКЛЕЗАНАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОФЛОРЫ КОЛОРЕКТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ И НЕМАГНИТИЗИРОВАННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРЯМОЙ КИШКИ.

А.М. Валеева, Пхуен Нга, А.В. Макеева, П.В. Зеленихин

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

В последние годы наблюдается всплеск интереса к возможным путям возникновения рака кишечника, ассоциированным с его микробиомом. При этом подчеркивается, что причиной малигнизации эпителия способны стать не только специфические патогены, как например *Helicobacter pylori*, но и обычные бактерии-комменсалы. Однако остается до конца неясным, как именно изменения в микробиоме кишечника связаны с возникновением колоректального рака и других злокачественных опухолей желудочно – кишечного тракта. Данный вопрос активно изучается с применением животных моделей, в частности мышей, однако интерполяция полученных результатов на человека закономерно затруднена. Полученные нами в ходе экспериментальной работы по проекту результаты расширяют базу знаний о составе микрофлоры нормального и малигнизированного эпителия кишечника человека, а также позволяют сделать некоторые выводы о связи ряда физиолого – биохимических показателей охарактеризованных микроорганизмов с развитием злокачественных новообразований в прямой кишке. В то время как большинство

исследователей в рамках данного вопроса обращают основное внимание на канцерогенез, опосредованный механизмами хронического воспаления, мы проанализировали различия в биохимических характеристиках изолятов микроорганизмов с нормальной и злокачественной ткани, в частности рибонуклеазной активности. Данный подход обоснован тем, что рибонуклеазы микроорганизмов обладают широким спектром биологических свойств, включая цитотоксические и регуляторные.

Были проанализированы биоптаты слизистой прямой кишки 10 пациентов, подвергнутых оперативному рассечению кишки. У всех 10 был подтвержден диагноз – рак прямой кишки. Из биоптатов были выделены 17 культивируемых изолятов микроорганизмов, проведен анализ их рибонуклеазной активности. Анализ микрофлоры биоптатов эпителия онкологических больных методами классической микробиологии позволил выделить доминирующие группы бактерий, характерные для области карциномы и прилежащей к ней зоны неповрежденного эпителия. Установлено, что для неповрежденного эпителия характерно преобладание грамотрицательных палочек (77,2%) и кокков (22,8%), в то время как малигнизированный эпителий был в основном обсеменен грамотрицательными палочками (87,5%).

Для непораженного эпителия характерно присутствие бактерий семейств *Lactobacillaceae* и *Enterobacteriaceae*, не обладающих антагонистической и гемолитической активностью, но способных продуцировать секретлируемые рибонуклеазы. Среди представителей семейства *Staphylococcaceae*, встречавшихся только на здоровом эпителии, преобладали гемолитики, не проявлявшие антагонистической активности по отношению к *Escherichia coli*. Доля бактерий с антагонистическими и гемолитическими свойствами семейства *Enterobacteriaceae* на малигнизированном эпителии была значительно выше, чем на неповрежденном.

Выявление основных физиолого – биохимических свойств бактерий внутри каждой доминантной группы показало, что встречаемость некоторых свойств у бактерий одной и той же группы различается в зависимости от области, из которой они выделены. В то же время рибонуклеазная активность, важная в конкурентной борьбе бактерий за колонизацию эпителия, варьировала внутри группы и была связана со степенью онкологического поражения колонизированного эпителия. После 8 часов культивирования 55% штаммов, характерных для поврежденного эпителия, и 12,5% штаммов, выделенных из условно здорового кишечника, проявляли экзорибонуклеазную активность, тогда как большинство бактерий со здорового эпителия проявляли ту же

активность только после 24 часов культивирования. Эндогенную активность проявили все исследуемые штаммы, при этом зона лизиса микрофлоры с магнетизированного эпителия имела больший размер по сравнению с неповреждённым.

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-31022 мол_а.

СОЗДАНИЕ НОВОЙ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ СИНТЕЗА НОВОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ *BACILLUS ALTITUDINIS*

*Е.В. Дудкина, А.К. Гальцова, В.В. Ульянова, Р. Шах Махмуд, В.И. Вершинина,
О.Н. Ильинская*

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет» г. Казань

Ежегодно в мире регистрируется порядка 6 миллионов новых случаев заболевания раком и эта цифра непрерывно растет. Смертность от онкологических заболеваний в мире занимает второе место после заболеваний сердечно – сосудистой системы.

На сегодняшний день основной задачей современной медицины является разработка новых альтернативных методов лечения рака, поскольку ныне используемые методы борьбы с онкологическими заболеваниями остаются малоэффективными.

Одним из новейших перспективных исследований в терапии рака, является поиск новых продуцентов рибонуклеаз и изучения механизма действия ферментов, обладающих избирательной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам.

Рибонуклеазы – ферменты класса гидролаз, играющие ключевую роль в метаболизме РНК. Внеклеточные микробные рибонуклеазы катализируют расщепление РНК по двухстадийному пути с образованием промежуточных продуктов олигонуклеотид–2', 3'–циклофосфатов. Рибонуклеазы, продуцируемые про– и эукариотами отличаются каталитическими, физико-химическими свойствами, а также структурой и субстратной специфичностью. Помимо своей основной функции, РНКазы участвуют в контроле экспрессии генов, росте и дифференцировке клеток, иммунной защите и индукции апоптоза.

Важнейшей характеристикой цитотоксичности ферментов этого класса является высокий уровень каталитической активности. Это осуществляется благодаря способности РНКаз избегать встреч с белковым ингибитором, блокирующим их каталитические свойства.

Именно каталитически активные формы биназы и барназы обладают гено- и нефротоксичностью.

Охарактеризована роль стабильности молекулы РНКазы как фактора, имеющего корреляцию с цитотоксичностью. Показано, что с увеличением стабильности и устойчивости к протеолизу возрастает цитотоксичность мутантной нетоксичной РНКазы А. Однако связи между стабильностью и цитотоксичностью бактериальных рибонуклеаз не обнаружено.

Другая важная для токсичности характеристика структуры РНКазы – степень олигомеризации молекулы. Так, для целевой доставки димер молекулы барназы объединяют с антителом 4D5.

Для осуществления цитотоксичности крайне важна катионность белка. Именно это свойство молекул биназы и барназы позволяет ферментам связываться на поверхности опухолевых клеток. Особая роль заряда молекулы в противоопухолевой активности РНКаз подтверждает перспективность использования катионных конструкций на основе рибонуклеаз в противоопухолевой терапии.

На сегодняшний день наиболее перспективными в противоопухолевой терапии являются онконаза (РНКазы ооцитов лягушки *Rana pipiens*), проходящая третью фазу клинических испытаний против мезотелиомы легких человека, панкреатическая РНКазы А крупного рогатого скота, гомологичная ей РНКазы 1 человека, а также микробные рибонуклеазы биназа – *Bacillus intermedius* и барназа – *Bacillus amyloliquefaciens*.

Изначально, в ходе исследования токсического действия РНКаз по отношению к различным линиям опухолевых клеток, особое внимание было уделено рибонуклеазам животного происхождения, ввиду отсутствия нежелательных иммунных реакций при возможном введении данных ферментов в организм человека, однако, было обнаружено, что наиболее перспективными в противоопухолевой терапии являются РНКазы микробного происхождения. Наиболее известным представителем, среди которых является рибонуклеаза *B. intermedius* – биназа.

Биназа – представляет собой глобулярный белок с молекулярной массой 12300 Да, состоящий из одной полипептидной цепи, образованной 109 аминокислотными остатками. Изoeлектрическая точка (pI) равна 9.5. Оптимум ферментативной реакции для гидролиза РНК составляет 37°C, pH 8.5. Биназа катализирует расщепление молекулы РНК преимущественно после пуриновых (гуанин) остатков с образованием 3'-моонуклеотидов и 3'-динуклеотидов в качестве конечного продукта. Функциональная активность биназы не зависит от

наличия кофакторов. Биназа обладает токсическим действием по отношению к раковым клеткам и различным видам вирусов: ящера, гриппа, вируса бешенства. В настоящее время биназу можно рассматривать как альтернативу стандартным химиотерапевтическим препаратам.

Дементьевым с соавторами обнаружена рибонуклеаза, продуцируемая микроорганизмом *B. altitudinis* имеющая высокую степень гомологии с биназой. Предварительный анализ физико-химических и каталитических свойств новой рибонуклеазы показал ее сходство с биназой. Существенно отличались лишь температура денатурации этих белков. Сравнение первичных структур биназы и новой рибонуклеазы выявило единственную аминокислотную замену.

Исходя из вышесказанного, изучение каталитических и физико – химических свойств данного белка, а также его возможное токсическое действие по отношению к раковым клеткам является перспективным исследованием с точки зрения медицинского применения.

В связи с этим, с целью получения рекомбинантного штамма, продуцирующего высокий уровень рибонуклеазы, где активность фермента находится под контролем индуцируемого промотора, была создана новая экспрессионная система на основе штамма *B. megaterium* 7a35.

Ген рибонуклеазы *B. altitudinis* амплифицировали с плазмиды pMZ58, сконструированной сотрудниками нашей лаборатории. Амплификацию гена РНКазы проводили с помощью ПЦР с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, несущих рестрикционные сайты HindIII и SphI. В качестве вектора использовали ДНК-вектор с индуцируемым Pspac – промотором, шаттл-вектор, способный реплицироваться как в клетках *E.coli*, так и в клетках *Bacillus*. Транскрипция клонированного гена РНКазы *B. altitudinis* индуцируется изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Вектор pDG148 и ПЦР-продукт рестрицировали эндонуклеазами HindIII и SphI. Вектор и ДНК – фрагмент лигировали. Лигазной смесью трансформировали штамм *E.coli* DH5α, клоны выращивали на среде с ампициллином (100мкг/мл). Анализ векторной конструкции проводили рестрикцией. Векторную конструкцию, выделенную из клонов *E.coli* DH5α гидролизовали рестриктазой SphI и рестриктазами HindIII и SphI. Электрофорез рестрицированных фрагментов показал наличие в составе векторной конструкции клонируемого гена.

Для получения штамма – продуцента новой рибонуклеазы *B. altitudinis* был выбран штамм *B. megaterium* 7a35, обладающий рядом преимуществ перед представителями вида *E. coli* и рода *Bacillus*. На

сегодняшний день *B. megaterium* широко используется в промышленности в качестве продуцента рекомбинантных белков. На его основе создано множество коммерческих экспрессионных систем, обеспечивающих сверх – экспрессию рекомбинантного белка. Клеточная стенка *B. megaterium* 7a35 не содержит в своем составе эндотоксинов, микроорганизм не синтезирует в среду щелочных протеаз, чужеродные плазмиды высокостабильны и не элиминируются. Перечисленные свойства штамма *B. megaterium* 7a35 облегчают выделение и очистку рекомбинантного белка, а также обеспечивают высокий выход белкового продукта. Для получения рекомбинантного штамма *B. megaterium* 7a35 трансформировали векторной конструкцией, содержащей клонированный ген. Трансформацию проводили с использованием модифицированных сред Спецайзена, клетки высевали на среду с канамицином (10мкг/мл). Клоны анализировали по наличию индукции РНКазной активности на среде с ИПТГ. РНКазную активность определяли на среде БФС с добавлением 0.5 мМ ИПТГ и без него, согласно стандартной методики по Джеффрису. Положительным контролем служила плаزمида рМЗ58, отрицательным – *B. megaterium* 7a35, не несущая плазмиды. Анализ клонов выявил трансформантов *B. megaterium* 7a35, у которых добавление ИПТГ в несколько раз увеличивало РНКазную активность, относительно контроля, что говорит об успешно проведенном клонировании, клонируемый ген находится под контролем Pspac промотора.

Создание экспрессионной системы на основе *B. megaterium* 7a35, где ген РНКазы находится под контролем Pspac–промотора, индуцируемого ИПТГ, позволит нам сократить время синтеза фермента с 20 часов до 3х часов и увеличить его выход в 5–7 раз, относительно природного продуцента, и тем самым облегчить выделение и очистку рекомбинантного белка.

Исследование биологической активности новой РНКазы *B. altitudinis* по отношению к опухолевым клеткам, а также изучение каталитических свойств белка является перспективным исследованием в терапии опухолевых заболеваний.

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ *CANDIDA ALBICANS* В МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЯХ С МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

С.А. Лисовская, Н.И. Глушко, Е.В.Халдеева

Казанский НИИ эпидемиологии и
микробиологии г. Казань

С каждым годом перечень грибов, способных вызывать заболевания у человека, постоянно пополняется. Помимо уже известных возбудителей микозов, все чаще в посевах, совместно с дерматомицетами и дрожжеподобными грибами, встречаются другие виды мицелиальных грибов.

Результаты культурального обследования пациентов, обратившихся в лабораторию микологии КНИИЭМ, показывают, что дрожжеподобные грибы являются одними из наиболее часто обнаруживаемых представителей микробиоценоза органов человека. Частота обнаружения грибов *C. albicans* в организме человека за период с 2010 по 2012 года составила, по данным наших исследований, около 78%. Среди основных возбудителей микозов наружных покровов грибок *C. albicans* встречался в посевах 57% случаях. Однако, в 46% случаях совместно с *C. albicans* выделялись и различные виды мицелиальных грибов (*Aspergillus niger*, *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*; *Rhizopus nigricans*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium tardum* и т.д.). Наиболее часто такая картина наблюдалась на фоне длительного поражения кожи. Как правило, больные, у которых обнаруживались смешанные микобиоты, страдали более глубокими и тяжелыми формами микозов. Известно, что в микробной ассоциации между разными видами складываются сложные взаимоотношения, в которых тесно переплетаются взаимные влияния участников ассоциаций друг на друга.

В связи с этим, целью исследований было изучение влияния микромицетов на основные факторы патогенности (адгезия и диморфизм) штаммов *C. albicans*. В работе использовали 60 штаммов *C. albicans*, выделенных от больных с клинически подтвержденным диагнозом кандидоз кожи, двух основных групп: выделенные в микст и моно-культурах.

Исследование адгезивных свойств штаммов двух групп выявило статистически достоверные отличия между группами. Адгезия штаммов *C. albicans*, выделенных из микст – биоценоза с мицелиальными грибами, превышала средний уровень адгезии штаммов из монокультур почти в два раза: $(15.6 \pm 0.12)\%$ и $(8.3 \pm 1.3)\%$ соответственно. В некоторых

случаях, уровень адгезии штаммов *C. albicans*, выделенных в микст – культурах, поднимался до 26.4%. Максимальный процент герминативных трубок отмечался у штаммов с высоким уровнем адгезии, выделенных в микст – культурах, уже через тридцать минут инкубации культуры клеток. В то время как штаммы другой группы герминативные трубки образовывали только после 2,5 часа инкубации, причем в десять раз менее активно, по сравнению с первой группой штаммов, или в единичном количестве.

Совместный рост грибов *C. albicans* и других видов мицелиальных грибов в культурах из патологического материала на среде Сабуро показало отсутствие антагонистических отношений между видами.

Исходя из этого, для исследования ингибирующего или стимулирующего влияния грибов микромицетов на патогенные свойства штаммов *C. albicans* были взяты экстракты мицелиальных грибов, наиболее часто встречаемых в микробиологических посевах из клинического материала.

Добавление экстрактов грибов *Asp. niger* и *P. chrysogenum* различных объемов в жидкую среду Сабуро, при культивировании штаммов *C. albicans*, выявило стимулирующее влияние экстрактов микромицетов в объеме 0.1, 0.25 мл не только на адгезивные свойства штаммов, но и на активацию формирования псевдомицелия клетками *C. albicans*.

Уровень адгезии у штаммов, выделенных в микст – культурах, после культивирования их с экстрактами, практически не изменялся, в отличие от другой группы. У штаммов, выделенных из монокультуры, средний уровень адгезии повысился с 9.5% до 19.6%.

После инкубации дрожжеподобных клеток с экстрактом *P. chrysogenum* в концентрации 0,1 мл в течение 1,5 часа клетки *C. albicans* начали активно образовывать трубки прорастания. Однако в ходе исследования двух основных групп штаммов отмечалась разница в активности формирования. Штаммы, выделенные из моно–культуры, образовывали трубки в 4 раза более активно (по скорости и по количеству трубок прорастания в 10 полях) по сравнению со штаммами, другой группы. Тем не менее, после совместной инкубации всех штаммов *C. albicans* с экстрактом в течение трех пассажей, все штаммы одинаково активно начали образовывать псевдомицелий.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о возможном синергизме *C. albicans* и мицелиальных грибов при грибковых инфекциях кожи. Увеличение уровня адгезии штаммов дрожжеподобных грибов *C. albicans* в микст – биоценозе может

привести к усилению патогенных свойств и, тем самым, влиять наотягощение течения заболевания и своеобразие его клинических проявлений.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ АДГЕЗИИ И АНТАГОНИЗМА БИФИДОФЛОРЫ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Ю.В. Захарова, Л.А. Леванова, А.А. Марковская

ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная
медицинская академия» Минздрава
Российской Федерации, г. Кемерово

Довольно часто оппортунистические инфекции являются признаком клинической манифестации синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) у ВИЧ-инфицированных. Традиционно их возникновение связывают с несостоятельностью иммунных факторов защиты. Однако совсем недавно была выдвинута новая теория развития оппортунистических инфекций при иммунодефицитах – «гипотеза нарушенной микрофлоры», согласно которой основным фактором, запускающим развитие таких осложнений, является нарушение нормальной микрофлоры – естественной защиты против микробов-оппортунистов. Действительно, нормальную микрофлору относят к факторам неспецифической защиты организма. Покрывая кожу и слизистые в виде биопленок, симбиотическая флора является первым барьером на пути патогенных или непатогенных чужеродных микроорганизмов. Лишь только после прорыва этого неспецифического барьера инициируется включение всех последующих механизмов защиты макроорганизма. Строгая иерархия в микробиоценозе способствует доминированию определенных видов бактерий, которые контролируют качественный и количественный состав сообщества, предотвращая избыточный рост условно-патогенных микроорганизмов. Достигается это с помощью многочисленных механизмов, среди которых конкуренция за рецепторы, за пищевые субстраты, выработка веществ, обладающих антагонистическими свойствами. Нарушение взаимоотношений между доминирующей и условно-патогенной микрофлорой приводит к избыточному росту последней, что рассматривают как дисбиоз. Последствия развития дисбиотических нарушений могут быть различными для макроорганизма: от усиления антагонизма со стороны доминантной микрофлоры, до развития оппортунистических инфекций.

Многие работы демонстрируют то, что микроэкологические нарушения кишечника вне зависимости от причины, которые вызвали их, имеют сходный характер, т.е. обычно отмечают снижение числа доминантных микросимбионтов и увеличение интенсивности колонизации слизистой условно-патогенными бактериями и грибами. Однако, также известно, что в процессе формирования ассоциативных сожительств микроорганизмов меняются их биологические свойства. При этом чаще всего исследования касаются условно-патогенных микросимбионтов, а данные по функциональным характеристикам у доминантной микрофлоры при ВИЧ-инфекции немногочисленны и практически отсутствуют. У таких пациентов остается не изученной способность бифидобактерий к адгезии, колонизации в условиях иммунодефицита, антагонистические свойства по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, что не позволяет говорить о механизмах развития микроэкологических нарушений и оппортунистических болезней при вторичных иммунодефицитах. Также знание биологических свойств доминантной микрофлоры, прежде всего бифидофлоры, необходимо для определения конкретных точек приложения для средств и методов коррекции микроэкологических нарушений кишечника у ВИЧ-позитивных пациентов.

Цель – изучение адгезивных и антагонистических свойств бифидофлоры для установления механизмов нарушения колонизационной резистентности слизистой кишечника у ВИЧ-инфицированных детей.

Материалы и методы: Исследование было построено по типу «случай-контроль». В опытную группу вошли 63 ребенка с ВИЧ-инфекцией (II–III степени, II–III иммунной категории), средний возраст которых составил $2,3 \pm 0,2$ года. Диагноз ВИЧ-инфекция был выставлен на основании данных эпидемиологического анамнеза (перинатальный контакт), и подтвержден результатами ИФА, ПЦР, иммуноблотинга. Группа сравнения включала 50 ВИЧ-негативных относительно здоровых детей. Группы были сопоставимы по возрасту и полу. Объектом исследования были 54 штамма бифидобактерий, выделенных из содержимого толстой кишки детей с ВИЧ-инфекцией и 42 штамма от детей группы сравнения. Выделение бифидобактерий проводили на Бифидум-среде (г. Оболенск). Для создания анаэробных условий применяли анаэроостаты (BBL, США) и газогенерирующие пакеты (НПО «Новое дело», Санкт-Петербург). Идентификацию бактерий осуществляли на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств. Последние изучали с использованием коммерческих тест систем ANAERO-TEST 23

(Lachema, Чехия). Проведено 480 опытов по изучению биологических свойств бифидобактерий. Изучены распространенность и количественные характеристики факторов неспецифической и специфической адгезии, распространенность и направленность антагонистических взаимоотношений бифидофлоры.

Неспецифическую адгезию бифидобактерий оценивали по величине гидрофобности клеточной поверхности по Rosenberget.al. с модификациями L-QWanget.al. Аффинитет к углеводам рассчитывали как процент гидрофобности ($H\%$) по формуле $H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$, где A_0 и A – оптическая плотность до и после обработки бактериальной суспензии додеканом. Штаммы считали высокогидрофобными при $H = 60\%$ и $>$, среднегидрофобными при $H = 40-59\%$, низкогидрофобными при $H \leq 39\%$.

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали согласно методике В.И. Брилиса. Оценку результатов опыта вели по индексу адгезивности микроорганизма (ИАМ), который характеризует среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезивном процессе эритроците. Микроорганизмы считали неадгезивными при $ИАМ \leq 1,75$; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивными при $ИАМ \geq 4,0$.

Антагонистическую активность микроорганизмов определяли методом отсроченного антагонизма на плотной питательной среде. На чашку с плотной питательной средой петлей 2 мм наносили полоску культуры бактерий и инкубировали 24–48 часов с учетом типа дыхания. Далее к выросшей культуре подсеивали участников ассоциаций, предварительно выращенных на скошенном мясо-пептонном агаре в течение 18 часов. Посев производили петлей диаметром 1 мм в направлении от зоны роста изучаемых бактерий, не касаясь ее и перпендикулярно ей. Чашки инкубировали при температуре 37°C 24 часа. Учет результатов вели по величине зоны отсутствия роста микроба-ассоцианта в мм.

Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica (версия 6.1 лицензионное соглашение ВХХР 006ВО92218 FAN 11). Статистическая обработка информации строилась с учетом характера распределения данных, которое определяли с помощью построения гистограмм.

Результаты исследования и их обсуждение.

Взаимодействие между микрофлорой и слизистой кишечника начинается с адгезии, которая делится на неспецифическую и специфическую. Неспецифическая адгезия (docking) обратима и

обусловлена физико – химическими особенностями молекул, в том числе и гидрофобностью. Гидрофобность является проявлением сил Ван-дер-Ваальса и в настоящее время исследуется как свойство, позволяющее бактериям не только взаимодействовать с углеродсодержащими материалами, но и друг с другом, со слизистой кишечника. Кроме того, показано наличие прямой зависимости между степенью гидрофобизации и способностью к специфической адгезии, так как пили большинства бактерий состоят из белковых субъединиц, которые на 50% состоят из гидрофобных аминокислот. При изучении гидрофобности бифидобактерий, выделенных от ВИЧ-позитивных и ВИЧ–негативных детей, установлено, наличие статистически значимых различий в структуре гидрофобности бифидофлоры ($\chi^2 = 13,83$, $df=2$, $p<0,05$). Так, среди бифидобактерий, изолированных от детей с ВИЧ–инфекцией, преобладали штаммы со средней (53,7%) и низкой (44,44%) гидрофобностью, тогда как к высокогидрофобным культурам были отнесены только 1,85% штаммов. От детей группы сравнения в большинстве случаев выделяли высокогидрофобные штаммы, доля которых составила 42,86%, 35,71% штаммов были отнесены к среднегидрофобным, а к низкогидрофобным только 21,43% штаммов. Изучив специфическую адгезию, обусловленную комплементарностью взаимодействующих структур, установлено, наличие статистически значимых различий в структуре бифидофлоры по способности к специфической адгезии ($\chi^2 = 15,16$, $df=2$, $p<0,05$). В большинстве случаев бифидобактерии, полученные из кишечника детей с ВИЧ–инфекцией, были отнесены к средне (46,3%) и низкоадгезивным (35,2%) культурам. Высокими адгезивными характеристиками обладали только 18,5% штаммов. Бифидобактерии от ВИЧ–негативных детей в 57,1% случаев проявляли среднюю адгезивную способность, тогда как 35,71% штаммов были высокоадгезивными. К низкоадгезивным культурам были отнесены только 7,14% штаммов, полученных от детей данной группы.

Установлено наличие прямой корреляционной связи между показателем специфической адгезии и интенсивностью колонизации слизистой кишечника бифидобактериями ($r=0,52$; $p<0,001$). Иначе говоря, чем выше показатель специфической адгезии, тем более высокой интенсивности колонизации слизистой достигает бифидофлора. Однако бифидобактерии у детей с ВИЧ–инфекций отличаются нарушением как механизмов специфической, так и неспецифической адгезии, что приводит к формированию низкого количественного уровня данных микросимбиотов в кишечном микробиоценозе. Интенсивность

колонизации кишечника бифидофлорой у детей с ВИЧ–инфекцией составила $7,2 \pm 0,4$ lg КОЕ/г, у детей из группы сравнения содержание бифидофлоры было статистически выше - $9,2 \pm 0,2$ lg КОЕ/г ($p < 0,01$).

На формирование определенного типа микробиоценоза оказывают влияние не только способность бифидобактерий обеспечивать механическую защиту слизистой от адгезии штаммов условно-патогенных микроорганизмов, но и способность к антагонизму. Распространенность признака у бифидобактерий, выделенных от детей с ВИЧ–инфекцией не отличалась от аналогичного показателя в группе сравнения и составила $72,7 \pm 2,7$ против $84,8 \pm 3,1$ на 100 культур соответственно ($p > 0,05$). При этом, бифидофлора у детей с ВИЧ–инфекцией чаще проявляла антагонизм не к условно–патогенным бактериям, а к факультативно-анаэробной индигенной микрофлоре – к *Escherichia coli lac* + (38,2%) и *Enterococcus faecalis* (24,6%). Антагонистические взаимоотношения с гемолизинпродуцирующими *E. coli*, представителями рода *Staphylococcus* и *Klebsiella* формировались достаточно редко (в 12,9%, 22,2% и в 3,7% случаев соответственно). Бифидобактерии от ВИЧ–негативных детей вступали в антагонистические взаимоотношения прежде всего, с условно-патогенными представителями микробиоценоза – с *Klebsiella spp.* (42,3%) и *Staphylococcus spp.* (36,4%).

Таким образом, комплексная оценка биологических свойств фекальной бифидофлоры позволила определить механизмы нарушения колонизационной резистентности у ВИЧ–инфицированных детей. В основе неполноценности механических механизмов защиты кишечного биотопа бифидобактериями от избыточного роста ассоциативных микросимбионтов, лежит нарушение способности резидентов к специфической и неспецифической адгезии. Это, в свою очередь, обуславливает у детей с ВИЧ–инфекцией низкий количественный уровень бифидофлоры в кишечном микросимбиоценозе. Антагонизм у микроорганизмов рода *Bifidobacterium* формируется в основном по отношению к факультативно – анаэробными резидентами кишечного микросимбиоценоза, а антагонистические взаимоотношения с условно-патогенными микросимбионтами характеризуются не только низкой распространенностью, но и низкой степенью выраженности признака. Полученные данные по биологическим характеристикам доминантной микрофлоры у ВИЧ–инфицированных детей согласуются с «теорией нарушенной микрофлоры». Они могут быть использованы для рационализации принципов коррекции у данной категории пациентов и профилактики развития у них СПИД–ассоциированных инфекций.

**ИЗУЧЕНИЕ ХОЛЕРОПОДОБНЫХ ВИБРИОНОВ,
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ г. КАЗАНИ
2004-2012г.г.**

*Л.А. Бакирова, А.Е. Ерастова, И.А. Григорьева, Р.Г. Валлиулина, Г.А. Неткач,
И.Н. Иволга, О.А. Толстова.*

Федеральное бюджетное учреждение
здравоохранения «Центр гигиены
и эпидемиологии».

Холера – особо опасное заболевание из группы карантинных инфекций, отличающихся особо высокой контагиозностью и часто вызывающих эпидемии и пандемии, легкостью заражения, высокой восприимчивостью людей и выпаженной летальностью. Возбудителей эпидемий холеры относят к O1 (*Vibrio cholera biovar asiaticae*, *Vibrio cholera biovar eltor*) и O139 (serovar *Bengal*) серогруппам. Для них типичен фекально – оральный механизм передачи с водным, пищевым и контактным путями распространения.

Основную эпидемическую опасность для нашей страны представляют бактерии O1 серогруппы биовара Эль Тор, т.к. на фоне постепенного снижения общего числа заболеваний, вызванных классическим (азиатским) возбудителем, холера Эль–Тор в той или иной степени охватила все континенты земного шара, включая и страны, в которых классическую холеру не регистрировали за всю историю ее существования. Ежегодно ее выявляют в 27-43 странах, иногда в некоторых из них впервые.

В последние годы отмечают стабильный рост заболеваемости, только в 2010 году превысивший 300 000 случаев, из которых 7 500 закончились гибелью пациентов. При этом ВОЗ отмечает четкую тенденцию к снижению заболеваемости в эндемичных очагах (с 90% до 50%) и увеличение частоты вспышек в регионах, ранее относительно благополучных по холере.

Принимая во внимание высокую пластичность генетического аппарата вибрионов и высокую возможность передачи генов патогенности между бактериями отдельных сероваров, особое значение уделяют изучению холерных вибрионов не-O1 серогруппы (НАГ–вибрионы). Они сами способны вызывать заболевания по типу пищевых токсикоинфекций и системные поражения с внекишечной локализацией возбудителя, в том числе септицемии, но еще более опасны в плане возможности передачи им генов, кодирующие образование холерного токсина, от бактерий O1 группы.

Термин НАГ–вибрионы (не агглютинирующиеся вибрионы) появился в период VII пандемии холеры, заменив понятие холероподобные вибрионы. Его предложено использовать для бактерий, соответствующих определению рода *Vibrio* и обладающих аналогичными Н-антигенами, что и холерные вибрионы, но не агглютинирующихся O1 (холерными) антисыворотками.

Цель исследования. Изучение холероподобных вибрионов, циркулирующих в открытых водоемах г. Казани.

Материал и методы. Материалом для исследования служили пробы воды, отобранные из рек Волга, Казанка, Нокса, озер и прудов в окрестностях г. Казани. Образцы отбирали в стерильную посуду с не промокаемой пробкой в количестве 1 литра (по 500 мл в 2 объемах). Всего за период с 2004 по 2012 гг. было отобрано и изучено 4703 пробы воды. Исследования проводили в соответствии с МУК 4.2.221–07 «Лабораторная диагностика холеры». В работе использовали жидкие среды обогащения, щелочной агар и набор сред для идентификации. Посевы исследуемого материала подращивали 6–8 часов на 1% пептонной воде, в пептонной воде с K_2TeO_3 – 12–18 часов, на щелочном агаре – не менее 14–16 часов при 37 °С.

На второй день исследования из каждой бутылки делали высев петлей в две пробирки с 10 мл пептонной воды и инкубировали 6 часов при 37 °С. Через 6 часов пересевали на чашки со щелочным агаром и термостатировали 18–24 часа при 37 °С. На третий день исследования посевы просматривали при дневном свете. Подозрительные колонии – небольшие, круглые, дисковидные, прозрачные с ровными краями, голубоватые в проходящем свете, легко снимающиеся – отсевали на лактозо–сахарозную среду и инкубировали 18–24 часа при 37 °С.

Параллельно готовили мазки. При обнаружении в окрашенных мазках грамотрицательных палочек проводили определение оксидазной активности. Оксидаза–отрицательные культуры отсевали на щелочной агар, определяли подвижность, способность образовывать индол, ферментировать маннозу, арабинозу, сахарозу, маннит, инозит, лизин, аргинин, орнитин и мочевины, а также проводили постановку теста окисления/ферментации глюкозы.

При выделении подвижных культур, положительно реагирующих в тестах на образование индола, разложения маннита, лизина, орнитина и окисления/ферментации глюкозы, но неспособных разлагать мочевины, инозит и аргинин, их относили к *V. cholerae*. В подобных ситуациях проводили постановку реакции агглютинации на стекле с O1–, RO–, O139–антисыворотками. В качестве контроля использовали

забуференный физиологический раствор. Если выделенные культуры давали отрицательные результаты в отношении всех использованных субстратов, то их относили к *V. cholerae* не-O1 серогруппы и проводили биохимическую идентификацию по способности утилизировать маннозу, сахарозу и арабинозу для определения принадлежности к определенной группе по Хайбергу. В соответствии со способностью ферментировать маннозу, сахарозу и арабинозу, В.Нейберг (1936) распределил все вибрионы (холерные и холероподобные) на 8 групп, холерные вибрионы O1 серогруппы разлагают только маннозу и сахарозу и отнесены к первой группе.

В случае положительной реакции культуру передавали в отдел особо-опасных инфекций для дальнейшей идентификации.

Результаты:

При проведении исследований проб воды из открытых водоемов за период 2004 –2012 годы нами были выделены 350 культур НАГ-вибрионов (не–O1), а также один нетоксигенный изолят *V. cholerae* O1. Наибольшее число положительных результатов наблюдали в 2007 и 2010 гг. – соответственно 12,75% и 11,9%, минимальное число наблюдалось в 2008 и 2006 г.г. – соответственно 3,96% и 4,9%.

Анализа мест выделения *V. cholerae* не–O1 серогруппы в различных водоемах г. Казани и пригородов показал, что в 2011 году из реки Волги было выделено наибольшее количество подобных культур (24,1%). За весь период исследования отмечена тенденция к перманентному увеличению частоты выделения *V. cholerae* не-O1 серогруппы из реки Казанки. Вполне очевидно, что это явление связано с тем, что она протекает через город Казань. На ее берегах находятся основные места купания населения. Косвенным подтверждением этому является тот факт, что в пробах воды из реки Нокса выделено наименьшее число положительных находок, а эта река мелководна и не используется для купания населения. Достаточно часто вибрионы обнаруживали в непроточных озерах и водоемах пригородов Казани, что можно объяснить отсутствием в них смены воды.

Чаще всего холерные вибрионы не–O1 серогруппы выделяли из реки Казанки и из относительно замкнутых водоемов озерного типа. При этом с наибольшей частотой НАГ-вибрионы обнаруживали в августе месяце. В 2004 г. частота их обнаружения составила 69,5%, в 2005 г. – 75,6%, в 2006 г. – 73,1%, в 2007г. – 25,5%, (но в июле – 58%), в 2008 г. – 78%, в 2009 г. – 100%, в 2010 г. – 88,8%, в 2011 г. – 72,4%,.

Выводы:

–из водоемов г. Казани и пригородов наиболее часто выделяли *V. cholerae* не-O1 серогруппы, относящиеся к I группе Хайберга.

– наибольшая частота обнаружения *V. cholerae* не-O1 серогруппы в открытых водоемах г.Казани зарегистрирована в 2007 (12,75%) и 2010 годах (11,9%).

– холерные вибрионы не-O1 серогруппы чаще всего выделяли из реки Казанки и озер в городской черте в августе, что можно объяснить тем, что в этот месяц температура воды наиболее высока и эти водоемы чаще всего используются населением для купания.

АНАЛИЗ РЕГИОНА IS6110 ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.

Н.И. Хаммадов, Т.Х. Фаизов, Н.М. Алексадрова.

ФГБУ Федеральный центр токсикологической
и радиационной безопасности, г. Казань

Туберкулёз животных занимает одно из ведущих мест в структуре инфекционных заболеваний. Сравнительно недавно для диагностики инфекционных заболеваний в ветеринарной практике стали применять метод полимеразной цепной реакции. В России и других странах мира созданы ПЦР тест-системы, предназначенные для определения и дифференциации возбудителя туберкулёза. Несмотря на значительные достижения ветеринарной службы в борьбе с туберкулезом, эта опасная зооантропонозная инфекция регистрируется в ряде регионов Российской Федерации и в странах СНГ.

Для диагностики этой болезни применяются различные методы. Среди них нужно выделить молекулярно-генетические методы, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами. Но кроме индикации, необходимо проводить и дифференциацию видов и штаммов микобактерий. Существует несколько методов, которые можно широко применять для типирования видов и штаммов микобактерий, такие как: VNTR; RFLP; PCR-RFLP; AFLP; RAPD-PCR и другие. Среди этих методов наиболее специфичным является ПЦР-ПДРФ. Суть метода состоит в том, что происходит амплификация фрагмента ДНК, который имеется только у всех микобактерий (только у микобактерий), а после электрофореза продуктов рестрикции ампликона можно установить вид микобактерии.

Для генотипирования была использована ДНК, выделенная из следующих штаммов микроорганизмов: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. scrofulatum*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* M17, *Fusobacterium necrophorum* и *Br. abortus* штамм 82. Выделение ДНК осуществляли набором «ДНК-сорб» производства ЦНИИ Эпидемиологии РФ, в соответствии с прилагаемым наставлением. В качестве метода

генотипирования был использован полиморфизм длин рестрикционных фрагментов с продуктами полимеразной цепной реакции. Для ПЦР были использованы праймеры Tb11 (нуклеотидная последовательность 5' - АССААСГАТГГТГТГТССАТ - 3') и Tb12 (нуклеотидная последовательность 5' - СТТГТСГААССГСАТАСССТ - 3'). Рестриктаза AspLE имеет сайт опознавания 5'-GCG↓C-3'.

Протокол реакции : 1 цикл. 95° С – 3 мин, 2 цикл (денатурация – 95° С – 30 с.; отжиг – 60° С – 30 с.; синтез - 72° С – 1 мин.) 45 повторов, 3 цикл (досинтез) – 72° С- 5 мин. Реакционная смесь в расчёте на 1 пробу ПЦР – буфер*10 (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0,1% Triton-X100) – 3 мкл, 200 мМ раствор dNTP – 3 мкл, 1 мкМ раствор праймера N29 – 1 мкл, Taq полимераза – 0,3 мкл. Общий объём реакционной смеси – 30,3 мкл. Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов проводили следующим образом: в пробирку, содержащую 2ед (1 мкл) фермента AspLE, 1 мкл реакционного буфера (5х буфер О (50mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT)) и 5 мкл деионизированной воды добавляли 3 мкл ПЦР продукта. Смесь инкубировали в течение двух часов при 37 °С. Разделение полученных в результате реакции ампликонов осуществляли посредством горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле с добавлением этидия бромид для окраски ДНК. Маркеры молекулярного веса ДНК имеют следующий молекулярный вес: 50, 200, 400, 850 и 1000 пар нуклеотидов. Он был разогнан в первой и последних дорожках геля для минимизации искажений расчетов. Учёт результатов осуществляли с помощью трансиллюминатора в ультрафиолетовом свете. Фотографирование агарозного геля осуществляли посредством цифрового фотоаппарата Cassio. Обработка изображения геля и расчёт молекулярного веса ампликонов производили с помощью программного обеспечения GelAnalyser НРО «Литех».

После амплификации образцы с ДНК *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum* и *Br. abortus* не образовали ампликонов и не нуждались в последующей рестрикции. Гидролиз происходит между G и C на участке ДНК, где встречается последовательность GCGC.

Исходя из данных электрофореза было установлено, что рестрикция ферментом AspLe амплифицированного фрагмента IS6110 не обнаруживает полиморфизма в пределах вида микобактерии, однако хорошо определяет межвидовые различия *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium tuberculosis*. Все изоляты *Mycobacterium tuberculosis* дали характерную картину электрофореза, аналогичную контрольному образцу *Mycobacterium*

tuberculosis, контрольный образец *Mycobacterium bovis* показал картину электрофореза аналогичную вакцинному штамму *Mycobacterium bovis* BCG, а *Mycobacterium scrofulatum* и *Mycobacterium avium* показали полиморфизм длин рестрикционных фрагментов не схожий ни с одним из исследуемых образцов, следовательно, межвидовая дифференциация высокоспецифична.

Заключение. Анализ произведенных исследований показал что, получая специфичный для микобактерий ампликон, мы идентифицировали исследуемый материал как микобактерии. Далее производя рестрикцию полиморфного для разных видов микобактерий участка ДНК (IS6110), дифференцировали разные виды микобактерий.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ–ИНФЕКЦИИ В г. КАЗАНИ

Н.И. Галиуллин, Ф.И. Нагимова, Л.В. Ставропольская, Р.Х. Зайнуллина

ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике
и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями
Министерства здравоохранения Республики Татарстан», г. Казань

Город Казань относится к территориям с низким уровнем распространенности ВИЧ–инфекции, как в целом в Республике Татарстан. На 01.01.2013 г. в г. Казани выявлено 6039 случаев ВИЧ–инфекции. Уровень пораженности населения 484,2 на 100 тыс. населения. ВИЧ–инфекция в г. Казани регистрируется с 1991 года, до 1998 года выявлялись единичные случаи. Рост начался с 2001 г., с момента активного вовлечения в эпидпроцесс потребителей инъекционных наркотиков. В 2012г. охват обследованиями на ВИЧ потребителей инъекционных наркотиков составил 67% от числа лиц, состоящих на учете у нарколога. С 2008 г. наметилась тенденция увеличения доли инфицирования при незащищенных половых контактах, которая в последние 3 года составила 51%. Преимущественная активность парентерального пути передачи на протяжении всего периода наблюдения является особенностью развития эпидемии ВИЧ–инфекции в г. Казани.

В возрастной структуре выявленных случаев ВИЧ–инфекции преобладают лица молодого работоспособного возраста 20–29 лет – 56,1%. Характерной тенденцией последних лет является активное вовлечение в эпидемиологический процесс лиц в возрасте 30–39 лет: в 2012 г. – 45,3%. Регистрация в возрастной группе 40–49 лет в 2012г. – 11,9%. В последние годы наметилась «феминизация» ВИЧ–инфекции, в

2012 г. доля женщин в структуре впервые выявленных случаев ВИЧ составила 41%. Вовлечение в эпидпроцесс женщин привело к увеличению числа детей, рожденных от ВИЧ-инфицированных матерей. В г. Казани на 01.01.2013г. родилось 670 таких детей, 35 из них был установлен диагноз ВИЧ-инфекция, частота перинатальной передачи составила 7 %, что на 1% выше республиканского показателя.

В последние 10 лет произошла стабилизация числа ежегодно выявляемых случаев инфицирования. Тем не менее, резервуар ВИЧ-инфекции постоянно пополняется, что приводит к увеличению частоты эпидемиологически значимых контактов с неинфицированной частью населения, так на 01.01.2013 г. состоит на учете 763 контактных с ВИЧ-инфицированными, из которых 97,2% являются постоянными половыми партнерами. Изменяющаяся тенденция развития эпидемиологической ситуации требует внедрения новых форм профилактических мероприятий и координации действий государственных и общественных организаций.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ БЕШЕНСТВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

А.Н.Чернов.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности», г. Казань

Бешенство остается постоянной угрозой для человечества во многих частях мира. Несмотря на значительные успехи в его изучении борьба с ним затруднена из-за широкой циркуляции вируса в природе. Известно, что изоляты уличного вируса бешенства, циркулирующие в природе, отличаются широкой вариабельностью биологических свойств. Принято считать, что причиной этой вариабельности является изменчивость, обусловленная, главным образом, особенностями экологической ниши. В то же время известно, что планирование мер профилактики зависит как от знаний этологии диких животных, так и от биологических свойств штаммов возбудителя бешенства, циркулирующих в регионе. В связи с этим, ставилась задача по обнаружению рабического антигена в патологическом материале, выделение возбудителя бешенства и изучение антигенных, патогенных свойств изолятов вируса бешенства, циркулирующего на территории Республики Татарстан.

Материалы и методы. Иммунологический мониторинг бешенства в РТ проводили с использованием Методического указания по

лабораторной диагностике бешенства, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 14.05.1997 г., наборов препаратов для диагностики бешенства: флюоресцирующего антирабического глобулина (ФАГ) для обнаружения антигена вируса бешенства, №ПВР–1–4.9/00196, набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА, №ПВР-1-1.9/00261). В опытах в качестве специфических антител применяли антирабический гамма-глобулин, полученный из сыворотки крови овец, иммунизированных вакцинным штаммом "ОВЕЧИЙ" ГНКИ вируса бешенства с индексом нейтрализации равным 2 и более.

Результаты исследований.

Всего методами ИФА и МФА, а также биопробой на белых мышах и в культуре клеток НГУК–1 исследовано 239 проб патологического материала от различных видов животных. С помощью метода ИФА положительные результаты получены в 78 (97,5%), в МФА – 74 случаях (92,5%), из 80 установленных биопробой на мышах и культуре клеток НГУК–1. Эти данные убедительно показывают на необходимость подтверждения предварительного диагноза, поставленного на основании клинико-эпизоотологических показателей комплексными лабораторными исследованиями. Необходимо отметить, что уличный рабический вирус в культуре клеток НГУК–1 выделялся в более ранние сроки (24–72 ч), чем при интрацеребральной инокуляции мышей (до 30 суток). Цитопатического действия изучаемых штаммов не обнаружено. Антиген вируса бешенства в МФА выявлялся в препаратах в виде ярких желтовато–зеленых гранул различной формы и величины – от едва заметных до имеющих 15–20 мкм в диаметре. Иногда отмечалось большое количество мелких желто-зеленых частиц (размером до 0,5 мкм) округлой и овальной формы. В контроле, где клетки НГУК–1 инкубировали с мозговой взвесью от клинически здоровых животных, при окрашивании их флюоресцирующим антирабическим глобулином, специфических гранул не обнаруживали.

Метод ИФА также является высокочувствительным методом диагностики бешенства, и на заранее сенсибилизированном иммуноглобулином планшете результат был получен спустя 3–4 ч после внесения исследуемого антигена. При этом специфический антиген выявляется в титрах от 1:10 до 1:320 при Ксп равным 2,1 и более. Метод ИФА позволяет выявлять рабический антиген в разложившемся и хранившемся в глицерине патматериале, то есть в тех случаях, когда МФА и РДП не могут быть использованы.

Таким образом, использование современных методов диагностики (выделение возбудителя болезни в культуре клеток НГУК–1 и метода ИФА) с применением разработанных во ВНИВИ диагностических наборов расширяет

возможности лабораторной диагностики бешенства, способствуя успешному проведению противоэпизоотических мероприятий. Кроме того, из данных этих экспериментов следует антигенное родство изолятов, циркулирующих на территории Татарстана вакцинному штамму "Овечий" ГНКИ, так как они полностью нейтрализовались антирабическим гамма- глобулином, изготовленным из сыворотки крови овец, иммунизированных указанным штаммом.

Кроме того, в опытах на котятх установлено антигенное соответствие эпизоотических изолятов циркулирующих в биотопах Татарстана вакцинному штамму «Щелково-51». В дальнейших исследованиях вакцинировали котят 3-месячного возраста (30 голов) антирабической инактивированной культуральной вакциной из штамма «Щелково-51» согласно Наставлению по ее применению. Через 14 суток после 2-го введения вакцины животных подвергали контрольному заражению эпизоотическими изолятами рабического вируса - эксп. 4848, 1582, 4090, 2155 и 3524 и наблюдали в течение 45 суток. По истечении срока наблюдения вакцинированные животные оставались здоровыми после заражения, а контрольные (не иммунизированные) – заболевали и погибали. Полученные результаты указывают на антигенное соответствие циркулирующих в Татарстане эпизоотических изолятов вируса бешенства вакцинным штаммам «Овечий» ГНКИ и «Щелково-51» и это имеет определенное значение при проведении противоэпизоотических мероприятий (диагностика, профилактика).

Экспериментальным заражением была установлена патогенность изучаемых изолятов. Для лабораторных животных – белых мышей, морских свинок и кроликов. Специфичность клинических проявлений бешенства у животных была подтверждена методом ИФА и МФА.

Установлено, что выделенные изоляты вируса бешенства из неблагополучных районов Татарстана имеют ярко выраженные преципитирующие свойства, с активностью в реакции диффузной преципитации 1:2 – 1:8, при этом активность вируса бешенства, штамм "Овечий" ГНКИ, в РДП составляла 1:8.

Исследованные изоляты вызывали заболевание белых мышей с летальным исходом как при интрацеребральном, так и подкожном способах заражения. Продолжительность видимых проявлений болезни обычно составляла менее суток и в редких случаях 2-3 суток. При этом инкубационный период варьировал в среднем от 7 до 35 суток.

Для характеристики вирулентности изолятов вируса использовали индекс инвазивности, который определяли как разницу титров в пересчете на 1 мл суспензии при интрацеребральном и подкожном заражении, при этом установлено различие эпизоотических изолятов по

степени патогенности для лабораторных животных. Индекс инвазивности варьирует от 0,9 до 2,3, что свидетельствует о циркуляции как высоко-, так и слабопатогенных изолятов вируса бешенства.

Заключение. На основании изучения иммунобиологических свойств изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Татарстана, установлена патогенность их для сельскохозяйственных, домашних и лабораторных животных, показано различие их по степени патогенности для лабораторных животных. Индекс инвазивности варьировал от 0,9 до 2,3, инкубационный период – от 12 до 23 суток, что свидетельствует о широкой вариабельностью биологических свойств. Установлено антигенное родство уличного рабического вируса с вакцинными штаммами "Щелково-51" и "Овечий" ГНКИ вируса бешенства. Эпизоотические изоляты не оказывали цитопатического действия и (выделялись в культуре клеток НГУК-1 с последующим анализом по МФА), а также обладали ярко выраженными преципитирующими и комплементсвязывающими свойствами.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОКОКЛЮШНЫХ АНТИТЕЛ В СЛЮНЕ ДЕТЕЙ, КОНТАКТИРОВАВШИХ С БОЛЬНЫМИ КОКЛЮШЕМ

А.Н. Савинова, Е.Р. Федорова.

ГБОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации г. Казань

Люди, контактировавшие с больными коклюшем, но не имеющие клинических симптомов заболевания, могут являться бактерионосителями. Бактериологический метод диагностики коклюша не всегда дает положительные результаты, даже при наличии возбудителя в организме больного. В связи с этим представляло интерес выявление антител в слюне и сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Метод ИФА с адсорбцией антигена на носителе ставили, используя коммерческую диагностическую тест-систему для определения антител к *B.pertussis*, согласно инструкции по ее применению. В качестве антигенов диагностическая тест-система содержала белковую фракцию коклюшного микроба, липополисахаридную фракцию и суммарную фракцию антигенов микробной клетки – дезинтеграт.

Было обследовано 39 детей, контактировавших с больными коклюшем за 3 и более недель до забора материала. Из них привитых против коклюша было 35 (89,7%) человек, непривитых 4 (10,3%). Большинство привитых получили последнюю прививку АКДС вакциной за 1-3 года до забора материала. Забор слюны и крови проводили двукратно, с интервалом в 2 недели.

Пробы слюны без дополнительной обработки разводили двукратно, начиная с 1:2, сыворотки крови с 1:200. В качестве отрицательного контроля были использованы образцы слюны, не содержащие коклюшных антител, обеспечивающие поглощение при длине волны 450 нм не более 0,05, а также отрицательная контрольная сыворотка крови, входящая в комплект диагностической тест-системы.

Положительной считали реакцию с образцами слюны или сыворотки крови в лунках, где показатели оптической плотности окрашенного субстрата были на 0,10 и более выше, чем в лунках с тем же разведением отрицательной контрольной слюны или сыворотки. Количественную оценку содержания антител производили в титрах (по максимальному разведению образца, обеспечивающего положительную реакцию).

Противокклюшные антитела в слюне были обнаружены методом ИФА у 31 ребенка (79,5%), в том числе у 27 из 35 привитых (77,1%) и у всех 4 непривитых (100%).

Всего было исследовано методом ИФА по 67 параллельных образцов слюны и сыворотки крови. В слюне антител к ЛПС антигену, белковому антигену и дезинтеграу были обнаружены в 36 образцах (53,7%). Антитела к ЛПС и белковому антигену колебались в пределах от 1:2 до 1:128, к дезинтеграу микробной клетки – от 1:2 до 1:256. Динамика накопления антител к 3 антигенным фракциям коклюшного микроба, в основном, была однотипной. Максимум накопления антител в слюне отмечался на 3 неделе после контакта. Параллельно с исследованием слюны методом ИФА проводилось изучение динамики накопления противокклюшных антител в сыворотке крови у тех же детей. Во всех 67 образцах были обнаружены антитела к ЛПС, белковому антигену и дезинтеграу коклюшного микроба. Уровень антител в крови детей, контактировавших с больными коклюшем, к ЛПС антигену колебался от 1:400 до 1:12800, к белковому антигену и дезинтеграу – от 1:400 до 1:25600. Однако только в 56 образцах (83,6%) титры антител к ЛПС антигену были выше или равны диагностическому. Максимум накопления антител отмечался на 3 неделе после контакта. Наши исследования показали, что на 3, 8, 9 и 11 неделях от момента контакта титры противокклюшных антител к ЛПС антигену в

сыворотке крови были выше диагностического. На 6 и 13 неделях после контакта – были несколько ниже диагностического уровня, но существенно выше фонового. Сопоставление средних титров антител в слюне и сыворотке крови показало, что на всех сроках исследования уровень антител в крови был достоверно выше, чем в слюне обследованных. Представляло также интерес сопоставление содержания антител в слюне детей, контактировавших с больными коклюшем, но не имевших клинических признаков заболевания и у больных с клинически выраженным коклюшем, обследованных нами методом ИФА ранее. Было установлено, что если рассматривать третью неделю от момента контакта с больным коклюшем, как первую неделю бессимптомно протекающей инфекции (с учетом среднего инкубационного периода при коклюше в 10-14 дней), то титры антител, выявленные методом ИФА в слюне детей на третьей неделе после контакта, были выше уровня антител в слюне больных на первой неделе болезни (соответственно, $4,00 \pm 2,88$ и $1,26 \pm 1,26$ к ЛПС антигену, $P \leq 0,05$). В отношении антител к остальным антигенным компонентам коклюшного микроба также наблюдалась тенденция к более высокому уровню антител у контактировавших детей по сравнению с больными. Кроме того, у детей с бессимптомным течением коклюшной инфекции накопление антител в слюне происходило быстрее, чем у больных с острым течением коклюша.

Таким образом, выявление антител в слюне и сыворотке крови детей, контактировавших с больными коклюшем, свидетельствуют о весьма интенсивной циркуляции возбудителя в очаге.

Более медленное нарастание титров антител в слюне больных коклюшем, по-видимому, свидетельствует о некоторой недостаточности местной защиты тканей дыхательных путей у этих детей, что и могло обусловить острое течение инфекции.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ ГНОЙНЫХ РАН

Г.Г. Ахметханова, М.П. Шулаева.

ГАУЗ Лениногорская ЦРБ
ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»

Инфекционные осложнения хирургических ран составляют одну из основных проблем хирургии. Отечественный и зарубежный опыт, основанный на большом клиническом материале, показывает, что уровень послеоперационных гнойных осложнений в хирургии не имеет

тенденции к уменьшению и составляет, в среднем, 6,0 – 8,0%, причем, если в группе «чистых» операций гнойные осложнения развиваются в 0,8 – 2% случаев, то в группе «загрязненных» операций количество нагноений возрастает до 28,8 – 40,0%. На фоне осложнений ран продолжительность послеоперационного периода удлинится, что существенно увеличивает стоимость лечения. Кроме того, развитие инфекционного процесса представляет большую опасность для самого больного, может привести к развитию таких заболеваний как хирургический сепсис и септический шок, нередко заканчивающихся гибелью пациента. Многочисленные исследования свидетельствуют, что даже при идеальном соблюдении принципов асептики полностью избежать контаминации хирургических ран во время операции не удастся, поэтому важно определить микробный пейзаж операционной раны для профилактики и лечения послеоперационной инфекции.

Возбудители послеоперационной инфекции в хирургии сегодня хорошо известны: *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Ps. aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* Несмотря на то что в ряде случаев возбудителями послеоперационной инфекции являются типичные нозокомиальные виды микроорганизмов (*Ps. aeruginosa*, MRSA, *Acinetobacter spp.*), большинство авторов не склонны считать нагноение послеоперационных ран проявлением внутрибольничной инфекции и указывают на преимущественно эндогенный (контактный, гематогенный, лимфогенный) путь инфицирования. Иными словами, состав микробной флоры при послеоперационной раневой инфекции является прямым следствием выхода сапрофитирующей микрофлоры из ареала ее обитания в результате развития воспалительного или/и некротического процесса, нарушения анатомических барьеров в процессе оперативного вмешательства, транслокации микрофлоры. Немаловажную роль могут играть и немикробные факторы (общее состояние больного и состояние его иммунной системы, объем операции, состояние кровоснабжения в области операционной раны, наличие инородных тел и девитализированных тканей в ране и наличие сопутствующих заболеваний, длительность применения стероидов, иммунодепрессоров, лучевой терапии и др.).

Проблема инфекций, как внебольничных, так и нозокомиальных, не может быть решена без организации соответствующей системы микробиологического контроля в стационарах. Этот контроль (исследование) представляет собой многоступенчатый процесс, включающий:

- забор проб клинического материала и его транспортировку в лабораторию;

- проведение бактериоскопии и посева на питательные среды для выделения возбудителя и получения чистой культуры;
- идентификация выделенных культур (до вида);
- определение их чувствительности к антибактериальным препаратам.

В связи с этим становится очевидной необходимость постоянного мониторингирования эндогенной микрофлоры у пациентов хирургических отделений.

Цель исследования: изучение микробного пейзажа послеоперационных ран гнойного отделения Лениногорской Центральной районной больницы за 2012 год.

Материалы и методы: Бактериологическое исследование проводили на базе бактериологической лаборатории Лениногорской ЦРБ согласно приказу №535 МЗ СССР от 22 апреля 1985г. «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и МУ 4.2.2039–05 «Техника сбора и транспортирование биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Забор материала на исследования осуществляли в стерильных условиях, тщательно соблюдая правила асептики. Образцы для посевов забирали до начала лечения антибактериальными препаратами. Материал маркировали и в течение 2 ч с момента забора доставляли в микробиологическую лабораторию.

Материал забирали двумя тампонами, один из которых использовали для микроскопии, а другой – для посева.

Для посева использовали 5% кровяной агар и две среды обогащения сахарный бульон и «среду для контроля стерильности». Посев производили методом «тампон-петля». Инкубировали засеянные жидкие и плотные питательные среды при 37 °С в течении 18–24 часов.

В ответе указывали какие виды микроорганизмов выделены и в каком количестве (слабый, умеренный или обильный рост на плотной питательной среде). Дальнейшую идентификацию изолированных культур бактерий по биохимическим свойствам определяли согласно «Определителя бактерий Берджи» 1997 г.

Результаты и их обсуждение:

Всего было обследовано 593 проб, из них 127 (21%) было без высева. Среди выделенных микроорганизмов наиболее часто встречались микробы рода *Staphylococcus* (*St. aureus*– 25%; *St. epidermidis*– 21%), далее шли представители семейства Enterobacteriaceae (*E. coli*-70%; *Enterobacter spp.* – 38%; *Klebsiella spp.* – 7%; *Proteus spp.* – 5%), неферментирующие грамотрицательные бактерии *Ps. aeruginosa*– 2%. Были единичные случаи высева энтерококков.

Обращает внимание присутствие в операционных ранах ассоциаций микроорганизмов (9%). Наиболее часто встречались ассоциации: стафилококков и энтеробактерий стафилококков и синегнойной палочки.

Таким образом, с этиологической позиции можно выделить несколько типов течения хирургической инфекции. Первый тип подразумевает, что патология вызвана монокультурой возбудителя. Определенный набор патогенных свойств микроорганизма при достаточном уровне бактериальной обсемененности способствует инициации и развитию инфекционного процесса. При втором типе хирургическая инфекция вызывается ассоциацией микроорганизмов, либо ассоциант присоединяется к иницирующему возбудителю в ходе инфекционного процесса. В этом случае за счет симбионтных межмикробных взаимоотношений происходит стимуляция ростовых характеристик ассоциантов и, следовательно, повышение уровня бактериальной обсемененности гнойно-воспалительного очага.

Выводы:

Проведенный анализ микробного пейзажа ран показал, что: ведущее место среди выделенных микроорганизмов занимают бактерий рода *Staphylococcus* (*St. aureus*, *St. epidermidis*) и микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* встречаются также ассоциации микроорганизмов: *Staphylococcus spp.* и микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*; *Staphylococcus spp.* и *Ps. aeruginosa*.

ДИНАМИКА МИКРОФЛОРЫ МОЧИ БОЛЬНЫХ УРОЛОГИЧЕСКИМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Э.М. Акимбекова, Г.М. Сейтгалиев, М.У. Дусмагамбетов,
А.М. Дусмагамбетова, М.Б. Каримова

АО «Медицинский университет Астана»
г. Астана, Республика Казахстан

Несмотря на достигнутые в последние годы успехи в диагностике и лечении, инфекции мочевыводящих путей (ИМП) продолжают оставаться одной из наиболее важных областей современной урологии и медицины в целом.

Для понимания актуальности данной проблемы достаточно ознакомиться с эпидемиологией ИМП. По данным, полученным в США, ИМП ежегодно являются причиной 7 млн. посещений и более 1 млн. экстренных обращений к врачам. Эта группа заболеваний лидирует среди внутрибольничных инфекций, составляя около 40% от их общего

числа. Распространенность ИМП в России составляет около 1000 случаев на 100000 населения в год. Распространенность ИМП в Казахстане составляет около 100 случаев на 10000 населения в год. Кроме того, эти инфекции имеют тенденцию к развитию тяжелых гнойно–септических осложнений.

Микробиологические исследования играют важную роль в диагностике заболеваний, рациональном выборе антибактериальных препаратов, оценке и контроле эффективности проведенной терапии, а также в профилактике осложнений.

По данным Мазо Е. Б., Попова С. В. наиболее важным возбудителем неосложненных ИМП продолжают оставаться *Escherichia coli*, выявляемая примерно в 80% случаев заболевания, и *Staphylococcus saprophyticus*, являющийся причиной развития еще 15% случаев ИМП. Значительно реже неосложненные ИМП вызывают *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus spp.*, а также *Enterococcus*. Что же касается осложненных ИМП, то причиной их развития нередко являются бактерии, крайне редко встречающиеся при неосложненных формах, такие как *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*, а также стрептококки группы В. Кроме того, при осложненных ИМП нередко выявляется смешанная инфекция.

Проведено микробиологическое исследование биоматериала (мочи) больных с уроинфекцией, находившихся на стационарном лечении в отделении урологии Национального научного медицинского центра МЗ РК в период с 2009 по 2012 год. Моча больных подвергалась количественному бактериологическому исследованию. Первичный посев клинического материала проводили на кровяной агар, желточно-солевой агар, среды Эндо и Сабуро. Микроорганизмы, после выделения чистой культуры и окраски по Граму, идентифицировали на основании изучения тинкториальных, культуральных и биохимических свойств.

От больных урологическими инфекциями было выделено 1281 штаммов микроорганизмов. За этиологический фактор принимались только те виды микроорганизмов, которые выделялись из мочи в количестве 10^5 КОЕ в 1 мл.

В результате проведенного исследования выявлено, что из мочи больных с инфекцией мочевыводящих путей выделено 15 видов микроорганизмов.

Из 1281 штамма, выделенных из мочи, 440 культур относились к 4 видам рода *Staphylococcus*, что составило 34,2%. Ведущую роль в этиологии ИМП из видов данного рода играл *Staphylococcus epidermidis*, составляя 51, 4 % от всех стафилококков, в 2011 году высеваемость

данного вида микроорганизма была выше в 1,1 раза по сравнению с изучаемыми годами.

На втором месте по частоте выделения находился *Staphylococcus haemolyticus* – 30, 7%, здесь нужно отметить, что динамика выделения бактерий по годам была неравномерна, носила волнообразный характер и составляла: 6,2% в 2009 году, 12,9% в 2010 году, 9,1% в 2011 году, 13, 4% в 2012 году. Остальные виды, такие как *Staphylococcus aureus* составили – 12,9%, надо обратить внимание на то что, наименьшая высеваемость данного микроорганизма наблюдалась в 2010 году и составила 3,5%, тогда как в 2009, 2010, 2012 годах обнаружение этих микробов составляло 4,7%, 4,6% и 4,8% соответственно. В 2010–2011 годах от больных с ИМП не было обнаружено бактерий вида *Staphylococcus saprophyticus*, хотя в 2009 году высеваемость составила – 5,9%, а в 2012 этот показатель сократился до 0,8%.

Микроорганизмы рода *Streptococcus* были представлены одним видом – *Streptococcus pyogenes*, причем динамика их выделения имеет тенденцию к снижению. Так, если в 2009 году этот показатель составлял – 3,7%, 2010 году он составил – 1,8%, в 2011 в году – 1,1% и 2012 году снизился до 0,8%.

К семейству *Enterobacteriaceae* принадлежало 3 культуры, что составило 32% от общего количества выделенных из мочи микробов. Штаммы были представлены родами *Escherichia*, *Klebsiella* и *Proteus*. Представители вида *Escherichia coli* составили 20,7% от всего семейства. В 2009, 2010 годах показатель высеваемости был более высоким – 20,9%, 23,9%, тогда как уже в 2011 и 2012 годах незначительно снизился до 19,6% и 18,5% соответственно. В динамике наблюдалось увеличение в спектре микрофлоры количества высевок бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* с 5% в 2009 году, 5,7% в 2010 году, 6,3% в 2011 году до 8,6% в 2012 году.

Средняя высеваемость *Proteus mirabilis* составила– 4,9%, с максимальными показателями в 2010 году 6,1%.

Микробы рода *Enterococcus* выделялись в 17,6% от общего количества выделенных из мочи микроорганизмов, причем доминировали культуры вида *Enterococcus faecalis* – 8,9%, наибольшая высеваемость наблюдалась в 2012 году и составила 10,6%, тогда как в 2009 году этот показатель составлял 7,8%, в 2010 году 7,1%, в 2011 году 10,2%.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* высевались из мочи в 2,4% случаев от общего количества выделенных микроорганизмов, и в период 2009-2012 года составили 0,9%, 1,8%, 4,9% и 2% соответственно.

В 2010, 2011 годах не было выделено бактерий рода *Acinetobacter*, тогда как в 2009 году и в 2012 году их высеваемость составляла 0,6% и 0,5% соответственно.

Из представителей, неферментирующих грамотрицательных бактерий, на долю которых приходилось 11,9 % от всех выделенных бактерий, нами выделялись представители двух родов – *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Представители вида *Ps. aeruginosa* в 2009 году имели высокий показатель высеваемости, который составлял 13,1%, и имел тенденцию к постепенному снижению в последующие годы на 1,1%: в 2010 году он составлял 11,1%, в 2011 году 10,9% и в 2012 году 11,4%. Таким образом, на фоне полиэтиологичности ИМП ведущую роль в этиологии ИМП из всех возбудителей, выделенных из мочи больных, играли представители вида *Escherichia coli*, которые от общего количества выделенных микроорганизмов в 2009–2012 годы составили 20,9%, 23,9%, 19,6% и 18,5% соответственно.

Анализ литературы показал, что результаты наших исследований соответствуют исследованиям авторов Пушкарева А.М. и Нестеровой М.В., также отмечавшим доминирование представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в частности бактерий вида *Escherichia coli* при инфекциях мочевыводящих путей.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

*М.У. Дусмагамбетов, А.М. Дусмагамбетова, О.С. Бутримова, М.Т. Бердюгин,
М.П. Гаврилов, О.В. Гаврилова, Т.А. Дружинина.*

АО «Медицинский университет Астана», г. Астана,
Бактериологическая лаборатория ЦСЭЭ г.Степногорска,
Республика Казахстан

Внебольничная пневмония (ВП; синоним: домашняя, амбулаторная) – острое инфекционное заболевание легких различной, преимущественно бактериальной этиологии, развившееся вне больницы или в первые 48–72 часа госпитализации. Чаще всего наблюдается у детей и лиц пожилого возраста. Остается достаточно высокой заболеваемость и смертность от этого заболевания. Согласно официальной статистике в России в 2003 г. доля пневмоний в общей структуре заболеваемости составила 4,1%.

Определение этиологии заболевания по клиническим симптомам малоинформативно. В тоже время этиологическая расшифровка ВП

остается крайне низкой и колеблется в широких пределах от 2,1% до 75%. Сложность лабораторной диагностики обусловлена, с одной стороны – особенностями этиологии заболевания, при котором значительную роль играют атипичные возбудители (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella spp.*, вирусы гриппа, парагриппа, респираторно–синцитиальный вирус, адено– и риновирусы), с другой стороны – отсутствием единых подходов к идентификации возбудителей.

Развитие бактериальных пневмоний связано с проникновением микроорганизмов в респираторную систему. Возникает ли при этом воспалительная реакция в паренхиме легких зависит от количества и вирулентности микроорганизмов, состояния защитных механизмов дыхательных путей и организма в целом.

Пневмококк играет первостепенную роль в качестве возбудителя пневмонии. Согласно международным и российским данным на внебольничную пневмококковую пневмонию приходится до 76% от этиологически расшифрованных случаев среди взрослых и до 94% – у детей.

Серьезной проблемой в борьбе с пневмококковой инфекцией во всем мире за последние 10–15 лет признается постоянно растущий уровень резистентности возбудителя к антибактериальным препаратам. В некоторых регионах России уровень резистентности к пенициллинам достигает 17,9%, а устойчивость к макролидам –12%, что диктует необходимость проведения постоянного мониторинга чувствительности, дальнейшей оптимизации и рационализации антибиотикотерапии.

В данной работе представлены результаты изучения этиологии ВП и определения чувствительности основных возбудителей к антибактериальным препаратам.

За период с 2008 по 2012 г.г. было исследовано 1257 проб мокроты от больных, находящихся на лечении в Степногорской Центральной городской больнице. Бактериологическое исследование мокроты проводилось по общепринятой методике в соответствии с утвержденными методическими указаниями. При этом было выделено 951 этиологически значимых культур микроорганизмов, высеваемость культур составила 73,3 %.

Посевы мокроты проводили количественным методом с определением диагностических титров микробной флоры. Мокроту собирали в стерильные широкогорлые банки с завинчивающимися крышками с соблюдением правил отбора и транспортировки. Посев проводили, после разжижения мокроты с использованием трипсина и приготовления серийных разведений до 10^5 , на чашки с питательными

средами (кровяной агар, шоколадный агар, МЖСА). Чувствительность к антибиотикам определяли диско – диффузионным методом.

Спектр возбудителей внебольничной пневмонии был представлен пневмококком и другими стрептококками (80,2%), условно–патогенными энтеробактериями (УПЭ) (10,3%), неферментирующими грамотрицательными бактериями (НГОВ) (3,6%), *St. aureus* (2,7%), *Candida* (2,1 %), *H. influenzae* (0,9%), при этом ассоциации микроорганизмов были выявлены в 7,2%.

По удельному весу, за анализируемый период времени, первостепенную роль занимают пневмококки, на долю *Str. pneumoniae* приходилось – 59,3% случаев ВП, *Str. haemolyticus* были выделены из 16,2% образцов, *Kl. pneumoniae* – 7,5%, прочих этиологически значимых микроорганизмов – 17,0%.

В 26,7 % случаев роста патогенной микрофлоры в мокроте больных пневмонией не обнаружено, что, вероятно, обусловлено заболеваниями вирусной природы или ее атипичными представителями, проведением антибактериальной терапии на догоспитальном этапе.

При определении антибиотикочувствительности выделенных штаммов микроорганизмов установлено, что резистентность пневмококка к пенициллину составляла 11,3%, к макролидным антибиотикам (5,4%). Наибольшей антибактериальной активностью к *Str. pneumoniae* обладали амоксициллин и ванкомицин: их эффективность составила 99,6%, ципрофлоксацина – 92,0 %.

Среди грамотрицательных микроорганизмов тяжелые формы ВП чаще всего вызывали *Kl. pneumoniae* (8,7%); количество антибиотикорезистентных штаммов клебсиелл составило к амикацину – 32,1%, ципрофлоксацину – 25,3%, гентамицину – (53,8%), цефотаксиму – (46,7%), амоксицилину – (57,3%), пиперацилину – (72,6%).

Была выявлена высокая резистентность *Ps. aeruginosa* ко многим антибиотикам (ципрофлоксацину, гентамицину, цефтазидиму, карбенициллину), которая варьировала от 26% до 64%. Наибольшей антибактериальной активностью к *Ps. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae* обладал меропенем и имипенем до 98,2%.

Таким образом, в структуре этиологических факторов основное место занимает пневмококк, который остается ведущим бактериологическим возбудителем ВП (59,3%). Большинство этиологически значимых штаммов микроорганизмов сохраняют антибиотикорезистентность (5,4% – 72,6% штаммов). Наиболее высокая резистентность ко многим антибиотикам отмечалась у грамотрицательных микроорганизмов *Kl. pneumoniae* (от 25,3% до 72,6%) и *Ps. aeruginosa* (от 26% до 64%).

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ НА МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН С ГЕНИТАЛЬНОЙ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

*М.А. Зотова, О.С. Абрамовских, Л.Ф. Телешева, И.Ю. Орнер,
И.Л. Батурина, К.В. Никушкина, О.И. Летьева*

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская
академия» Минздрава России, г. Челябинск

Течение и исход (элиминация или персистенция) любого инфекционного процесса представляет собой результат сложного характера взаимодействия вируса с его молекулярно–генетическими и функциональными свойствами, с одной стороны, и иммунной системой организма-хозяина с ее индивидуальными иммуногенетическими особенностями, с другой. Благодаря совершенствованию молекулярно–биологических методов исследования стало возможным определение вирусной нагрузки высокоонкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ), которая рассматривается в качестве одного из факторов риска персистенции вируса, и, как следствие прогрессии патологических изменений. Однако, несмотря на многочисленные исследования в области папилломавирусной инфекции (ПВИ), актуальным вопросом остается установление влияния концентрации вируса на механизмы локальной противоинфекционной защиты генитального тракта женщины. Целью работы стало изучение уровней вирусной нагрузки ВПЧ высокого риска и интерферонов цервикальной слизи у женщин с генитальной ПВИ.

Материалы и методы. В исследование вошли 120 женщин с ПВИ, которые ретроспективно были разделены на 2 группы: I группу составили 68 пациенток с отрицательными результатами ВПЧ-тестирования через 6 и 12 месяцев после первичного выявления ВПЧ высокого риска (транзиторное течение ПВИ), II группу – 52 женщины с положительным ВПЧ–тестом через 6 и 12 месяцев после первичного обследования (персистирующее течение ПВИ). Контрольную группу при иммунологическом исследовании составили 32 женщины с отрицательным ВПЧ–тестом, без клинико-морфологических изменений на шейке матки и иной гинекологической патологии. Для количественного определения ДНК ВПЧ высокого риска 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в цервикальных соскобах методом Real-time ПЦР использовали набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора,

г. Москва). Результаты полученных концентраций ДНК ВПЧ высокого риска выражались в lg (ВПЧ $\times 10^5$ клеток человека) и трактовались следующим образом: менее 3 lg – малозначимая, от 3 до 5 lg – значимая и более 5 lg – повышенная вирусная нагрузка. Количественное определение интерферонов (ИФН- α , ИФН- γ) в цервикальной слизи проводилось методом ИФА с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (г. Санкт-Петербург). Забор материала осуществляли в первую фазу менструального цикла до начала курса лечения. Для установления взаимосвязей между ДНК ВПЧ и интерферонами цервикальной слизи был проведен корреляционный анализ по Спирмену. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты исследования. Установлено, что средняя концентрация вируса в группе с транзитным течением ПВИ составила $3,26 \pm 0,32$ lg ВПЧ $\times 10^5$ клеток. При персистирующем течении ПВИ вирусная нагрузка была достоверно выше относительно группы транзитного течения инфекции и определялась на уровне $4,28 \pm 0,33$ lg ВПЧ $\times 10^5$ клеток ($p=0,04$). Анализ распределения вирусной нагрузки показал, что у 41,2% женщин с транзитным течением ПВИ обнаружена малозначимая нагрузка, в то время как значимая и повышенная концентрации ДНК ВПЧ высокого риска были выявлены в равном проценте случаев (29,4%). В группе с персистирующим течением ПВИ малозначимая вирусная нагрузка встречалась в 28,8% случаев, значимая – в 42,4%, повышенная – в 28,8%.

Результаты иммунологического исследования показали, что в цервикальной слизи женщин, у которых произошла элиминация вируса, концентрация ИФН- α составила $2382,95 \pm 372,14$ пг/мл, концентрация ИФН- γ – $1166,29 \pm 100,03$ пг/мл, что превышало аналогичные показатели у практически здоровых женщин ($785,40 \pm 164,61$ пг/мл и $803,50 \pm 65,66$ пг/мл, $p=0,01$ и $p=0,02$, соответственно). В то время как при персистирующем течении ПВИ уровень ИФН- α был сопоставим с контрольным значением ($994,78 \pm 160,62$ пг/мл) и достоверно ниже по сравнению с транзитной инфекцией ($p=0,01$).

Корреляционный анализ показал, что в группе с транзитным течением инфекции концентрация вирусной ДНК была связана с ИФН- γ , что отражает вовлеченность вирусной нагрузки ВПЧ в работу иммунных механизмов. В группе с персистенцией ВПЧ не установлено корреляций между вирусной нагрузкой и показателями ИФН- α и ИФН- γ , что свидетельствует об отсутствии активации факторов местного иммунитета на выявленную в данной группе женщин дозу антигена и препятствует удалению вируса, поддерживая хроническое течение ПВИ.

Таким образом, высокая антигенная нагрузка в сочетании с нарушением продукции интерферонов цервикальной слизи способствует хронизации ВПЧ–инфекции в цервикальном эпителии. В то время как адекватный ответ иммунной системы даже в условиях низкой концентрации онкогенных типов ВПЧ способствует успешной элиминации вируса.

МНОЖЕСТВЕННАЯ И ОБШИРНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ, ОТБЫВАЮЩИХ НАКАЗАНИЕ

Н.М. Корецкая, Н.В. Пыринова

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск
Краевая туберкулезная больница №1 ГУФСИН по Красноярскому краю

Последние два десятилетия в Российской Федерации характеризуются неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по туберкулезу, проявившейся не только высокими показателями заболеваемости и смертности от этого заболевания, но и ростом доли остroteкущих и жизнеугрожающих форм специфического процесса. Положение усугубляется снижением эффективности лечения, связанным не только с ухудшением структуры заболеваемости, но и с ростом случаев с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ), особенно множественной. Туберкулез, вызванный МБТ с множественной лекарственной устойчивостью, является наиболее опасной формой болезни, так как при этом имеет место лекарственная устойчивость к наиболее сильным противотуберкулезным препаратам: изониазиду и рифампицину, независимо от наличия или отсутствия лекарственной резистентности к другим препаратам.

Лечение туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью МБТ более длительное, а применяемые при этом противотуберкулезные препараты являются дорогостоящими и имеют больше побочных эффектов, что увеличивает стоимость лечения в 80–100 раз. Не выявленные и оставшиеся без лечения больные туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью МБТ становятся постоянным источником распространения лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя, что в последствие приводит к дополнительным расходам и летальности от туберкулеза.

В этой связи в резолюции IX съезда фтизиатров России, состоявшегося 1–3 июня 2011 года в г. Москве, отмечена необходимость

разработки оптимальных режимов химиотерапии больных туберкулезом с учетом лекарственной устойчивости возбудителя, рост которой, особенно множественной, является одной из главных проблем современной фтизиатрии. Россия входит в число 27 стран, в которых находится 86% всех случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью МБТ в мире.

Наряду с ростом частоты множественной лекарственной устойчивости МБТ, в последние годы особую тревогу у фтизиатров вызывает появление штаммов МБТ с обширной лекарственной устойчивостью, которая представляет собой сочетание множественной лекарственной устойчивости с резистентностью к фторхинолонам и одному из инъекционных противотуберкулезных препаратов резервного ряда. Обширная лекарственная устойчивость является на сегодняшний день наиболее тяжелым видом лекарственной резистентности.

Особую остроту приобретает проблема туберкулеза с множественной и обширной лекарственной устойчивостью в условиях пенитенциарной системы: не зря заключенных считают настоящим «рассадником» лекарственно-устойчивого туберкулеза. Показатели лекарственной устойчивости МБТ у больных в пенитенциарных учреждениях значительно превосходят таковые по регионам, в которых они находятся, что свидетельствует об активной трансмиссии туберкулеза между заключенными.

Цель исследования: изучить структуру клинических форм и социальную характеристику больных туберкулезом легких, выделяющих микобактерии с вторичной множественной и обширной лекарственной устойчивостью.

В разработку взяты данные из историй болезни 70 осужденных мужчин, больных туберкулезом легких, лечившихся в Краевой туберкулезной больнице №1 ГУФСИН, из которых у 15 больных имел место рецидив специфического процесса, а у 55 – его хроническое течение. Все больные выделяли МБТ с множественной и обширной лекарственной устойчивостью (бактериовыделение установлено путем посева мокроты на питательную среду Левенштейна-Йенсена; исследование лекарственной чувствительности штаммов МБТ проводилось стандартным непрямым методом абсолютных концентраций).

Изучение социального статуса больных показало, что наибольшую долю составляли лица, имевшие 3 и более судимости (77,1%); 35,7% имели только начальное или не законченное среднее образование. Семью имели лишь 65,7%. Распространенными были вредные привычки: 100% курили; до заключения злоупотребляли

алкоголем – 24,3%, употребляли наркотики – 44,3%, являлись токсикоманами – 2,9%.

Длительность заболевания до 5 лет составила 35,7%, от 5 до 10 лет – 37,1%, свыше 10 лет – 27,2%. По формам туберкулезного процесса больные распределились следующим образом: диссеминированная – 21,4%, инфильтративная – 35,7%, туберкулема – 12,9%, фиброзно-кавернозная – 30,0%.

Рентгено–томографическое исследование установило выраженное преобладание распространенных процессов. Так, долевыми поражениями имели место у 31,4% больных, захватывающие более доли легкого у 34,3%, тотальное поражение обоих легких отмечено в 10,0% случаев. Деструкция легочной ткани определялась у 92,5% больных. Осложнения туберкулезного процесса в виде легочно–сердечной недостаточности наблюдались у 51,4% больных. Подавляющее большинство больных (90,0%) имело сопутствующие заболевания. Из заболеваний группы риска наибольший удельный вес составили хронические неспецифические заболевания легких – 48,6%, ВИЧ-инфекция – 8,6%, язвенная болезни желудка и двенадцатиперстной кишки – 5,7%. Гепатит В и С диагностирован соответственно у 41,4% и 34,3% больных.

Классическая множественная лекарственная устойчивость (устойчивость только к изониазиду и рифампицину) наблюдалась у 26,7% больных с рецидивом и у 18,2% с хроническим течением специфического процесса.

Частота сочетания множественной лекарственной устойчивости с резистентностью к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда у больных с рецидивом и с хроническим течением туберкулеза легких была различной.

При рецидиве туберкулезного процесса у больных преобладало сочетание множественной лекарственной устойчивости с резистентностью к противотуберкулезным препаратам основного ряда – 66,7%.

У больных с хроническим течением туберкулеза легких такая устойчивость наблюдалась реже – 48,1%, а в 51,9% случаев множественная лекарственная устойчивость сочеталась с резистентностью к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда. При этом наибольший удельный вес приходился на сочетание: изониазид + рифампицин + стрептомицин + этамбутол + канамицин – 25,9%.

У 21,8% больных с хроническим течением специфического процесса определена обширная лекарственная устойчивость, которая,

как уже отмечалось ранее, представляет наиболее тяжелый вид лекарственной устойчивости.

Лечение больных осуществлялось по IV и по индивидуальным режимам химиотерапии. Плохая переносимость противотуберкулезных препаратов наблюдалась в 17,1% случаев. Оперативное лечение было показано 38,6% больным, однако прооперировано было лишь 3 больных (4,3%); 34,3% больных от оперативного лечения отказались.

Эффективность лечения была низкой: у больных с рецидивом прекращения бактериовыделения наблюдалось в 46,7% случаев, закрытие полостей распада – в 46,7%, с хроническим течением соответственно в 20,0% и 20,9%.

Таким образом, у больных туберкулезом, отбывающих наказание в пенитенциарных учреждениях, особенно при хроническом течении заболевания, имеет место высокая частота сочетания множественной лекарственной устойчивости с лекарственной резистентностью к противотуберкулезным препаратам как основного, так и резервного ряда. Сочетание низкой эффективности лечения и социальной дезадаптации больных делает их высокоопасными в эпидемиологическом отношении. В лечении таких больных требуется не только соблюдение режимов химиотерапии с учетом лекарственной чувствительности МБТ, но и повышение оперативной активности, а также применение как патогенетической терапии и коллапсотерапии, так и современных методов лечения: локорегиональной химиотерапии и клапанной бронхоблокации. В настоящее время в Краевой туберкулезной больнице №1 ГУФСИН вышеперечисленные методы лечения внедрены в практику, что, несомненно, позволит повысить эффективность лечения и самое главное – предотвратить распространение штаммов МБТ с множественной и обширной лекарственной устойчивостью.

КОЛИЧЕСТВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ОБРАЗОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СЕКРЕТА В ОТВЕТ НА АКТИВАЦИЮ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ

Ю.С. Шишкова, В.А. Маркова, А.Ю. Савочкина, Т.Г. Смирнова, К.Е. Пряхина

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Челябинск

Репродуктивное здоровье является важнейшей частью общего здоровья и занимает центральное место в развитии человека.

Репродуктивное здоровье касается личных и в высшей степени ценных аспектов жизни. Все большее внимание исследователей в настоящее время привлекает изучение факторов местного иммунитета репродуктивного тракта женщины на уровне влагалища и шейки матки, они являются «первой линией» противоинфекционной защиты, которая или предупреждает, или ограничивает размножение микроорганизмов и препятствует их проникновению в матку.

Основным барьером на пути восходящей инфекции между бактериально обсемененным влагалищем и стерильной полостью матки является шейка матки. Она представляет собой своеобразный биологический барьер, который предупреждает инфицирование верхних отделов полового тракта.

В состав местного иммунного комплекса слизистой оболочки влагалища и шейки матки входит два компонента: гуморальный (секреторный) и клеточный.

Исследования, проведенные В.Ф. Долгушиной, установили, что в вагинальной и цервикальной слизи определяется значительное количество лейкоцитов, сопоставимое с их содержанием в периферической крови. Клеточный состав вагинального и цервикального секрета представлен преимущественно нейтрофильными гранулоцитами, которые составляют 93 – 97% от всех лейкоцитов.

Нейтрофилы, являющиеся основной клеточной популяцией секрета эндоцервикса и выступающие в качестве элементов “первой линии” противомикробной защиты, привлекают особенно пристальное внимание исследователей.

Нейтрофилы после миграции обладают повышенной фагоцитарной и протеолитической активностью и полностью сохраняют потенциал бактерицидных белков.

После активации нейтрофил решает свои эффекторные задачи одним из способов: либо с помощью фагоцитоза, либо путем активации биологически активных веществ. Однако недавно был описан новый противомикробный механизм нейтрофилов, который заключается в способности активированных нейтрофильных гранулоцитов "выбрасывать" сетевидные образования, в которых задерживаются, нейтрализуются, а затем и погибают микроорганизмы. Эти новые структуры получили название нейтрофильных экстрацеллюлярных ловушек (NET-Neutrophil Extracellular Traps). Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) представляют собой очень тонкие нити, которые впервые были обнаружены с помощью электронной микроскопии. НВЛ состоят из нуклеиновых кислот и ферментов, секретируемых нейтрофилами в ответ на микробные и немикробные

стимулы. По данным исследования проведенного научным коллективом НИИ иммунологии и кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «ЧелГМА Минздрава России» нейтрофильные ловушки присутствуют в вагинальном и цервикальном секрете и способны влиять на репродуктивное здоровье женщины.

Целью нашего исследования явилась оценка количества нейтрофильных внеклеточных ловушек образуемых нейтрофильными гранулоцитами в цервикальном секрете в ответ на микробный стимул.

Материалы и методы. За период с 2010 по 2012 годы на базе НИИ иммунологии и кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «ЧелГМА Минздрава России» были обследованы 20 здоровых женщин в первую и во вторую фазы менструального цикла. Женщины не имели жалоб на состояние здоровья и не болели в течение последних трех месяцев. Средний возраст обследуемых составил $24,3 \pm 1,3$ года. Забор цервикальной слизи осуществлялся с помощью специальной градуированной пипетки на 7-10 и 21-23 дни менструального цикла. Полученный материал помещался в 1,0 мл раствора Хенкса и тщательно суспензировался.

Для оценки количества внеклеточных ловушек в цервикальном секрете был применен способ обнаружения нейтрофильных внеклеточных ловушек в мукозальных секретах (Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю., 2012г.RU 2463349). Полученная суспензия в объеме 0,1 мл смешивалась с 0,1 мл сложного красителя, который готовился из двух красителей: синьки Эванса для окрашивания жизнеспособных нейтрофилов и слизи, и Sytox Green для окрашивания мертвых нейтрофильных гранулоцитов и волокон ДНК. Учет нативных препаратов проводился с помощью люминесцентного микроскопа. В мазках учитывались жизнеспособные клетки ярко-оранжевого цвета; клетки с зеленым ядром и ярко-оранжевой цитоплазмой (клетки, вероятно подвергшиеся апоптозу); погибшие клетки зеленого цвета; свободнолежащие ярко-зеленые волокна, представляющие собой нити ДНК нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофильные внеклеточные ловушки). Проводился подсчет 100 структур разных групп и определялось процентное содержание каждой морфологической единицы.

В качестве микробного активатора клеток нами применялся растворимый препарат Пирогенал (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Медгамал, Россия) – липополисахарид, выделенный из клеток *Salmonella typhi*. Препарат относится к группе природных иммуномодуляторов, усиливает

фагоцитоз, повышает общую и специфическую устойчивость организма. Действие пирогенала исследовали в концентрации 0,02 мкг/мл, что соответствует разовой терапевтической дозе. Время активации составляло 30 минут при температуре 37 °С. Полученные результаты исследования были обработаны методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$), с помощью пакетов статистических программ Statistica For Windows 6.0. Для расчетов применялся непараметрический критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования. В результате исследования морфологических форм интактных нейтрофильных гранулоцитов цервикального секрета здоровых женщин было установлено, что количество жизнеспособных клеток и количество нейтрофильных внеклеточных ловушек не зависят от фазы менструального цикла. Количество живых клеток в обе фазы менструального цикла составило около 35 процентов от общего числа клеток, а количество внеклеточных ловушек составило около 7 процентов. Во вторую фазу менструального цикла в цервикальном секрете наблюдается достоверное уменьшение количества мертвых клеток по сравнению с этим показателем у женщин в первую фазу менструального цикла с 14% до 5%, при этом количество апоптозных нейтрофилов в цервикальном секрете у женщин во вторую фазу было значимо выше, чем у женщин в первую фазу менструального цикла 58% и 40% соответственно.

При инкубации цервикального секрета с микробным препаратом Пирогеналом наблюдалось статистически значимое увеличение количества нейтрофильных внеклеточных ловушек более чем в два раза по сравнению с группой без активации с 7% до 18% как у женщин в первую, так и у женщин во вторую фазу менструального цикла. При этом также наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток в два раза в обеих группах с 35% до 17%. Количество мертвых и апоптозных клеток после активации Пирогеналом оставалось неизменным. Эти данные позволяют предположить, что в процессе образования нейтрофильных внеклеточных ловушек принимают участие жизнеспособные нейтрофильные гранулоциты, присутствующие в секрете шейки матки.

Заключение. По результатам исследования было установлено, что количество жизнеспособных нейтрофильных гранулоцитов и количество внеклеточных ловушек в цервикальном секрете у здоровых женщин не зависит от фазы менструального цикла и остается постоянным в течение всего цикла.

Активация микробным препаратом Пирогеналом приводит к увеличению показателей количества нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что у женщин во время менструального цикла происходят изменения морфологического состава популяции нейтрофильных гранулоцитов цервикального секрета. Во вторую фазу менструального цикла происходит увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов, находящихся в состоянии апоптоза и уменьшение количества погибших нейтрофилов.

Дополнительное стимулирование липополисахаридом приводит к более эффективному антимикробному ответу нейтрофильных гранулоцитов слизистых оболочек за счет формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента МД-2246.2012.7

МИКРОБНАЯ ТРАНСЛОКАЦИЯ И АКТИВАЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ ВИЧ– ИНФЕКЦИЕЙ

Г.Р. Хасанова, О.И. Биккинина

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет»

Республиканский центр по профилактике и борьбе со
СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ, г. Казань

Транслокация компонентов бактерий, в частности, эндотоксина грамотрицательных микроорганизмов, через стенку кишки рассматривается как одна из возможных причин гиперактивации иммунной системы при ВИЧ-инфекции с последующим прогрессированием заболевания. Повышение проницаемости стенки кишки может быть обусловлено массивной гибелью кишечного пула CD4-лимфоцитов, в особенности, на острой стадии заболевания, существенным снижением экспрессии белков, обеспечивающих межэпителиальные связи, продолжающейся репликацией вируса и постоянным воспалением стенки кишки, а также нарушениями микробиоценоза кишечника. Признанным маркером микробной транслокации является липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий или эндотоксин. Известно, что эндотоксин является мощнейшим биологически активным веществом, избыток

которого в общем кровотоке может быть одной из причин развития синдрома системного воспалительного ответа.

Целью нашего исследования явилась оценка показателей неспецифических маркеров воспаления - провоспалительных цитокинов интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и фактора некроза опухоли (ФНО) во взаимосвязи с показателями эндотоксинемии у больных ВИЧ-инфекцией.

Материалы и методы: В исследуемую группу вошли 232 пациента на разных стадиях ВИЧ-инфекции. 48,3% из них составили мужчины. Средний возраст пациентов составил $34 \pm 7,4$ года. Клинические проявления оппортунистических инфекций наблюдались у 39% пациентов; в том числе, у 26,3% больных регистрировался орофарингеальный кандидоз, у 15,5% - туберкулез, у 7,3% - волосистая лейкоплакия языка. Средний уровень CD4-клеток ($M \pm SD$) составил $288,1 \pm 217$ в 1 мкл, средняя концентрация РНК ВИЧ в ПЦР ($M \pm SD$) - $3,3 \pm 2,2$ Log10 копий/мл. Антиретровирусную терапию получали 23,7% пациентов. Группу сравнения составили 26 здоровых добровольцев.

Содержание эндотоксина в сыворотке крови определялось с помощью «микро-ЛАЛ-теста» (E-toxate, Sigma), концентрация ИЛ-1 β и ФНО - в ИФА (тест-система производства «Вектор-бест»). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы Portable Statistica 8. Нормальность распределения количественного признака в вариационном ряду оценивалась с помощью критерия Шапиро-Уилка. При сравнении двух непрерывных рядов данных использовали t-критерий Стьюдента, для оценки корреляции - метод Спирмана.

Результаты: Эндотоксин присутствовал в образцах сыворотки всех 232 пациентов; у большинства из них - 121 чел. (52,2%) его показатель превышал максимальный показатель, выявленный в группе сравнения. Среднегрупповой показатель концентрации эндотоксина ($M \pm SD$) составил $2,2 \pm 2,03$ EU/мл и значимо ($p < 0,00001$) превышал средний показатель контрольной группы ($0,67 \pm 0,28$ EU/мл). Определение ИЛ-1 β проведено у 155 человек; у всех обследованных получены положительные результаты теста; у 63,2% показатель ИЛ-1 β превышал уровни здоровых людей. При этом среднегрупповой показатель концентрации ИЛ-1 β ($M \pm SD$) составил $44,0 \pm 120,4$ пг/мл и значимо ($p = 0,000008$) превышал средний показатель контрольной группы ($0,4 \pm 0,8$ пг/мл). Фактор некроза опухоли был исследован у 67 пациентов; у 34,3% из них отмечены показатели, превышающие показатели здоровых людей. Также выявлена статистически значимая разница между средним показателем концентрации ФНО в исследуемой

и контрольной группе ($M \pm SD$) ($9,0 \pm 17,56$ пг/мл и $0,21 \pm 0,42$ пг/мл, соответственно; $p=0,0001$).

Не выявлено зависимости концентрации эндотоксина сыворотки, ИЛ-1 β и ФНО от стадии заболевания, выраженности иммуносупрессии и наличия оппортунистических инфекций.

При проведении корреляционного анализа выявлены статистически значимые положительные связи эндотоксина с ИЛ-1 β ($r=0,27$; $p=0,0007$) и ИЛ-1 β с ФНО ($r=0,45$; $p=0,00012$).

Заключение: Выявленные факты гиперэндотоксинемии и повышения уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО подтверждают наличие феномена активации системных воспалительных реакций у пациентов с ВИЧ-инфекцией, возможно, являющегося следствием активирующего действия эндотоксина на клетки моноцитарно–макрофагальной системы. Все это, в конечном итоге, определяет перспективность разработки и использования в лечения ВИЧ-инфекции дополнительно к антиретровирусным препаратам комплекса терапевтических мероприятий, направленных на уменьшение проницаемости стенки кишки, снижение уровня сывороточного эндотоксина и купирование синдрома системного воспалительного ответа.

**РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
N. GONORRHOEAE В РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН
(2010-2011 гг.)**

А.Р. Фахуртдинова.

ЦБЛГАУЗ РККВД г. Казань.

Наша лаборатория начиная с 2006 года по 2011 год участвовала в мониторинге по антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*. Работа проводилась в рамках подпрограммы «Инфекции, передаваемые половым путем» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007–2011 годы)». В Московский ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологии» было направлено 500 штаммов *N. gonorrhoeae*. Работа была организована следующим образом: из 6 поликлиник нашего диспансера в транспортной среде Стюарт с углем выделения от пациентов с острой неосложненной гонореей направлялись в ЦБЛ. Для посева использовалась селективная среда *Neisseria*. Полученный биологический материал сохранялся в условиях низкой температуры – 80 С. В дальнейшем штаммы, в крио–

среде переправлялись в ГНЦД в системе «холодовой цепи», позволяющей сохранять штаммы микроорганизма в замороженном виде на протяжении всего пути транспортировки.

Параллельно с этим наша лаборатория проводила изучение антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* диско – диффузионным методом, согласно МУК 4.2.1890–04. (Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам).

При выборе спектра антибактериальных препаратов, к которым определялась резистентность *N. gonorrhoeae*, учитывались данные устойчивости к АМП, рекомендации по лечению гонококковой инфекции и реально существующая практика терапии гонореи в РТ. После установления принадлежности микроорганизмов к виду *N. gonorrhoeae* определяли чувствительность возбудителя к следующим антимикробным препаратам:

- пенициллин и тетрациклин (данные антибиотики в настоящее время не рекомендуют для лечения гонореи; в формировании устойчивости гонококков к этим антибиотикам принимают участие ряд общих механизмов, которые могут вносить определенный вклад и в устойчивость бактерий к цефалоспорином и фторхинолонам. Устойчивость к пенициллину и тетрациклину может служить маркером общего уровня антибактериальной резистентности гонококков);
- цефтриаксон (включен в исследование как основной препарат, используемый для лечения гонореи. Этот антибиотик может рассматриваться как индикатор для всей группы цефалоспоринов, поскольку между антибиотиками данной группы наблюдают значительную перекрестную резистентность);
- ципрофлоксацин (включен в исследование как индикаторный препарат для оценки состояния резистентности гонококка к препаратам группы фторхинолонов, т. к. между всеми известными фторхинолонами наблюдают полную перекрестную резистентность);
- спектиномицин (включен в исследование как важный альтернативный препарат для лечения гонореи);
- азитромицин (антибиотик включен в исследование как один из потенциальных препаратов резерва).

Сравнительный анализ результатов мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*, проводившегося в 2010–2011 годах, показал, что увеличилось число штаммов не чувствительных к пенициллину с 71% в 2010 году до 79% в 2011 году, к тетрациклину с 65% в 2010 году до 82% в 2011 году. Число штаммов не чувствительных к ципрофлоксацину составило 51% и 53%.

Отмечено также возрастание резистентности к спектиномицину с 3,5% до 7,6%, азитромицину с 1,1% до 5,1%. Зарегистрирован высокий уровень чувствительности к цефтриаксону 100%.

Выводы: Препаратом выбора в лечение гонореи в РТ является цефтриаксон. Лечение гонореи азитромицином, спектиномицином следует проводить только под контролем определения чувствительности. Необходимо исключить из схем лечения гонококковой инфекции пенициллин, тетрациклин, ципрофлоксацин, так как уровень резистентности к ним высокий.

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ: ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ВЛИЯНИЕ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФИЛЬТРАТИВНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Н.М. Корецкая, А.А.Наркевич

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого», г. Красноярск

Неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в современных условиях во многом связана с изменениями биологических свойств возбудителя заболевания, в частности с абсолютным и относительным увеличением лекарственно устойчивых микроорганизмов. Динамические изменения частоты лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ), ее характера и спектра подробно изучены.

Значительно менее изучен вопрос об изменениях другого биологического свойства МБТ, а именно, их жизнеспособности по скорости и массивности роста, несмотря на то, что она имеет важное прогностическое значение. Исследованиями последних лет доказано, что степень жизнеспособности МБТ определяет тяжесть течения, характеристику специфического процесса и эффективность его лечения и жизнеспособность МБТ имеет коррелятивную связь с основными эпидемиологическими параметрами (заболеваемостью, смертностью, эффективностью лечения и др.).

В этой связи изучение изменений биологического свойства возбудителя, а именно, его жизнеспособности в динамике, а также ее влияния на клинические проявления заболевания при наиболее часто встречающейся форме специфического процесса – инфильтративном туберкулезе легких, представляет несомненный интерес.

Цель работы – проанализировать изменение жизнеспособности МБТ при инфильтративном туберкулезе легких, произошедшие с 2003

по 2011 гг, а также изучить клинические проявления данной формы специфического процесса в зависимости от данного биологического свойства МБТ.

Работа проводилась в 2 этапа. На первом этапе нами были выкопированы данные из историй болезни 256 больных инфильтративным туберкулезом легких, в возрасте от 16 до 70 лет, находившихся на стационарном лечении в Красноярском краевом противотуберкулезном диспансере №1: в 2003 году – 128 больных (I-я группа) и в 2011 году – 128 больных (II-я группа).

Все больные были впервые выявлены, являлись бактериовыделителями. Бактериовыделение установлено путем посева мокроты на питательную среду Левенштейна-Йенсена. Жизнеспособность культур МБТ, выделенных из мокроты больных до начала лечения, оценивалась по критериям скорости и массивности роста: при росте МБТ менее 20 колоний со скоростью более 30 суток жизнеспособность считали низкой, при росте более 100 колоний со скоростью менее 30 суток – высокой.

На втором этапе исследования нами были изучены особенности начала заболевания, его симптоматика, рентгенологические и лабораторные данные, а также эффективность лечения инфильтративного туберкулеза легких у 45 больных, у которых из мокроты был выделен возбудитель с высокой жизнеспособностью и у 45 больных, выделяющих МБТ с низкой жизнеспособностью.

Результаты исследования были оценены согласно общепринятым методам статистического анализа. Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию t Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Как показали результаты первого этапа исследования, в динамике увеличился удельный вес обильного роста МБТ с $27,3 \pm 3,9\%$ в I-й группе до $40,6 \pm 4,3\%$ во II-й, то есть в 1,5 раза ($p < 0,05$) и снизился скудного (с $58,6 \pm 4,4\%$ до $28,9 \pm 4,0\%$; $p < 0,001$). Полученные данные свидетельствуют о возросшей массивности бактериовыделения у больных инфильтративным туберкулезом в современных условиях, а следовательно, об их возросшей эпидемиологической опасности. Кроме этого во II-й группе, по сравнению с I-й, снизилась доля МБТ с быстрым ростом с $69,5 \pm 4,1\%$ до $39,8 \pm 4,3\%$ ($p < 0,001$) и возросла – с замедленным с $30,5 \pm 4,1\%$ до $60,2 \pm 4,3\%$ ($p < 0,001$). Так, если средняя скорость роста МБТ в I-й группе составила $28,3 \pm 1,0$ день, а во II-й – $33,7 \pm 0,9$ дня ($p < 0,001$). Несмотря на изменение скорости и массивности роста МБТ, степень их жизнеспособности не изменилась: в I-й группе высокой жизнеспособностью обладали $27,3 \pm 3,9\%$ штаммов МБТ, во II-й –

28,1±4,0% ($p>0,05$); низкой – соответственно 27,3±3,9% и 25,0±3,8% ($p>0,05$).

Как уже отмечалось ранее, на втором этапе исследования нами были изучены клинические проявления инфильтративного туберкулеза легких у больных с различной степенью жизнеспособности МБТ.

Рентгено–томографическое исследование легких показало, что у больных с низкой жизнеспособностью МБТ на долю бисегментарных поражений приходилось 48,2%. Этот показатель значительно превышал таковой у больных с высокой жизнеспособностью МБТ (13,3%; $p<0,001$). В тоже время у больных с высокой жизнеспособностью МБТ был выше удельный вес процессов, занимающих долю легкого (60% против 35,6% во II-й группе; $p<0,05$) и более (соответственно 26,7% против 12,6%). Распад легочной ткани имел место у больных с высокой жизнеспособностью МБТ в 97,8%; у больных с низкой жизнеспособностью МБТ этот показатель был достоверно ниже – 60,0% ($p<0,001$). Различной была и частота бронхогенного обсеменения: у больных с высокой жизнеспособностью МБТ она была достоверно выше, чем у больных с низкой (62,2±7,2% против 40,0±7,3%; $p<0,05$). При этом одновременное наличие бронхогенного обсеменения в пораженном и противоположном легком наблюдалось у больных с высокой жизнеспособностью МБТ в 2,4 раза чаще, чем у больных с низкой (соответственно 31,1±6,9% и 13,3±5,1%; $p<0,05$).

Сочетание поражения легочной ткани со специфическим поражением плевры и бронхов наблюдалось у 6,6% больных с высокой жизнеспособностью МБТ; среди больных с низкой жизнеспособностью МБТ, - таких случаев не было.

Анализ начальных клинических проявлений заболевания показал наличие значительно меньшей доли бессимптомного его начала у больных с высокой жизнеспособностью МБТ (13,3±5,1% против 51,1±7,5%; $p<0,001$), а также большего удельного веса острого начала (26,7±6,6% против 4,3±3,1%; $p<0,01$), что находилось в прямой зависимости от объема поражения легочной ткани и частоты ее деструкции, наличия бронхогенного обсеменения, большей его распространенности и было связано, по нашему мнению, с высокой жизнеспособностью возбудителя.

Отмечена большая выраженность симптомов интоксикации и бронхолегочной симптоматики у больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью: повышение температуры до субфебрильной и фебрильной имело место у 31,1±6,9% больных против 13,3±5,6% у больных с низкой жизнеспособностью МБТ ($p<0,05$); такие же различия

наблюдались и для другого симптома интоксикации – похудания. У больных с высокой жизнеспособностью МБТ, по сравнению с больными с низкой жизнеспособностью МБТ, чаще наблюдался продуктивный кашель ($64,4 \pm 7,1\%$ против $20,0 \pm 6,0\%$; $p < 0,001$), что сопровождалось более выраженной аускультативной картиной: чаще определялся измененный характер дыхания ($71,1 \pm 6,8\%$ против $48,9 \pm 7,5\%$; $p < 0,05$), равно как и катаральные явления в легких ($20,0 \pm 6,0\%$ против $2,2 \pm 2,2\%$; $p < 0,01$).

Особо следует остановиться на частоте одышки, которая более чем в 5 раз чаще встречалась у больных с высокой жизнеспособностью МБТ ($35,5 \pm 7,1\%$ против $6,7 \pm 3,7\%$; $p < 0,001$), что по-нашему мнению обусловлено двумя факторами: во-первых, большим удельным весом распространенных поражений легочной ткани, более высокой частотой ее деструкции и бронхогенного обсеменения, в том числе с поражением обоих легких у больных с высокой жизнеспособностью МБТ; во-вторых, в механизме одышки у больных этой группы, несомненно, играет роль более выраженный интоксикационный синдром.

Таким образом, клинические проявления инфильтративного туберкулеза легких у больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью, отличались от таковых при специфическом процессе у больных, выделяющих возбудителя с низкой жизнеспособностью, большей выраженностью как в плане интоксикационного, так и бронхолегочного синдромов, что закономерно привело первых к более частому выявлению заболевания при обращении за медицинской помощью (соответственно $46,7\%$ и $26,7\%$; $p < 0,05$). У больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью, имелись более значительные сдвиги в гемограмме: чаще наблюдался лейкоцитоз, лимфопения, увеличение СОЭ, реже – лимфоцитоз. Наличие почти в 2 раза большей частоты лимфопении у больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью, по сравнению с больными, выделяющими МБТ с низкой жизнеспособностью ($64,4 \pm 7,1\%$ против $35,6 \pm 7,1\%$; $p < 0,01$), предполагает наличие у первых более выраженного иммунодефицита, что требует назначения иммунокорректирующей терапии на ранних этапах лечения. Лейкоцитоз отмечался у больных с высокой жизнеспособностью МБТ в 4,5 раза чаще, чем у больных с низкой ($20,0 \pm 6,0\%$ против $4,4 \pm 3,1\%$; $p < 0,05$). Особо обращают на себя внимание различия в изменениях такого показателя как СОЭ: у больных с высокой жизнеспособностью МБТ значительное (более 30 мм/час) увеличение СОЭ отмечено в $66,7 \pm 7,0\%$, что выше, чем у больных с низкой жизнеспособностью МБТ – $28,9 \pm 6,8\%$ ($p < 0,001$) при средних

показателях СОЭ $39,1 \pm 2,8$ мм/час у больных, выделяющих МБТ с высокой жизнеспособностью и $23,0 \pm 2,4$ мм/час – с низкой ($p < 0,001$), что подтверждает более выраженную остроту процесса у больных с высокой жизнеспособностью возбудителя.

Эффективность лечения больных с высокой жизнеспособностью МБТ, пролеченных более трех месяцев, составила по прекращению бактериовыделения 52,8%, закрытию полостей распада – 47,2%. Показатели эффективности лечения больных с низкой жизнеспособностью МБТ были выше (соответственно 75,6% и 58,5%).

Более высокие показатели эффективности лечения больных, выделяющих МБТ с низкой жизнеспособностью, связаны, по нашему мнению, со значительно меньшей степенью выраженности лимфопении, свидетельствующей о наличии иммунодефицита, по сравнению с больными, выделяющие МБТ с высокой жизнеспособностью.

Следовательно, инфильтративный туберкулез легких, сопровождающийся выделением МБТ с высокой жизнеспособностью, по сравнению со специфическим процессом с выделением возбудителя с низкой жизнеспособностью, характеризуется более острым началом заболевания, большей частотой распространенных деструктивных процессов, сопровождающихся бронхогенным обсеменением, в том числе двусторонним, сочетанием поражения легких с поражением плевры и бронхов, большей выраженностью клинических проявлений заболевания и изменений в гемограмме, что позволяет предположить наличие прямой связи между жизнеспособностью МБТ и их вирулентностью.

Таким образом, в динамике отмечены изменения проявлений жизнеспособности (увеличение доли обильного роста с одновременным замедлением его скорости). Степень жизнеспособности возбудителя определяет клиническую характеристику специфического процесса и эффективность его лечения. Инфильтративный туберкулез легких, сопровождающийся выделением МБТ с высокой жизнеспособностью, отличается от такового с выделением МБТ с низкой жизнеспособностью, большим объемом поражения, более высокой частотой деструкции, бронхогенным обсеменением и его протяженностью, полиорганностью поражения, большей выраженностью интоксикационного и бронхолегочного синдромов, изменений в гемограмме, что позволяет предположить наличие прямой связи между жизнеспособностью МБТ и их вирулентностью. Эффективность лечения инфильтративного туберкулеза легких обратно пропорциональна степени

жизнеспособности МБТ, выделяемых больными: чем она выше, тем ниже эффективность лечения специфического процесса в легких.

СПЕЦИФИКА ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА У ЖИВОТНЫХ В СМЕШАННОВИДОВЫХ ЭКСПОЗИЦИЯХ ЗООПАРКОВ

Р.Я. Гильмутдинов.

ФГБОУ ВПО «Казанская государственная
академия ветеринарной медицины
имени Н.Э.Баумана», г. Казань

Вопросы инфекционной патологии, имеющие место в моновидовых группах, как правило, усугубляются в смешанновидовых экспозициях, и важно тщательно выбирать виды, чтобы избежать или минимизировать вероятность заражения животных. Связано это с повышением вероятности межвидовой передачи инфекционных агентов. Риск трансмиссии болезней между видами в этих условиях значительно возрастает.

Потенциальная возможность передачи болезней имеет место даже при отсутствии физического контакта между животными. Особую актуальность эта проблема приобретает при совместной демонстрации животных одинаковых ландшафтов, но, нередко, разных континентов. Инфекционные патогены обладают способностью адаптироваться к существующим условиям так, что им всегда находится подходящий хозяин, они способны преодолевать межвидовые барьеры, что заслуживает особого внимания. Предполагается, что эта способность играет более важную роль, чем считалось ранее.

Кроме того, натуралистические смешанновидовые экспозиции являют возможность передачи болезни не только между собственно коллекционными животными, но, также от местной дикой фауны, представители которой могут иметь или получить доступ к экспозиции, и коллекционным животным. Сообщения о межвидовых вирусных и бактериальных трансмиссиях в условиях неволи зарегистрированы у представителей всех классов.

Так, не рекомендуется комбинировать изъятых из природы американских раков, являющихся носителями чумы раков, с их австралийскими родственниками, в частности деструктором Ябби, красноклешневым раком, мароном и т.д., которые обладают повышенной чувствительностью к данному вирусу. Кроме того, из-за риска инфекционных заболеваний не рекомендуется кормить раков креветками.

Многие рыбы являются переносчиками инфекционных болезней, сами при этом, зачастую, не болевают. Этот факт рассматривается как основная причина несовместимости дискусов, иммунная система которых развита слабо, с рыбами других видов, которые в данном случае могут выступать в качестве сторонних носителей инфекции. Сообщалось о гибели в условиях аквариума цихлиды – принцессы Бурунди (*Neolamprologus elongatus*), вызванной трубочником, служившим кормом. Доказано, что для рыб многих видов, особенно цихлид Великих Африканских озер, трубочник потенциально опасен как носитель инфекционных патогенов. Ряд специалистов не рекомендуют содержать порчевых сомов с двухкоготными черепахами, мотивируя тем, что сом во время чистки может занести подкожную инфекцию.

По причине распространенности носительства инфекционных агентов многими амфибиями, к совместному содержанию представителей различных видов также, в основном, отношение отрицательное. Например, африканская шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*) является переносчиком хитридиевых грибов (*Batrachochytrium dendrobatidis*), опустошающих сегодня популяции земноводных по всему миру и рассматриваемых в качестве одного из ведущих факторов в их исчезновении.

Инфекции являются проблемой смешанновидового содержания и рептилий. Изъятые из разных климатических зон и природных сред, они, не редко, служат резервуаром множества специфических микроорганизмов. Риск межвидовой контаминации особенно возрастает при введении в популяцию разводимых в неволе рептилий диких особей, изъятых из дикой природы. Так, патогену, морфологически близкому к герпесвирусам, приписывается гибель в условиях неволи горбатых черепах (*Graptemy ssp.*), падеж которых начался после совместного содержания с расписными черепахами. Кроме того, нормальной микрофлорой рептилий считаются сальмонеллы.

Дикие представители различных видов водоплавающих птиц (утки, чайки, крачки, гуси, лебеди, бакланы, буревестники и др.) являются основными носителями вируса птичьего гриппа и рассматриваются как его резервуар. В их природных популяциях вирусы эволюционно стабильны, сбалансированы и размножаются, не вызывая манифестных форм заболевания и смертности. Между тем, вирус легко преодолевает межвидовой барьер и передается другим видам птиц и млекопитающим, к которым адаптируется и длительное время циркулирует в их популяциях. На сегодня выявлено, что вирусами гриппа бессимптомно инфицированы птицы, относящиеся к 9 порядкам. Чаще всего межвидовой перенос приводит к транзитной инфекции,

которая может сопровождаться гибелью нового хозяина, а при отсутствии эффективных путей передачи - прекращением эпизоотии. Реже, могут появляться постоянные, самостоятельные эволюционные линии вирусов гриппа А.

Коллекционным животным могут быть переданы птичий поксвирус, вирусы энтерита утки и герпеса. В первую очередь это имеет место там, где концентрируются и местные или мигрирующие птицы, например, на станциях кормления или открытых водоемах. Высока вероятность инфекционного энтерита мускусных уток при контакте с крякками, которые более устойчивы к этой патологии и могут выступать в качестве носителей этой инфекции.

Вирус Западного Нила может быть передан выставочным экспонатам либо от местных диких птиц, либо от коллекционных животных комарами-переносчиками. Сообщались о гибели воробьиных, голенастых, веслоногих, ржанкообразных, гусеобразных, курообразных, соколообразных и совообразных во время вспышки инфекции в Нью-Йоркском зоопарке в 1999 году. В последующем вирус обнаружили у содержащихся в неволе птиц других видов, а также морских млекопитающих (обыкновенных тюленей).

Показано перекрестное заражение листериозом при совместном содержании голубей, малых горлиц, майн, обыкновенных скворцов, домовых воробьев и щеглов.

Хотя межвидовые передачи и смерть в результате инфекции *Chlamydophila psittaci* наиболее распространены среди птиц, этот патоген может привести к заболеваниям и других видов.

Не менее актуальна проблема межвидовой трансмиссии инфекционных агентов и среди млекопитающих. Вирусы гриппа А птичьего происхождения являются причиной вспышек заболеваний среди норок, тюленей, китообразных и др. Способность этих вирусов к реассортации повышает их экологическую пластичность и может приводить к внезапным изменениям уровня патогенности, а также спектра потенциальных хозяев. За последние 15 лет в результате мутаций резко изменили биологические свойства и приобрели способность преодолевать межвидовой барьер подтипы H5N1 и H7N7. Примерами межвидовой трансмиссии среди млекопитающих являются вирусы герпеса нескольких видов. Бычий герпесвирус (BHV-1, -2 и -4), а также эндотелиотропный вирус герпеса слонов (EENV), бессимптомно присутствуя у африканских слонов-носителей, могут являться причиной заражения и смерти многих содержащихся в зоопарках и цирках азиатских слонов. Высказывается мнение о носительстве «азиатами» вируса, летального для их африканских сородичей.

В Пермском зоопарке (согласно годовому отчету за 2003 год) закончилась гибелью большинства зайцев попытка совместного их содержания с принесенными посетителями ежами, которые оказались источником вирусной инфекции.

Согласно Программе ЕЕР по жирафам, не рекомендуется совместное содержание их вместе с антилопами гну и баранами, которые являются латентными носителями герпесвируса злокачественной катаральной лихорадки, поскольку заболевание легко передается жирафам. Соответствующий вирус летален и для многих других жвачных (зебу, африканские буйволы, американские бизоны, ослы и т.д.). Межвидовой перенос характерен для некоторых инфекционных болезней приматов (герпесы тамарина, саймири, гориллы, шимпанзе, совиной обезьяны, коаты, а также обезьяньей оспы), поэтому разные виды их нежелательно содержать вместе. Например, герпесвирус саймири вызывает лимфопролиферативные заболевания у чернохвостых мартышек, мармозеток, тамаринов, совиных обезьян, тити при размещении с беличьими обезьянами, более 70 % которых известны как носители вируса. Герпес обезьян (носители возбудителя – макаки) смертелен для человекообразных обезьян (передается через царапины, укусы, а также попадание брызг, испражнений или слюны в глаза), но редко опасен для нечеловекообразных видов. Соответственно, не рекомендуется смешивать игрунковых (например, мартышек и игрунков) и ночных обезьян. Источником возбудителя обезьяньей оспы в природе являются приматы 12 видов и тропические белки некоторых видов, от которых заражаются другие обезьяны.

Различные исследователи выделяют от 5 до 10 групп лентивирусов приматов различных видов. Так, мангобеи, являющиеся естественными хозяевами вируса SIVmac, могут в результате межвидовой трансмиссии при совместном содержании заразить макаков (резус, циномольтусов и свинохвостых), индуцируя у них СПИД. Оказалось, что ВИЧ-2 близок к одному из обезьяньих вирусов, который выделяется в Африке в природных популяциях дымчатых мангобеев. SIVagm не вызывает заболевания у природных хозяев – зеленых мартышек, но патогенен для обезьян резус, японских макак и других видов, у которых при совместном содержании в зоопарках индуцирует персистентную лимфаденопатию с морфологическими признаками, характерными для СПИДа человека и заканчивающуюся летальным исходом.

Рекомендуется в качестве превентивной меры контролировать в смешанновидовых экспозициях приматов сальмонеллез, кампилобактериоз, бордетеллез, шигеллез и иерсиниоз. Трансмиссию

перечисленных бактерий могут реализовать и такие векторные виды, как крысы, мыши, дикие птицы. Особое внимание следует уделять перекрестной контаминации сальмонелл при совместном содержании приматов и слонов.

Экспериментально доказана способность подобных вирусу гепатита Е штаммов от свиней преодолевать межвидовые барьеры и вызывать заболевание обезьян.

Актуальны в плане межвидовой трансмиссии в условиях зоопарка такие заболевания, как чума плотоядных, иммунодефицит и инфекционный перитонит – для львов, ящур – для копытных, лептоспироз – для носорогов, прионные заболевания.

В начале 1990-х годов в Национальном Парке Серенгети в Танзании около 25 % львов погибло от чумы плотоядных, заразившись, очевидно, в результате контакта с одной или более из 30 тыс. домашних собак, живущих около парка. Иммунодефицитом кошек болеют в основном львы из Азии и Намибии.

Носительство вируса ящура в естественных условиях отмечено у африканских буйволов, пятнистых оленей, ланей; тогда как болеть могут млекопитающие свыше 100 видов, принадлежащие к 33 семействам и 14 отрядам.

Сообщалось о лептоспирозе в нескольких зоопарках: гибель экзотических грызунов и мелких приматов в Обществе охраны дикой природы (неопубликованные исторические сведения), черного носорога в Питсбургском зоопарке. В обоих случаях источником инфекции предположительно были дикие животные, получившие доступ к экспонатам: в первом – грызуны, в последнем – еноты.

Доказана возможность передачи прионного заболевания от животного одного вида к другому, что, прежде всего, подтверждает возможность для инфекционного прионного белка преодолевать межвидовые барьеры, например, в случае увеличения дозы и частоты введения.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать, что при создании смешанновидовых экспозиций, наряду с такими зооветеринарными проблемами, как травматизация в результате межвидовой агрессии, видовые особенности кормовых рационов, гибридизация, несоответствие зоогигиенических требований комбинируемых видов, одним из значимых и актуальных вопросов, которые необходимо решить, является потенциальная вероятность межвидовой трансмиссии инфекционных болезней.

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ И УРЕАПЛАЗМ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ

Л.А. Крафт, Н.В. Куikliна, Е.Б. Карабасова, А.А. Сазанская, В.А. Юрова

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения России г. Барнаул

В настоящее время в этиологии воспалительных процессов ведущая роль принадлежит условно-патогенной микрофлоре. В структуре общей инфекционной патологии значительную долю составляют инфекции, передаваемые половым путем (ИППП). Важное значение в последние годы в урогенитальной патологии мужчин и женщин приобрели микоплазмы и уреаплазмы. Они вызывают многоочаговые поражения мочепоповой системы, вызывающие тяжелые последствия, которые в первую очередь влияют на репродуктивную функцию и могут стать источником инфицирования плода и новорожденных.

Целью данного исследования явилось определение частоты выявления микоплазм и уреаплазм, а также других микроорганизмов и вирусов у мужчин и женщин Алтайского края при хронических воспалительных процессах урогенитального тракта. Для подтверждения диагноза ИППП применяли генно-диагностические методы исследования, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью.

Нами исследовано 325 пациентов с различными хроническими заболеваниями урогенитального тракта (уретриты, цервициты, эндометриты, вульвовагиниты, аднекситы, простатиты). Среди них женщины составляли 255 и мужчины 70 человек в возрасте от 16 до 50 лет. ДНК выделяли из эпителиальных клеток цервикального канала, заднего свода влагалища и уретры при помощи диагностических наборов производства «Амплисенс» Федерального государственного учреждения науки «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Детекция результатов проводилась при помощи флюоресцентного ПЦР-детектора «АЛА-1/4» («BioSan», Латвия). В клиническом материале определяли наличие маркеров ДНК *Chlamidia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, а также ДНК вирусов простого герпеса (ВПГ 1,2) и цитомегаловирусов (ЦМВ).

Результаты исследования показали, что у женщин уреоплазмы выявлялись в 55,2% (111 из 218), микоплазмы хоминис и гениталиум в 9,4% и 1,4% случаев соответственно. Была отмечена также высокая частота обнаружения гарднерелл (79 из 203), что составляло 38,9%, кандид – 14,8% и ЦМВ – 10,5%. Что касается хламидий и ВПГ, то на их долю приходились единичные случаи. У мужчин прослеживалась такая же тенденция: высокая частота выявления уреоплазм – 39,5%, гарднерелл – 28,6% и кандид – 15,4%. При этом в большинстве образцов (72%) обнаружена ассоциация микоплазм (или уреоплазм) с гарднереллами, что говорит о нарушении микробиоценоза соответствующих отделов урогенитального тракта.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой частоте распространения уреоплазм и микоплазм у женщин и мужчин репродуктивного периода. Совместное инфицирование уреоплазм и микоплазм с гарднереллами являются показателями серьезных дисбиотических нарушений урогенитального тракта, что способствует развитию и поддержанию в нем хронических воспалительных процессов, а также создает благоприятные условия для активизации условно-патогенной флоры и сохраняет тенденцию к обострению хронического воспаления.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA* ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЯХ ПОЛОВЫХ ПУТЕЙ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССАХ ПОЛОСТИ РТА

В.А. Юрова, Н.В. Куклина, Е.Б. Карабасова, Л.А. Крафт

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения России г. Барнаул

Исследования проводились в лаборатории клинической диагностики Поликлиники ГБОУ ВПО АГМУ Минздрава РФ «Консультативно-диагностический центр». Патологический материал получен от пациентов поликлиники. Кандиды выделяли на среде Сабуро (производство ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск, Московская обл.). Идентификацию проводили с использованием хромогенного агара для грибов *Candida* (M1297A производство Himedia) с параллельной оценкой морфологических свойств (микроскопия с иммерсией). Чувствительность выделенных культур проводили диско-диффузионным методом с использованием агара для определения чувствительности к

антимикотикам (M1336 производство Himedia) и гексадисков Antimycos 01 (производство Himedia), содержащих амфотерицин 100 ЕД, клотримазол 10 мкг, флюконазол 25 мкг, интраконазол 10 мкг, кетоконазол 10 мкг, нистатин 100 ЕД.

Всего в работу включили данные, полученные от 100 больных (80 женщин и 20 мужчин) с хроническими инфекциями половых путей (ХИПП) и 103 больных с патологией полости рта (70 женщин и 33 мужчин).

Результаты: от больных с ХИПП кандиды выделены в 12 % случаев. Чаще кандиды выделялись от женщин (11% случаев), чем от мужчин (1% случаев). Среди всех кандид преобладал вид *C. albicans* (17,3%); виды *C. tropicalis* и *C. glabrata* выделялись с частотой 3,8% и 4% соответственно. От пациентов с воспалительными процессами полости рта кандиды выделены от 40 больных (38,8%), при этом незначительно преобладал вид *C. glabrata* (36,5%), с меньшей частотой (28,8%) выделен вид *C. albicans*, на виды *C. tropicalis* и *C. krusei* пришлось по 2,9%. Кандиды у данной категории пациентов выделялись приблизительно с одинаковой частотой: от женщин в 41,4%, от мужчин в 36,4% случаев.

Чувствительность выделенных кандид к антимикотикам наиболее выражена к нистатину (80,7% чувствительных штаммов), наименее выражена к интраконазолу (28,8 % чувствительных штаммов), к остальным антимикотикам чувствительность штаммов распределилась в интервале от 52 до 67 %.

Выводы:

1. Грибы рода *Candida* чаще выделялись от больных с воспалительными процессами полости рта (в 38,8% случаев по сравнению с пациентами ХИПП – 12% случаев).
2. У женщин–пациенток с ХИПП грибы рода *Candida* выделялись чаще (91,6%), чем у мужчин этой группы; у пациентов с воспалительными процессами полости рта различий в частоте выявления кандид не отмечено.
3. В большинстве случаев исследуемые штаммы кандид обладали выраженной чувствительностью к нистатину (80,7%); и проявляли резистентность к интраконазолу (более 70% штаммов).

РОЛЬ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБИОТЫ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НАСЕЛЕНИЯ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.В. Сбойчаков

Ленинградский государственный
университет имени А.С. Пушкина

Антропогенное загрязнение почвы оказывает выраженное воздействие на формирование популяционного здоровья населения, особенно в связи с изменением социально-экономических условий. В настоящее время нет оснований отрицать наличие экологически обусловленных заболеваний, их следует искать в общем потоке патологических проявлений, вызванных экзогенными химическими, физическими и также биологическими факторами.

Наибольшее значение в этиологии аллергических заболеваний имеет группа ингаляционных аллергенов. В Ленинградской области ведущие ранговые места среди заболеваний населения занимают болезни органов дыхания, в структуре заболеваемости отмечается рост таких заболеваний как бронхиальная астма и аллергический ринит.

Данные официальной статистики по обращаемости в лечебно-профилактические учреждения не соответствует истинным величинам заболеваемости и распространенности аллергических болезней среди населения России: бронхиальной астмой, по данным обращаемости, болеет около 1% населения, в то время как по данным углубленных исследований – от 7 до 12 % (по данным международной статистики – до 20% населения).

Источником сенсибилизации организма, являются грибы, присутствующие в почве, видовой состав которых во многом зависит от химического состава почвы и экологической ситуации региона. В настоящее время насчитывается более сотни видов грибов, в отношении которых установлена способность вызывать аллергию у людей. Наиболее аллергенными из них считаются грибы рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria* и *Candida*. Поэтому представлялось весьма интересным изучить видовой состав почв Ленинградской области с целью обнаружения грибов, способных вызвать аллергические заболевания у человека.

Аллергенные свойства грибов определяются их морфологическими особенностями и, в частности, строением их клеточной стенки, которая содержит макромолекулы, состоящие из хитина, целлюлозы, полисахаридов, белков и липидов. Наибольшую

аллергизацию организма вызывают гликопротеины и протеогликаны клеточной стенки как спор, так и мицелия грибов. Кроме спор, вегетирующие грибы могут выделять большое число различных макромолекулярных соединений.

Аллергенами грибов могут быть следующие вещества: белки теплового шока, ферменты (альдегид-дегидрогеназа, енолаза, супероксиддисмутаза, сериновая протеаза, металлопротеаза, дисульфидизомераза, β -ксилозидаза, N-ацетилглю-козааминидаза). Повсеместная вегетация грибов в почве приводит к неизбежному контакту их с органами дыхания человека. Известно, что в носовой полости и носоглотке задерживаются частицы размером более 50 мкм, частицы диаметром 30–50 мкм проникают в трахею, 10–30 мкм – в бронхи, 3–10 мкм – в бронхиолы и 1–3 мкм в альвеолы. Основной путь заражения грибными спорами, или конидиями – аэрогенный, поскольку споры могут длительное время находиться во взвешенном (аэрозольном) состоянии в воздухе – размер их конидий обычно находится в средних пределах от 3 до 5 мкм и, следовательно, они могут достигать альвеол. Кстати, эти грибы «обожают» колонизировать старые здания и строения. Отсюда следует, что в процессе проветривания или кондиционирования помещений также возникает опасность распространения спор грибов. Дыхательные пути здоровых людей имеют высокую способность к элиминации спор, и грибы редко имеют патогенные свойства в этих условиях. Эффективность элиминации спор ограничивает контакт грибковых антигенов с бронхоассоциированной лимфоидной тканью. Это отражается низким базальным иммунологическим ответом с относительно маленьким количеством специфических IgG и низким уровнем IgA в бронхоальвеолярной жидкости. Длительная и массивная экспозиция спор может привести к развитию гиперчувствительности. Особенностью почвы как среды обитания микроорганизмов является ее гетерогенность. Микрозоны разделены здесь в пространстве и во времени, поэтому почва представляет собой множество экологических ниш. По отношению к пище организмы подразделяют на олиготрофов, способных к росту при низкой концентрации питательных веществ, и копиотрофов, предпочитающих богатые питательные среды.

Очаговость распространения микроорганизмов – главная особенность их экологии в почве, позволяющая сохранить виды почвенных микроорганизмов и специфичность группировок по горизонтам почвы. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних – грибы и анаэробы. Общее количество микроорганизмов уменьшается по мере углубления в почву.

Основным типом почв в Ленинградской области являются подзолистые, бедные перегноем и отличающиеся значительной кислотностью. При этом на суглинках, в низких местах с повышенным накоплением влаги, главным образом в еловых лесах, образуются сильноподзолистые почвы с мощным верхним слоем. В более высоких местах, менее благоприятных для накопления влаги, образуются среднеподзолистые почвы. На супесях и песках, плохо удерживающих влагу, встречаются слабоподзолистые почвы. Там, где преобладает травяная растительность, – на лесных вырубках, в редких смешанных или лиственных лесах – образовались дерново–подзолистые почвы.

Отбор проб и предварительная обработка почвенных образцов для микробиологического анализа проводились согласно ГОСТ 28168–89 «Почвы. Отбор проб» в слое 0–10 см. Пробы брали в трехкратной повторности, из которых готовили один смешанный образец для микробиологических анализов. Перед закладкой опытов в почве были отобраны крупные корни растений. Проведён анализ более 32 почвенных образцов. Изучение структуры и видового состава микробиоты почвы проводили методом посева из почвенной суспензии на плотные питательные среды: МПА, сусло–агар и среда Чапека в 5–кратной повторности. Идентификацию бактерий проводили общепринятыми методами. Определение таксономической принадлежности микромицетов проводили на основании изучения органов и типов спороношения, используя определители отечественных и зарубежных авторов (Егорова Л.Н., 1986; Miller D., 1990; Ramirez C., 1982; Thom P., 1999; De Hoog G.S., 2000 и других).

Из суглинистых почв было выделено в чистую культуру около 80 изолятов грибов. Наиболее богата по видовому составу группа несовершенных грибов (*Hyphomycetes*). Бактериальная биота представлена единичными бациллами следующих видов: *Bacillus idosus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*. Аэробные сапрофитные бактерии, в основном, представлены неспороносными формами рода *Pseudomonas*.

Из образцов лесной дерново–подзолистой почвы было выделено в чистую культуру около 50 видов грибов. Бактериальная биота представлена единичными бактериями следующих родов: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* и *Streptomyces*.

Из образцов торфянисто – дерново – подзолистой почвы было выделено в чистую культуру около 90 изолятов грибов. Бактериальная биота представлена бактериями следующих родов: *Pseudomonas*, *Achromobacter* и *Bacillus*. Виды рода *Bacillus* представлены *Bacillus cereus* и *Bacillus megaterium*. Коэффициенты отношений «грибы: бактерии» (Г/Б)

находились в диапазоне от 2 до 10. Среди выделенных микромицетов преобладали грибы рода *Penicillium* как по числу видов, так и по количеству изолятов, особенно виды секции *Monoverticillata*. Это весьма характерно для почв северо-западных регионов России. Большинство выделенных грибов можно отнести к следующим видам – *Aspergillus fumigatus* Fresen, *A. Niger* Tiegh, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab; *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx v. *Aurantiogriseum*, *P. brevicompactum* Dierckx, *P. stipitatum* Thom, *P. chermesinum* Biourge, *P. martensii* Biourge.

Все выделенные микромицеты относятся к так называемому «антропогенному комплексу грибов» по А.В. Зачиняевой (2006), представители которого способны вызвать патологические процессы, обусловленные их сенсibiliзирующим действием на человеческий организм. Столь высокая контаминация почв Ленинградской области грибковыми аллергенами вносит существенный вклад в заболеваемость населения этого региона аллергозами.

САНИТАРНО–ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ БЛАГОПОЛУЧИЕ НА ОБЪЕКТАХ ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНОГО ТРАНСПОРТА РОССИИ

Н.Ю.Матюхина, Л.М.Смирнова, М.П.Шулаева.

Казанский филиал «Центр гигиены и эпидемиологии
по ж. д транспорту» Лаборатория микробиологических
методов исследований
ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»

Географические особенности Российской Федерации, ее протяженность, труднодоступность некоторых районов, зачастую экстремальные климатические условия определяют необходимость развития инновационной транспортной инфраструктуры и в первую очередь железнодорожного транспорта, как одного из самых доступных и востребованных. В условиях интенсивных интеграционных процессов на территории стран СНГ и Ближнего Зарубежья, наращивания потенциалов товарооборота, межгосударственного, культурного взаимодействия, увеличения пассажирских перевозок железнодорожным транспортом, трудно переоценить актуальность обеспечения санитарно–эпидемиологического благополучия на объектах железнодорожного транспорта. Поэтому механизмы реализации глобальных вопросов обеспечения санитарно–эпидемиологического благополучия на объектах железнодорожного транспорта являются актуальными и контролируемыми.

Для достижения задач по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия на объектах железнодорожного транспорта Управлением Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту реализуется ведомственная целевая программа «Гигиена и здоровье – железнодорожный транспорт», среди основных задач которой можно выделить:

–выявление и устранение влияния вредных и опасных факторов среды обитания;

–снижение уровня общей заболеваемости работников железнодорожного транспорта, в том числе возникновения новых случаев профессиональной патологии;

–обеспечение работников железнодорожного транспорта, пассажиров продуктами и питьевой водой, соответствующей гигиеническим требованиям.

Цель исследования: в связи с тем, что удельный вес исследований пищевых продуктов остается стабильно высоким, представляло интерес проанализировать пробы пищевых продуктов из вагонов – ресторанов на микробиологические показатели в соответствии с СанПин 2.3.1078 – 01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» за 2008-2010 гг.

Материалы и методы. Лабораторный контроль качества пищевых продуктов после транспортировки проводился в микробиологической лаборатории Казанского филиала «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту». Пробы отбирались с соблюдением правил асептики по соответствующим нормативным документам. В основном исследовались: готовые блюда, салаты из свежих и вареных овощей, рыба, напитки, колбасные и мучные изделия. Исследования проводились по нормативным документам на каждый вид пищевого продукта. В работе использовали классические методы посева и выделения микроорганизмов, рекомендуемые ГОСТами на пищевые продукты, а также унифицированные питательные среды для ускоренного выделения и идентификации микроорганизмов: «Протеус ППМ» - предназначена для одноэтапного выделения и одновременной идентификации бактерий группы родов протеус, провиденция, морганелла в течение 18–24 ч. (ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора), питательные среды фирмы Мерк (Германия) - лаурил-сульфатный бульон; хромогенный агар для определения колиформных бактерий и *E.coli*; агар Мак-Конки; магниевая среда Раппопорта-Вассилиадиса с соей; хромогенная дифференциально-диагностическая среда Рамбах-агар; ксилозо–лизиновый агар с дезоксихолатом – (XLD agar).

Результаты. В 2008 году произведен отбор и исследовано на микробиологические показатели 86 проб пищевой продукции, из них, не соответствующих гигиеническим нормативам – 8 проб (2,2%) из них 5 – БГКП, 2 – *E.coli*, 1 – *S.aureus*.

В 2009 году исследовано проб пищевых продуктов на микробиологические показатели – 123, из них несоответствующих гигиеническим нормативам – 6 (в т.ч. 3 – БГКП, 1 – *E.coli*, 2 – *S.aureus*) (2,5%).

В 2010 году исследовано проб пищевых продуктов на микробиологические показатели – 32, из них несоответствующих гигиеническим нормативам – 0.

Выводы: Снижение показателей несоответствия гигиеническим нормативам по микробиологическим показателям, по годам с 2008 по 2010, объясняется тем, что в эти годы выходит много обновленных ГОСТов на различные группы микроорганизмов, к которым предъявляются более жесткие требования;

Ускоренные методы позволяют существенно (на 24–48 ч) сократить продолжительность исследований. Обладая высокой чувствительностью, они обеспечивают надежное выявление различных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в анализируемом материале.

СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА У БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ РАЗДРАЖЁННОГО КИШЕЧНИКА

Е.О.Меренцова, Е.П.Корнейчук

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого, г. Львов

Согласно современным представлениям синдром раздраженной кишки (СРК) – функциональное расстройство кишечника, при котором боль или дискомфорт в животе связаны с изменением частоты и характера стула или с другими симптомами нарушения дефекации. Симптомы этого заболевания наблюдаются у около 10–20% населения Земли. При этом наиболее часто заболевание регистрируется у лиц молодого трудоспособного возраста, что влечет за собой значительные экономические потери.

Согласно Римским критериям III (2006) выделяют 4 основных варианта болезни: СРК с преобладанием запора, с преобладанием диареи, смешанный вариант и неклассифицированный.

Этиология СРК до сих пор неизвестна. В настоящее время СРК рассматривают как результат взаимодействия разнообразных биологических и психо–социальных факторов. Среди этих факторов значительная роль отводится состоянию микробиоценоза кишечника. Изучен микробиоценоз кишки у 65 больных СРК возрастом от 30 до 70 лет, которые условно были разделены на две группы: 35 пациентов составили группу больных с СРК, сопровождающимся диареей, у 30 лиц установлено СРК, сопровождающийся запорами. Микробиологическое исследование проведено согласно действующим методическим указаниям. Кроме того, проведено копрологическое исследование испражнений, результаты которого учтены при установлении типа и степени тяжести дисбактериоза.

По результатам микробиологического исследования установлено, что у больных с СРК, сопровождающимся диареей, в 48,5% случаев наблюдается снижение количества бифидобактерий до 10^7 КОЕ./г и ниже. У части больных (14,3%) был снижен и популяционный уровень эшерихий до 10^6 КОЕ./г. Количество лактобацилл было снижено в меньшей степени и касалось 14,2% больных с диареей. У больных указанной группы согласно копрологическим показателям на фоне резкого сдвига рН фекалий в кислую сторону отмечался дефицит переваривания растительных субстратов различной степени, более частое выявление йодофильной флоры, что является свидетельством усиления кинетической функции кишечника.

У 10% больных с СРК, сопровождавшимся запорами, показатели микробиоценоза не отличались от таковых, которые могут быть приняты в качестве нормы. Снижение количественных показателей бифидо–и лактофлоры у лиц указанной группы встречалось вдвое реже, чем у больных с диареями.

Снижение уровня эшерихий у 37% больных с констипациями, сопровождалось незначительным снижением переваривания растительной клетчатки, выявлением нейтрального жира. Сдвиг реакции рН в щелочную сторону, что обычно связано с усилением гнилостных процессов, сопровождался выявлением у отдельных лиц цитратассимилирующей микрофлоры (бактерий рода протейс и цитробактер), у двух больных выявлена *Pseudomonas aeruginosa*. Среди других оппортунистических микроорганизмов, выявляющихся у больных с СРК, таких, как стафилококки (главным образом, коагулазоотрицательные), энтерококки и дрожжеподобные грибы, следует отметить более высокие количественные уровни их выявления у больных с диареями. У пациентов обеих опытных групп выявлялись в повышенном количестве мыла.

Таким образом, изменения микробиоценоза кишечника, которые являются вторичными при СРК, замыкают порочный круг в патогенезе заболевания, что согласно копрологическим показателям отражается на функциональном состоянии пищеварительного канала. Показатели микрoэкологических изменений являются основанием для назначения адекватной биотерапии в комплексе других методов медикаментозного лечения и диетотерапии.

МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЁТА ДЕТЕЙ, СТРАДАЮЩИХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Н.И. Смоляр, С.Е. Лещук, М.А.Панас

Львовский национальный медицинский
университет имени Данила Галицкого, г. Львов

Поскольку организм человека является целостной системой, существует взаимосвязь между соматической патологией и заболеваниями полости рта. Бронхиальная астма – наиболее распространенное хроническое заболевание дыхательной системы детского возраста, которое развивается на фоне иммунологических сдвигов в организме. Ротовая полость, являясь уникальной экологической нишей, контактирует с внешней и собственной средой, испытывая двойное влияние: различных факторов внешней среды с одной стороны и регуляторных, защитных механизмов – с другой. У детей, страдающих бронхиальной астмой и подвергающихся воздействию специфических лечебных препаратов (в том числе, препаратов стероидной группы), не могут не возникать определенные изменения со стороны состояния микрофлоры ротовой полости как важнейшей экосистемы, что отражается на процессах, связанных с развитием кариеса зубов.

Проведены бактериологические исследования зубного налета, забранного при помощи стерильного экскаватора с пришеечной поверхности зубной эмали нижних центральных резцов.

Исследования носили полуколичественный характер, поскольку микробное число (популяционный уровень) выделенных микроорганизмов зависело от интенсивности слюноотделения. Определяли процентное соотношение различных видов микроорганизмов в отобранном материале.

Исследовано 35 больных детей возрастом от 6 до 17 лет, страдающих бронхиальной астмой средней и тяжелой степени тяжести в течение, 3–12 лет и находившихся на стационарном лечении в

аллергологическом отделении и принимающих ингаляционно глюкокортикоидные препараты (пульмикорт, сальбутамол, flexotid). Контрольную группу составили 25 детей соответствующего возраста с аналогичным стоматологическим статусом.

Предметом исследования было изучение аэробного звена бактерий кариесогенной группы, адгезирующие в зубном налете. Как известно, к микроорганизмам, ассоциированным с кариесом зубов, относят *S. mutans*, *S. salivarius* и в меньшей степени – *S. mitis*, а также лактобактерии (главным образом, *L. acidophilus* и *L. casei*).

Для первичного посева использовали селективную среду для кариесогенных стрептококков – MSA (митис-саливариус агар) производства Neogen, Германия. Характерный рост на указанной среде позволил определить *S. salivarius* и *S. mitis*. Определение принадлежности к группе *S. mutans* требовала дополнительного тестирования. Для выделения и пассажирования субкультур использовали глюкозный бульон Хоттингера. Выделение лактобацилл производили на полужидкой среде лактобакагара (производства ФБУН, Россия). Для учета других аэробных микроорганизмов, выделяющихся при посеве зубного налета, использовали кровяной агар.

Интенсивность выделения изучаемых микроорганизмов оценивали по двум показателям – частота выделения и процентное содержание среди других микроорганизмов аэробного звена, включающего кариесогенные стрептококки, стрептококки других групп (в том числе, энтерококки), стафилококки, коринеформные бактерии и некоторые другие микроорганизмы.

S. mutans был выявлен у 34 из 35 (97%) детей в количестве $5,9 \pm 0,7 \cdot 10^3$ КОЕ/мл. *S. mitis* определялся у 80% детей и его доля среди других исследованных оральных микроорганизмов составила от 3 до 40%, а популяционный уровень – $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Также часто выделяли и *S. salivarius*, на долю которого пришлось от 1,7 до 50% с популяционным уровнем $5,6 \pm 0,6 \cdot 10^3$ КОЕ/мл.

У детей контрольной группы оральные стрептококки на среде MSA не определялись, однако популяционный уровень *S. mutans* составил $5,2 \pm 0,6 \cdot 10^4$ КОЕ/мл.

Полученные результаты исследования стрептококков были соотнесены с показателями выделения лактобацилл. Количественный показатель выявления молочнокислых бактерий у больных бронхиальной астмой детей колебался от $5 \cdot 10^3$ до $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Причем, более низкий уровень высеваания лактобацилл у 50% детей выявлено и при низком количественном показателе выявления кариесогенных стрептококков – 10^2 КОЕ/мл. Низкий уровень выявления

лактобацилл коррелировал с активацией дифтероидов и других полиморфных грамположительных палочек. У детей контрольной группы средний популяционный уровень лактобактерий составил $3,7 \cdot 10^4$ КОЕ/мл.

Таким образом, у детей, страдающих бронхиальной астмой, выявлена выраженная колонизация зубного налета стрептококками с кариесогенной активностью, и в большей степени, – стрептококками групп *S. salivarius* и *S. mitis*, что сопровождалось и достаточно высоким популяционным уровнем лактобацилл в отличие от детей контрольной группы, у которых превалировал *S. mutans*. Несмотря на наличие лактобацилл, у интактных детей риск развития кариеса был невысок.

АНАЛИЗ ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВЫЗЫВАЮЩИХ РЕАКТИВНЫЕ АРТРИТЫ И ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ

Е.П. Корнийчук, О.В. Мельник, З.Д. Воробец

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого, Львов

Реактивный артрит (РеА) один из наиболее распространенных ревматических проявлений. В большинстве на РеА болеют молодые люди 20–40 годичного возраста. Актуальность проблемы РеА обусловлена и тем, что клинически подобные с ним поражения суставов в ряде случаев начало других более тяжелых системных ревматических заболеваний. В данное время РеА рассматривается как мультифакторное заболевание, повязанное с хронической инфекцией, в развитии которого значительную роль играют не только микроорганизмы, но и их состояние. К реактивным артритам относят запальные негнойные заболевания суставов, которые развиваются вследствие иммунных нарушений после перенесенной урогенитальной, кишечной или респираторной инфекции. Преимущественно РеА ассоциируется с острой или персистирующей урогенитальной инфекцией. В патогенезе РеА центральная роль отводится иммунным нарушениям, в частности связанными с функционированием Т-лимфоцитов, а также, нарушением метаболических процессов. В течение последнего десятилетия значительный интерес вызывает метаболизм L-аргинина и роль оксида азота (NO) в патогенезе ревматических заболеваний. Значение L-аргинина резко возросло после того, как было показано, что он есть предшественник NO, который владеет широким спектром биорегуляторных воздействий. Инфекционные факторы вызывают

иммунные стрессы, обусловленные воздействием цитокинов, и стимулируют у больных артритом синтез NO. В этих условиях NO воздействует на иммунную защиту организма, выполняя роль иммунорегулятора, а в больших концентрациях также проявляет цитотоксическое действие, что усугубляет разнообразные проявления аутоиммунного характера. Следует отметить, что продуцирование оксида азота, субстратом для которого есть аминокислота – L-аргинин, не связаны лишь с синтазным путем метаболизма. Обмен L-аргинина происходит, как минимум, двумя путями: окисным – (NO-синтазным) и неокисным (аргиназным). Большинство исследований метаболизма NO посвящено изучению окисного NO-синтазного пути метаболизма. Здесь, важно отметить, что NO-синтаза и аргиназа могут конкурировать за субстрат – L-аргинин. Аргиназа – металлоэнзим, который катализирует гидролитическое расщепление L-аргинина до мочевины и L-орнитина. Аргиназа регулирует образование NO путем конкуренции с NO-синтазой за L-аргинин. Физиологическая роль аргиназы обусловлена ее участием во множестве метаболических процессов в клетках и свидетельствует о том, что энзим принадлежит к важному звену в развитии многих патологических состояний организма, в частности аутоиммунных заболеваний. Считают, что высокий уровень экспрессии аргиназы свидетельствует о гуморальном ответе со стороны иммунной системы на антиген. Исходя из этого, целью нашего исследования было изучить инфекционные факторы, которые вызывают возникновение реактивного артрита и метаболизм L-аргинина с участием аргиназы и NO-синтазы в лимфоцитах периферической крови у больных. Нами проанализированы этиологические факторы, что вызывают развитие реактивного артрита у больных, которые стационарно или амбулаторно лечились на базе Львовской обласной клинической больницы (Украина). Среди них наибольший процент заболевания был вызван хламидиями (36 %). Хламидии + уреаплазма – 5 %, хламидии + микоплазма – 5 %, трихомонада + хламидии – 3 %, уреаплазма – 3 %, микоплазма – 3 %, бетта-гемолитический стрептококк – 19 %, иерсиния – 1 %, сальмонелла – 1 %, вирусы гепатиту В и С – 10 %, цитомегалловир – 6 %, герпес-вирус – 4 %, Епштейн-Барр вирус – 3 %, ВИЧ-инфекция – 1 %. Поскольку лимфоциты периферической крови являются ключевыми клетками иммунной системы и играют основную роль в обеспечении компенсаторно-приспособительных реакций организма, вероятно, они могут быть использованы как модель для изучения основных метаболических изменений, которые происходят в организме при ревматической патологии. Изучение изменений активности аргиназы при патологических состояниях вызывает значительный интерес у

исследователей в медико-биологической практике. В большинстве исследований используют определение метаболитов окисного и неокисного обмена L-аргинина в плазме крови. Исследование активности аргиназы в норме и при различных патологических состояниях организма в клетках являются ограниченными. С целью изучения особенностей и механизма работы аргиназы в лимфоцитах крови определяли ряд ее кинетических параметров. Показано, что количество образовавшейся мочевины с участием аргиназы лимфоцитов больных на РеА у 3,3 раза выше по сравнению с таковой величиной у практически здоровых людей. В контроле она составляет $106,0 \pm 6,7$, а в лимфоцитах крови больных на РеА – $349,8 \pm 17,2$ нмоль мочевины/мин·мг белка. При кинетическом анализе зависимости активности аргиназы лимфоцитов периферической крови от концентрации L-аргинина, субстрат для ферментативской реакции аргиназы вносили в среду инкубации в диапазоне концентраций от 1 до 200 мМ (при малой концентрации Mn^{2+} 2 мМ). При этом наблюдалось линейное увеличение ферментативской активности аргиназы с последующим выходом на плато. Во всем диапазоне исследуемых концентраций L-аргинина активность аргиназы больных на РеА повышена по сравнению с величиной у доноров. На основании изучения ряда кинетических параметров мы показали, что в лимфоцитах периферической крови больных на РеА накопление мочевины в аргиназной реакции происходит быстрее и более активно по сравнению с донорами. Поскольку метаболизм L-аргинина зависит и от активности NO-синтаз, определяли изменение активности eNO-синтазы и iNO-синтазы при РеА. Определено, что активность NO-синтазы в пермеабелизованных сапонином лимфоцитах практически здоровых особей составляет $74,6 \pm 6,34$ нмоль NADFH(H^+)/мин·мг белка. Учитывая то, что iNO-синтаза в норме отсутствует, можно считать, что эта величина является активностью eNO-синтазы. Показано достоверное снижение активности eNO-синтазы в лимфоцитах у больных РеА, что составляет разницу в 1,88 раза к практически здоровым особям. В тоже время активуется iNO-синтаза. В лимфоцитах пациентов, больных на РеА она составляет $152,3 \pm 14,4$ нмоль NADFH(H^+)/мин·мг белка. На основании проведенных исследований можно утверждать, что в развитии РеА основное значение имеет хламидийная инфекция и, что определение ферментативской активности аргиназы и NO-синтаз лимфоцитов периферической крови дает качественную информационную оценку про функционирование иммунокомпетентных клеток при РеА.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО И ОЦЕНКА ЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Л.Т. Мусина, Р.Ш. Хазиев, А.С. Макарова

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Казань

Эвкалипт прутовидный (*Eucalyptus viminalis*) давно и успешно применяется в медицине в качестве антибактериального и противовоспалительного средства. На основе сырья этого растения были получены препараты антибактериального действия – «Эвкалимин» и «Хлорофиллипт». На сегодняшний день на рынке сохранился только один из этих препаратов – «Хлорофиллипт». Антибактериальная активность препаратов связывалась с разными группами действующих веществ, в частности с эфирным маслом и содержащимся в нём цинеолом, с содержанием хлорофиллов в «Хлорофиллипте». Но стандартизация всех препаратов количественно осуществляется только по титру антимикробной активности, определяемому на культуре золотистого стафилококка. Однако исследования последнего времени связывают антибактериальный эффект препаратов эвкалипта с липофильными соединениями фенольной природы – терпеноидными фенолальдегидами. Таким образом, мы считаем, что технология получения антибактериального препарата из листьев эвкалипта прутовидного должна быть направлена на целевую экстракцию указанной группы соединений.

Целью нашей работы было получение антибактериального препарата из листьев эвкалипта с максимальным выходом целевых действующих веществ и оценка его антибактериальной активности.

Целевой экстракции веществ, ответственных за антибактериальную активность, удалось достигнуть с помощью избирательной экстракции фенолальдегидов гексаном. Ранее в наших работах было доказано, что спиртовые извлечения из листьев эвкалипта содержат сумму фенольных соединений, поглощающих УФ-свет в той же области спектра, что и фенолальдегиды. В то время как гексан оказался избирательным экстрагентом для фенолальдегидов, о чём свидетельствует чёткий максимум поглощения при 278 нм на УФ-спектре. Разработанная нами технология позволяет исключить стадию химической очистки действующих веществ, необходимую при использовании известных технологий.

Оценку антибактериальной активности полученного препарата проводили по ФС 42-1348-91 «Раствор хлорофиллипта 1% спиртовой» методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ) с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р.

Для подтверждения результата полученного вышеописанным методом использовали пересев на мясо-пептонный агар (МПА). На поверхность МПА в чашках Петри методом репликаций из каждой пробирки делали пересев и инкубировали в термостате в течение 18-24 часов. Разведение препарата, на котором отсутствовал рост тест-штамма характеризовало его антибактериальную активность.

Результаты показали, что антибактериальная активность препарата из листьев эвкалипта прутовидного в разы превышает таковую у «Хлорофиллипта». Таким образом, разработанная технология получения антибактериального препарата из листьев эвкалипта прутовидного позволяет не только упростить технологический процесс, но и существенно повысить выход действующих веществ, ответственных за антибактериальную активность.

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ СОДЕРЖАНИЕМ ГИПЕРФОРИНА В ИЗВЛЕЧЕНИЯХ ИЗ ТРАВЫ *H. PERFORATUM* И *H. MACULATUM* И ПРОЯВЛЯЕМОЙ ИМИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л.Т. Мусина, Р.Ш. Хазиев, А.С.Макарова, Л.И. Насыбуллина

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации г. Казань

Трава зверобоя на протяжении длительного времени используется в официальной медицине в качестве противовоспалительного, антисептического и антидепрессантного средства. В отечественной медицине для заготовки травы зверобоя используются два его вида – зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum*) и зверобой пятнистый (*Hypericum maculatum*). Действующие вещества травы зверобоя представлены несколькими группами природных соединений, среди которых присутствуют флавоноиды, антраценпроизводные, гиперфорин и его производные. Последние исследования связывают антибактериальную активность зверобоя с производными флороглюцина, основным представителем которых является гиперфорин. Однако, в ряде работ отмечается, что гиперфорин и его производные содержатся только у одного вида зверобоя – зверобоя

продырявленного. Исходя из этого, мы предполагаем, что только данный вид зверобоя должен использоваться для получения препаратов с антибактериальной активностью.

Целью нашего исследования было сравнительное изучения двух видов зверобоя – продырявленного и пятнистого на содержание гиперфорина и оценка антибактериальной активности извлечений из указанных видов растительного сырья.

Для качественного обнаружения гиперфорина использовали тонкослойную хроматографию на силикагеле («Сорбфил») в системе гексан:этилацетат 9:1. На пластинку наносили гексановые извлечения из травы двух видов зверобоя. Гиперфорин обнаруживали по интенсивной сине-фиолетовой флюоресценции в УФ-свете при 360 нм. ТСХ-анализ гексановых экстрактов полученных из двух видов зверобоя, показал наличие гиперфорина только в траве зверобоя продырявленного и отсутствие его в зверобое пятнистом. Для дополнительного подтверждения наличия гиперфорина в извлечении из *H. perforatum* и отсутствия его в *H. maculatum*, нами были записаны УФ-спектры обоих гексановых экстрактов. Известно, что гиперфорин, имеет четко выраженную полосу поглощения при длине волны 278 нм. Полученные УФ-спектры стали еще одним подтверждением, того что *H. perforatum* и *H. maculatum* различаются по содержанию гиперфорина. УФ-спектр извлечения из *H. perforatum* имел четко выраженный максимум при 278 нм, тогда как у *H. maculatum* он практически отсутствовал.

На следующем этапе исследования для установления корреляции между содержанием гиперфорина, разработанным нами способом, и уровнем антибактериальной активности были проведены микробиологические испытания. Оценку антибактериальной активности проводили по ФС 42–1348–91 «Раствор хлорофиллипта 1% спиртовой» методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне (МПБ) (pH 7,0) с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538–Р. Для этого гексан из полученных извлечений отгонялся досуха под вакуумом, остаток растворялся в 20 мл 95% этанола. Полученные растворы подвергались микробиологическим испытаниям. Однако метод серийных разведений в МПБ не всегда позволял визуально определить наличие или отсутствие роста тест-микроба из-за первоначальной мутности извлечений. Для устранения этого недостатка фармакопейной методики нами был разработан метод, где антибактериальную активность извлечений определяли, используя мясо-пептонный агар (МПА), на поверхность которого в чашках Петри методом репликаций из каждой пробирки делали пересев и инкубировали в термостате в течение 18–24 часов. Разведение извлечения, на котором отсутствовал

рост тест-штамма характеризовало его антибактериальную активность. Каждый опыт проводился в трёх повторностях. Максимальное разбавление извлечения, инактивирующее рост *Staphylococcus aureus* составило 1:512 и 1:128 для зверобоя продырявленного и зверобоя пятнистого соответственно.

Полученные результаты показали, что антибактериальная активность экстракта из травы зверобоя продырявленного в 4 раза выше таковой у зверобоя пятнистого, что возможно обусловлено различием в уровнях содержания гиперфорина. Таким образом, была подтверждена неравнозначность этих видов сырья в плане антибактериальной активности и корреляция ее с содержанием производных флороглюцина.

КИШЕЧНАЯ МИКРОБИОТА: ЕЕ СОСТОЯНИЕ У ДЕТЕЙ С ГАСТРОДУОДЕНИТАМИ

С.В. Соковнина, М.В. Кузьяев, Е.Г. Вихарева

ГОУ ВПО ИГМА Минздравсоцразвития России г. Ижевск
ГУЗ «Первая Республиканская клиническая больница МЗ УР, г. Ижевск
ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и
курортологии»

Кишечная микробиота проявляет защитную, пищеварительную, метаболическую и иммуномодулирующую функции. Защитная функция кишечной микробиоты проявляется в формировании колонизационной резистентности к болезнетворным микроорганизмам за счет образования бактериостатических низкомолекулярных метаболитов, деградации бактериальных токсинов, деконъюгации желчных кислот, продукции широкого спектра антимикробных веществ - бактериоцинов.

Известно, что кишечная палочка, продуцируя колицин, оказывает бактерицидное действие на ряд патогенных энтеробактерий. Лактобактерии, образуя лактоцины, лактобревин, лактострепцин, проявляют ингибиторный эффект в отношении стрептококков, энтеробактерий и кандиды. Бифидум- и лактобактерии, ферментируя углеводы, способствуют образованию короткоцепочечных жирных кислот, обеспечивающих оптимальное значение pH в кишечнике; блокируя рецепторы эпителиоцитов, предупреждают адгезию патогенных бактерий к эпителию.

Пищеварительная функция включает в себя синтез микроорганизмами ферментов: дисахаридаз, полисахаридаз и гликозидаз, расщепляющих некрахмальные полисахариды и пищевые волокна на мономеры, подвергающиеся ферментации; липаз,

завершающих гидролиз жиров. Бифидумбактерии и ацидофильные палочки выделяют ферменты деконъюгазы, переводящие соли желчных кислот в труднорастворимые формы, акцептирующие в толстой кишке холестерин, который экскретируется с калом. При их дефиците холестерин из толстой кишки всасывается в кровь, что сопровождается гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией, вследствие чего формируется гиперхолерез желчи и стеатоз печени.

Метаболическая функция нормальной микрофлоры проявляется в синтезе эссенциальных нутриентов: витаминов группы В, К, биотина; таких важных для организма аминокислот, как аргинин и глутамин; в метаболизации гормонов и канцерогенных веществ. Аутофлора кишечника тормозит процессы декарбоксилирования пищевого гистидина, уменьшая тем самым синтез гистамина, и, следовательно, снижает риск пищевой аллергии. Микробиота пищеварительного тракта участвует в обмене микроэлементов. Некоторые энтеробактерии и кандиды могут аккумулировать на своей поверхности большое количество ионов кальция, вплоть до образования кристаллов.

Иммуномодулирующая функция проявляется, как по отношению к неспецифическим факторам защиты, так и собственно адаптивному иммунному ответу. Нормальная микрофлора, вызывая антигенное раздражение слизистых оболочек кишечника, потенцирует созревание механизмов общего и локального иммунитета, запускает и активирует синтез неспецифических гуморальных и клеточных факторов защиты. Стимулируя созревание лимфоидного аппарата кишечника, активирует синтез sIgA, продукцию цитокинов и интерферонов колоноцитами. Антигены индигенной флоры являются триггерами активации иммуносупрессорных процессов, предотвращая возникновение иммунопатологических реакций. При снижении количества бифидумбактерий, повышается проницаемость эпителиального барьера кишечника для макромолекул пищи и возникает дефицит sIgA, что приводит к развитию атопических и инфекционных заболеваний.

Сегодня большое количество исследований подтверждает тесную связь кишечной микробиоты с заболеваниями пищеварительного тракта. Так, при гастропатологии нередко выявляются нарушения микрофлоры кишечника, в тоже время изменения в составе микрофлоры кишечника, качественные и/или количественные, могут поддерживать или усугублять патологические изменения в желудочно-кишечном тракте. Целью нашего исследования было изучение состояния кишечной микробиоты у больных с гастродуоденитами.

Результаты исследований показали, что нарушения ферментативной, моторной и абсорбционной функции желудочно-

кишечного тракта ведут к нарушению переваривания нутриентов в просвете кишки, синдрому избыточного роста бактерий, способствуют развитию дисбиоза кишечника с комплексом сопутствующих нарушений и усугублением иммунологической недостаточности.

У всех больных при микробиологическом исследовании выявлены нарушения микробиоценоза кишечника. Изменения кишечной микрофлоры имели чаще умеренно выраженный и выраженный характер, соответствуя II или III степени дисбиоза. Лишь у немногих имелись незначительные дисбиотические отклонения I степени.

Дисбиотические сдвиги затрагивали как аэробный, так и анаэробный компоненты кишечного биоценоза. Наиболее часто выявлялись такие количественные изменения, как снижение содержания бифидум- и лактобактерий, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью. На фоне количественного дисбаланса микрофлоры выявлялись и изменения качественного состава: высевались гемолизирующие штаммы кишечной палочки; золотистые стафилококки; условно-патогенные энтеробактерии; с чрезвычайно высокой частотой - дрожжеподобные грибы рода Кандида.

Иммунологическое исследование выявило: снижение лизоцимной активности сыворотки крови; уменьшение количества sIgA, IgA, IgG; увеличение IgE.

Таким образом, можно постулировать положение о том, что гастроэнтерологические заболевания тесно ассоциированы с нарушениями в микробном пейзаже пищеварительного тракта. Поэтому пробиотический эффект нормальной микрофлоры служит основой профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта, аллергической патологии и аутоиммунных нарушений.

ГРИБЫ РОДА КАНДИДА ПРИ ПОРАЖЕНИЯХ СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА И ГЛОТКИ

А.А. Сазанская, В.А. Юрова

ГБОУ ВПО Минздрава России
Алтайский государственный медицинский
университет, г. Барнаул

По данным Всемирной организации здравоохранения до 20% населения всего мира поражено микозами, но лишь около 5% всех микозов являются первичными заболеваниями, в остальных случаях это вторичные процессы, развивающиеся на фоне основных расстройств различного генеза. Чаще всего возбудителями грибковых заболеваний

слизистой ротоглотки являются условно–патогенные грибы. Среди всех микотических поражений организма человека на втором месте после онихомикоза стоит кандидоз слизистых оболочек. Род *Candida* включает порядка 20 видов грибов. Поражения слизистой полости рта и глотки у человека вызывают восемь различных видов возбудителей, среди которых четыре основных: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Вид *C. albicans* выделяется со слизистой полости рта и глотки у 60% здоровых людей, другие виды – от 10 до 20% всех случаев кандидоносительства. На втором месте после *C. albicans* обычно стоит *C. glabrata*, реже – *C. krusei* и *C. tropicalis*. При этом степень обсеменения дрожжеподобными грибами в норме не должна превышать 10^3 – 10^4 КОЕ/мл. Не все врачи хорошо знакомы с данной патологией. Поэтому нередко у больных на фоне неадекватно проводимой антибиотикотерапии развиваются хронические рецидивирующие процессы.

В данной работе проводилось исследование биоптатов со слизистой ротоглотки. Посевы исследуемого материала производили на плотную и жидкую среду Сабуро и кровяной агар. На среде Сабуро оценивался рост грибов, а на кровяном агаре – рост бактериальной флоры. Идентификацию грибов проводили на основании морфологических, культуральных признаков и по характеру роста на хромогенном агаре для грибов *Candida* фирмы HIMEDIA.

Всего было обследовано 175 пациентов с поражениями слизистой ротоглотки. В диагностически значимых количествах грибы были выделены у 28 пациентов, что составило 14,9% от общего числа обследуемых. Вид *C. albicans* был выделен в 57,1% случаев (16 пациентов), *C. glabrata* – 21,4% (6 пациентов), *C. krusei* – 14,3% (4 пациента), *C. tropicalis* – 7,1% (2 пациента). Практически во всех случаях грибы выделялись в ассоциации с бактериальной флорой.

В работе подтверждена значительная роль грибов в данной патологии. Полученные результаты указывают на необходимость проведения у пациентов с поражениями слизистой полости рта и глотки не только бактериологических, но и микологических исследований с определением чувствительности к антимикотическим препаратам.

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ НА СТЕПЕНЬ ПОРАЖЕНИЯ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА У ДЕТЕЙ

М.А. Кучумова, Р.А. Файзуллина

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Казань

С развитием науки всегда менялся взгляд на этиопатогенетические особенности заболеваний органов пищеварения. Это обусловлено широким и углубленным изучением данной проблематики посредством высокотехнологических методов диагностики. Последние десятилетия ознаменовались значительными открытиями в разных областях науки, что коренным образом изменило мнение о считавшихся ранее причинах развития заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Одним из основных этиологических факторов хронических воспалительных заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки в настоящее время считается инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Однако в последних исследовательских работах появились сообщения об обнаружении бактерий рода *Helicobacter* у больных в органах гепатобилиарной системы. Данные работы выполнены у взрослого населения, аналогичных исследований среди детей найдено не было.

Материал и методы: Обследовано 22 пациента с хроническими заболеваниями гастродуоденальной и гепатобилиарной систем: мальчиков было 11, девочек – 11. Возраст обследованных пациентов варьировал от 9 до 17 лет, средний возраст составил 11 лет.

Всем детям проведен полный комплекс диагностических мероприятий согласно медико-экономическим стандартам диагностики хронического гастродуоденита (ХГД) и хронического холецистохолангита (ХХХ), дисфункции желчного пузыря и желчевыводящих путей (ДфЖП). Изолированный гастродуоденит был выявлен у 1 пациента (4,5%), хронический поверхностный гастродуоденит с дисфункцией желчного пузыря и желчевыводящих путей у 12 (54,5%) и хронический гастродуоденит с хроническим холецистохолангитом у 9 (40,9%).

На I-м этапе с помощью дыхательного теста (ХЕЛИК®-тест) выявлялись группа детей и подростков, ассоциированных с *Helicobacter pylori*. Для этого использовались индикаторные «Хелик» – трубки (ООО «АМА», Россия, Санкт-Петербург).

При отсутствии противопоказаний к дуоденальному зондированию проводилось фракционное дуоденальное зондирование при помощи одноразовых зондов с последующим микроскопическим, биохимическим и бактериологическим исследованием порций желчи.

Результаты:

Среди обследованных детей положительный уреазный тест зафиксирован у 19 пациентов (86%). Среди них НР – инфекция чаще регистрировалась у больных с ХГД + ДфЖП (у 57,9%), чем у больных с ХГД + ХХХ (у 36,8%).

Во время фракционного дуоденального зондирования время выделения порций желчи, их количество, рН, микроскопия, посев желчи на специальный кровяной агар. рН – желчи в основном отмечалась слабо и умеренно щелочная. Тем не менее, встречались и нейтральные показатели, что возможно говорит за наличие желчного рефлюкса. Эти данные требуют дальнейшего изучения.

Учитывая агрессивность среды желчи, в нашем исследовании все-таки получилось высеять *H. pylori* из собранных порций, в пределах 5 % от общего количества. Основные жалобы и клиническая картина соответствовала хроническому гастродуодениту и дисфункции желчного пузыря и желчевыводящих путей. При ФЭГДС определялся поверхностный гастробульбит. При УЗИ органов брюшной полости зарегистрированы сонографические признаки дисфункции желчного пузыря и желчевыводящих путей на фоне аномалии строения желчного пузыря.

Выводы:

Изучение влияния микробной колонизации на характер поражения верхних отделов пищеварительного тракта у детей является весьма перспективным направлением. В 86% случаях это хеликобактер-ассоциированная патология.

Большую частоту у детей занимает совместная патология гастродуоденальной и гепатобилиарной систем. Определение связи между генотипами *H. pylori* и клиническими проявлениями у лиц, инфицированных определенными штаммами, представляет большой научный и практический интерес. Наши результаты требуют дальнейшего изучения. В частности, планируется изучение характера микробной колонизации слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, дуоденального содержимого, в том числе и с НР. Генотипирование бактерий рода *Helicobacter*. Разработать наиболее эффективные схемы эрадикации с учетом выявленных показателей антибиотикорезистентности *H. pylori*.

ОПТИМИЗАЦИЯ СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НА ДО- И ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ЭТАПАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЁГКОГО В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЁГКИХ С ЦЕЛЬЮ ПРОФИЛАКТИКИ НОЗОКОМИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ.

В.В. Шевцов, С.Д. Митрохин, А.Ю. Миронов, А.Н. Жакот, А.А. Соколов

Московская городская онкологическая больница № 62;
ГБОУ ВПО Первый Московский медицинский государственный
университет им. И. М. Сеченова

Цель исследования: разработка протокола сопроводительной терапии на до– и послеоперационном этапах у больных раком лёгкого в сочетании с хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) для снижения частоты развития нозокомиальной пневмонии в послеоперационном периоде.

Материалы и методы исследования. Отобрано 60 пациентов с диагнозом рак лёгкого и хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ): 56 мужчин и 4 женщины в возрасте от 42 до 81 г. Средний возраст больных составил – $61,5 \pm 19,5$ лет. Пациенты разделены на основную и контрольную группы. В основной группе у 12 (40%) пациентов диагностирована ХОБЛ первой, у 17 (56,7%) - второй и у 1 (3,3%) - третьей стадии. В контрольной группе у 15 (50%) пациентов диагностирована ХОБЛ первой, у 12 (40%) - второй и у 3 (10%) - третьей стадии. Все пациенты получили хирургическое лечение по поводу рака лёгкого. У всех пациентов проводилось исследование по схеме: 1) анализ кала на дисбиоз при поступлении и после лечения; 2) исследования функции внешнего дыхания с оценкой ОФВ₁/ФЖЕЛ, ОФВ₁; 3) проведение бронходилатационного теста – повторное исследование функции внешнего дыхания через 15 мин после вдыхания четырех доз сальбутамола по 100 мкг; 4) методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) исследование мокроты и кала (до и после завершения лечения); 5) посев мокроты (до и после завершения лечения). Пациенты основной группы получали пробиотик «Нормоспектрум» за 7 дней до операции и 10 дней после операции. За день до операции им проводилась селективная деконтаминация кишечника (СДК) по схеме: канамицин 0,5х4 раза в день; клбакс (*Clarithromycin*) 0,5х2 раза в день; метронидазол 0,5х3 раза в день. Всем пациентам основной и контрольной групп проводилась периоперационная антибиотикопрофилактика (ПАП) цефуроксимом внутривенно по схеме: первая доза (1,5 гр.) за 40-60 мин до начала операции; вторая доза (0,75

гр.) через 8 часов после введения первой дозы; третья доза (0,75 гр.) через 8 часов после введения второй дозы.

Результаты исследования. В послеоперационном периоде в основной группе у 8 пациентов диагностированы инфекционные осложнения со стороны бронхо-лёгочной системы, что составило 25,6% от всех больных этой группы. В контрольной группе инфекционные осложнения со стороны бронхо-лёгочной системы развились у 16 больных, что составило 53,3% от всех пациентов контрольной группы. Методом ГЖХ анализа произведено исследование мокроты в основной и контрольной группе до и после лечения. Повышение абсолютной концентрации КЖК в мокроте в основной и контрольной группах до лечения свидетельствует об увеличении численности и активности микроорганизмов. Анализ качественного содержания КЖК свидетельствует о повышении относительного содержания пропионовой и масляной кислот при снижении содержания уксусной кислоты, что свидетельствует о снижении активности аэробов и активизации анаэробов, в частности бактероидов, клостридий, фузобактерий, продуцирующих данные кислоты. К этому же выводу приводит анализ значений АИ, свидетельствующий о смещении окислительно-восстановительного потенциала внутриполостной среды в область резко отрицательных значений, способствующей активизации анаэробов. После проведённого лечения в основной и контрольной группе отмечается улучшение всех показателей, что свидетельствует об улучшении микробиоценоза дыхательных путей. При сравнении показателей мокроты пациентов основной и контрольной групп после лечения более низкое абсолютное содержание КЖК в основной группе указывает на снижение активности и численности условно-патогенной микрофлоры по сравнению с контрольной группой. Улучшение показателей АИ в основной группе после лечения по сравнению с контрольной, а также более выраженная разница между показателями АИ до и после лечения свидетельствует о снижении активности анаэробов в этой группе. Более высокие показатели (iC_5/C_5) в контрольной группе после лечения по сравнению с основной группой показывают рост «микроорганизмов-гемолитиков», и др. представителей условно-патогенной микрофлоры, в частности клостридий и бактероидов. Данные полученные при исследовании мокроты методом ГЖХ подтверждаются данными культурального исследования мокроты. У пациентов основной группы до назначения препарата-пробиотика в сочетании с СДК грамположительные бактерии выделялись у 51% больных, грамотрицательные у 21,3%, *Candida albicans* у 27,7%. После проведения терапии пробиотиком в сочетании с СДК

грамположительные бактерии выделялись у 48%, грамотрицательные только у 8%, *Candida albicans* у 24% больных. В мокроте пациентов контрольной группы после проведения терапии грамположительные бактерии выделены у 47%, грамотрицательные у 24,4%, *Candida albicans* у 28,6%. Выявлено достоверное снижение количества грамотрицательных бактерий в мокроте больных основной группы. При ГЖХ исследовании фекалий у пациентов основной и контрольной групп до лечения наблюдается снижение в 2–2,5 раза абсолютной концентрации КЖК по сравнению с нормой, что свидетельствует о снижении активности и численности индигенной микрофлоры толстой кишки. В профиле C_2 - C_4 кислот снижена доля уксусной кислоты и повышена доля пропионовой и масляной кислот, что связано со снижением количества индигенной микрофлоры, в частности бифидо- и лактобактерий и увеличением численности и активности анаэробов, представленных в основном бактероидами и пропионибактериями. О том же свидетельствует анализ значений АИ, указывающий на смещение окислительно-восстановительного потенциала внутриполостной среды в область резко отрицательных значений, способствующей развитию анаэробов. Повышение (iC_5/C_5) свидетельствует об увеличении гемолитической активности микрофлоры и связано с активизацией гемолитических микроорганизмов и др. представителей условно-патогенной микрофлоры, в частности клостридий и бактероидов. После проведённого лечения в основной группе отмечается более высокое абсолютное содержание КЖК, что свидетельствует об увеличении активности и численности индигенной микрофлоры толстой кишки по сравнению с контрольной группой. Улучшение показателей АИ в основной группе после лечения по сравнению с контрольной указывает на снижение активности факультативных анаэробов в этой группе. Повышение (iC_5/C_5) в контрольной группе после лечения и снижение этого показателя в основной группе после лечения показывает рост гемолитических микроорганизмов и др. условно-патогенных микроорганизмов, в частности клостридий и бактероидов в контрольной группе после лечения относительно основной группы. Проведённое всем больным до лечения культуральное исследование проб кала, показало наличие у всех дисбиоза толстой кишки различной степени тяжести. После лечения у пациентов основной группы отмечено нормализация количества бифидобактерий и лактобактерий, уменьшение выделения *E. coli* Hly+ и *E. coli* lac-. Количество условно-патогенных энтеробактерий не изменилось у 36,7% пациентов до и после лечения, но отмечалось увеличение количества *Candida spp.* с 6,7% до 36,7%. После лечения у пациентов группы сравнения микробный статус сохранился

или имел тенденцию к усугублению показателей; отмечалось дальнейшее снижение количества бифидобактерий и лактобактерий, увеличения содержания *E. coli* Hly+ и *E. coli* lac-. Отмечается увеличение содержания условно-патогенных энтеробактерий с 10% до 43,3%, снижение содержания *Candida spp.* с 16,7% до 13,3%. Это сказалось на изменениях степени выраженности дисбиоза. В основной группе после комплексного лечения отмечено снижение степени выраженности дисбиоза. В основной группе до лечения 0 ст. дисбиоза отмечена у 3,3%, 1 ст. – у 30% пациентов, 1–2 ст. – у 23,4%, 2 ст. – у 40%, 3 ст. – у 3,3%. После лечения 1 ст. дисбиоза отмечена у 43,3% пациентов, 1–2 ст. – у 36,7%, 2 ст. – у 20%, 2–3 ст. и 3 ст. не зарегистрированы. В группе сравнения после проведённого лечения отмечается нарастание степени выраженности дисбиоза. До лечения 1 ст. дисбиоза отмечена у 46,7% пациентов, 1–2 ст. – у 20%, 2 ст. – у 30%, 2–3 ст. – у 3,3%. После лечения 1 ст. дисбиоза отмечена у 20% пациентов, 1–2 ст. у 16,7%, 2 ст. – у 50%, 3 ст. – у 13,3%.

Выводы:

При сравнении показателей ГЖХ анализа мокроты и кала основной и контрольной группы после лечения в основной группе отмечается снижение активности и численности условно– патогенной микрофлоры по сравнению с контрольной группой, где после лечения имеется рост гемолитических микроорганизмов, и др. условно-патогенной микрофлоры.

При культуральном исследовании мокроты после лечения выявлено снижение количества грамотрицательных микроорганизмов в основной группе и увеличение в контрольной группе.

По данным бактериологического исследования кала в основной группе после лечения отмечено снижение степени выраженности дисбиоза, а в контрольной группе его нарастание за счёт снижения количества лактобацилл, увеличения количества *E. coli* Hly+ и *E. coli* lac- и условно–патогенных энтеробактерий.

Предложенный протокол сопроводительной терапии позволил в 2 раза снизить количество нозокомиальных пневмоний в послеоперационном периоде у этой категории больных.

СОСТОЯНИЕ ГИГИЕНЫ ПОЛОСТИ РТА И УРОВЕНЬ САНИТАРНОГО ОБРАЗОВАНИЯ У ДЕТЕЙ ШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА

О.В.Езерская, У.О.Стадник

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого
Кафедра стоматологии детского возраста
г. Львов, Украина

Согласно данным ВОЗ санитарное образование является базовым методом профилактики. Она объединяет распространение медицинских и гигиенических знаний, в воспитании у населения гигиенических навыков с целью сохранения и укрепления здоровья и повышения санитарной культуры. Отношение человека к гигиене полости рта во многом зависит от социальных условий, уровня культуры и образования, места проживания, жизненных привычек и др. Известно, что существует прямая связь между неудовлетворительной гигиеной полости рта и стоматологическим статусом. Исследования последних лет выявили низкий уровень санитарно-гигиенических знаний среди детей дошкольного и школьного возраста. Преимущественно как дети, так и взрослые – родители, воспитатели, учителя – необходимую информацию получают из рекламных источников, тогда как основные данные в получении таких знаний должны давать врачи-стоматологи и врачи-гигиенисты. Поэтому внедрение в практику врача-стоматолога знаний и навыков гигиенического ухода за полостью рта повышает эффективность профилактики стоматологических заболеваний.

Учитывая это, апробированная и внедренная на кафедре стоматологии детского возраста ЛНМУ имени Данила Галицкого инновационная форма обучения по вопросам профилактики стоматологических заболеваний у детей в виде конкурса на лучшую студенческую работу о "Профилактике стоматологических заболеваний у детей" (2004 г.) и "Уроков здоровья" согласно проекту программы "Детям Львовщины – стоматологическое здоровье" (2007 г.) в процессе подготовки молодых специалистов является достаточно актуальной и эффективной. Неотъемлемой составляющей этой формы обучения студентов является производственная практика, во время которой студенты проводят санитарно-просветительскую работу, определяют уровень санитарно-гигиенических знаний и анализируют состояние гигиены полости рта у детей, которые проходят санацию ротовой

полости в рамках амбулаторного стоматологического приема во Львовской области.

За время производственной практики студенты обследовали 295 детей в возрасте от 6 до 12 лет. Состояние гигиены полости рта определяли при помощи индекса Федорова-Володкиной. При помощи специально разработанных анкет было проведено анкетирование детей и определен уровень санитарно-гигиенических знаний.

Результаты исследований: хорошее состояние гигиены полости рта (1–1,5 балла) у $10,68 \pm 1,2\%$ детей, удовлетворительное (индекс гигиены в пределах 1,6–2,6 балла) у $18,82 \pm 0,98\%$ детей, неудовлетворительный уход (2,1–2,5 балла) у $39,9 \pm 1,57\%$ детей, плохое состояние (2,6–3,4 балла) у $16,33 \pm 1,17\%$ и очень плохой уход за полостью рта (более 5 баллов) у $14,27 \pm 0,96\%$ детей.

Оценивая количественные показатели гигиенического состояния полости рта в баллах определено, что среднее значение индекса гигиены у обследованных детей составляет $3,05 \pm 0,06$ балла. Наибольшее значение индекса Федорова-Володкиной ($3,12 \pm 0,13$ балла) констатировано у детей 6-летнего возраста, а наименьшее ($2,83 \pm 0,08$ балла) – в группе школьников 12 лет.

При анализе результатов анкетирования выявлено, что большинство детей начали чистить зубы с 6-летнего возраста – $52,2 \pm 1,04\%$, а $28,5 \pm 1,08\%$ детей с 9-10 лет и только $19,3 \pm 1,01\%$ опрошенных эту процедуру начали с 3–4-х летнего возраста.

Готовность детей до процедуры чистки зубов противоречива. Так, каждый день чистят зубы $58,48 \pm 1,47\%$, а только $31,43 \pm 1,7\%$ из них делают это дважды в день, утром и вечером, $38,51 \pm 1,43\%$ школьников чистят зубы периодически, а $3,01 \pm 1,04\%$ – не чистят вообще.

Процент детей, которые вообще не чистят зубы, уменьшается с возрастом: с $27,62 \pm 1,54\%$ среди детей 6-ти лет и до $8,69 \pm 0,84\%$ среди 12-летних школьников.

Анализ методики чистки зубов свидетельствует о том, что $59,68 \pm 1,69\%$ опрошенных детей неправильно чистят зубы. Они делают только горизонтальные движения и тратят на эту процедуру до 1 мин. Только $40,32 \pm 1,36\%$ анкетированных школьников, придерживаются правильной методики чистки зубов, чередуя вертикальные, горизонтальные и круговые движения щетки.

Таким образом, гигиеническое состояние полости рта у обследованных детей, в основном, характеризуется как плохое. В большинстве случаев дети нерегулярно следят за полостью рта, но с возрастом их количество уменьшается. Такая тенденция, безусловно, свидетельствует о том, что с возрастом у детей вырабатываются стойкие

гигиенические навыки, которые позволяют поддерживать удовлетворительное состояние гигиены полости рта и, следовательно, самостоятельно проводить профилактику стоматологических заболеваний и поддерживать здоровье всего организма.

Данные анкетного опроса детей школьного возраста свидетельствуют о низком уровне санитарно-гигиенических знаний. Такая ситуация свидетельствует о недостаточном информировании данной категории населения относительно вопроса о правилах гигиенического ухода за полостью рта. Врачи–стоматологи и врачи-гигиенисты не всегда владеют необходимыми навыками профилактики стоматологических заболеваний, что также отражается на уровне санитарно-гигиенических знаний детей касательно этого вопроса.

Таким образом, гигиеническое обучение и воспитание является одной из основных и необходимых цепей первичной профилактики стоматологических заболеваний у детей, а оптимальным решением этой проблемы, по нашему мнению, является проведение "Уроков здоровья" среди детей разных возрастных групп.

СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗДОРОВЬЕ И УРОВЕНЬ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НАВЫКОВ У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ПРИКАРПАТСКОМ ЭНДЕМИЧЕСКОМ ОЧАГЕ ЗОБА

О.В. Езерская, О.В. Гоняк.

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого
Кафедра стоматологии детского возраста
г. Львов, Украина

Актуальность. Здоровье ребенка – показатель социально-экономического и медико–социального состояния общества и является критерием эффективности проведения санитарно-гигиенических и лечебно–профилактических мероприятий.

Йододефицит – одна из основных причин неполноценного развития ребенка и имеет "почетное" третье место среди заболеваний с какими сталкиваются дети.

В 2004 году ВОЗ опубликовала обзор йодной обеспеченности разных регионов Земного шара. Согласно им, около 2 млрд. жителей планеты постоянно находятся в зоне йодного дефицита (ЙД), среди них 285 млн жителей это дети (36,4%). Наличие йодного дефицита установлено в 121 странах мира, среди них самая низкая нехватка йода в

организме человека в Северной Америке, самый высокий показатель йододефицита – в странах Европы (59,9%). Эпидемиологические исследования большинства регионов России свидетельствуют о легком и умеренном дефиците йода. Йододефицит разной степени тяжести характерен для населения всей территории Украины. Для большинства областей – йододефицит легкой и средней степеней тяжести, а для Западных областей Украины – тяжелой. Зобная эндемия в Прикарпатском регионе (Львов и Львовская обл.) составляет 37,2% населения.

Известно, что 50% здоровья обеспечивается способом жизни человека, 20% – состоянием внешней среды, 8% – качеством медицинской помощи и 2% – другими средствами. Данные исследований свидетельствуют о прямой зависимости состояния зубов у детей от экологических и геохимических условий региона, в каком они проживают. Решение проблемы ЙД – это внедрение постоянной, обязательной и длительной йодной профилактики (ЙП).

Стратегия действий для ликвидации ЙД включает: общее йодирование пищевой соли; постоянный мониторинг эффективности профилактических программ.

Целью нашей работы было изучить стоматологический статус у детей с заболеваниями щитовидной железы (ЩЖ), проживающих в Прикарпатском эндемическом очаге зоба, и, при помощи социологического метода опроса, определить уровень санитарно-гигиенических навыков среди данного контингента детей.

Объект и методы исследования. Для решения поставленной цели нами было проанализировано медицинская документация (истории болезни), проведено анкетирование и стоматологическое обследование 45 больных детей в возрасте от 7 до 18 лет с увеличением ЩЖ Ia, Ib и II степени, которые находились на стационарном лечении в Львовском областном эндокринологическом диспансере.

Результаты исследования. Обследование детей с патологией ЩЖ выявило высокую, почти 100%, поражаемость зубов кариесом, зубочелюстные аномалии разной степени – в 62%, в том числе, аномалии прикуса – 35,7%, бруксизм – 48%, некариозные поражения (системная гипоплазия) – в 12%. Оценка состояния гигиены полости рта у детей: младший школьный возраст – плохая, старшая возрастная группа – удовлетворительная. Социологический метод опроса (анкетирование) выявил низкий уровень санитарно-гигиенических знаний во всех возрастных группах детей. Важно отметить отсутствие мотивации и позднее обращение за стоматологической помощью (68%); недостаток соответствующей информации по гигиеническому воспитанию и

профилактике стоматологических заболеваний (55%); игнорирование правил гигиены полости рта (89%); несоответствие рациональному и сбалансированному питанию (ок.9%); низкий уровень употребления йодированной соли и морепродуктов (30%).

Выводы. Таким образом, данные исследований свидетельствуют о том, что экологически неблагоприятная ситуация является причиной увеличения общесоматической патологии и стоматологических заболеваний и имеет прямую зависимость от своевременного выявления и устранения причин. Организация периодических массовых обследований населения, а также внедрение методов ИП – это задача медицины на сегодня. Поэтому, применение системы мониторинга позволит повысить эффективность ИП, избежать негативных последствий и значительно улучшить здоровье.

МИКРОФЛОРА КИШЕЧНИКА ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ДЕТЕЙ НА ФОНЕ ЕЕ КОРРЕКЦИИ

*М.Б. Каримова, А.М. Дусмагамбетова, М.У. Дусмагамбетов,
Г.М. Сейтгалиев, Э.М. Акимбекова*

АО «Медицинский университет Астана»,
г. Астана, Республика Казахстан

Лечение и профилактика острых респираторных инфекций (ОРИ) у детей является одной из самых актуальных проблем педиатрии, на их долю, особенно в осенне-зимний период, приходится более 90% всех обращений за амбулаторной помощью. Инфекции дыхательных путей относятся к наиболее распространенным заболеваниям в детском возрасте. Из-за частых заболеваний респираторного тракта этих детей принято объединять в группу часто болеющих детей (ЧБД).

Факторы, формирующие общий фон, предрасполагающий к частым простудным заболеваниям, на сегодняшний день полностью не выяснены. Высокую заболеваемость детей группы ЧБД большинство исследователей связывают с неэффективностью работы иммунной системы, наличием различных дисбиотических нарушений и, как следствие, низкой колонизационной резистентностью слизистых.

Микрофлора кишечника является одним из факторов, обеспечивающих колонизационную резистентность организма ребенка в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, оптимальное функционирование его пищеварительной системы, становления обменных процессов и иммунного статуса. Кроме того, одной из важнейших функций желудочно-кишечного тракта является его

участие в формировании общей иммунобиологической реактивности организма. Под воздействием различных неблагоприятных факторов формируются стойкие дисбиотические нарушения, способные приводить к угнетению функций иммунной системы макроорганизма с возникновением дисметаболических состояний и извращенных иммунологических реакций.

По данным ряда авторов, у детей с частыми ОРЗ дисбактериоз кишечника I–II степени выявляется в 50–90% случаев (Николаева И.В., 2000; Феклисова Л.В., 2002; Перковская А.Ф., 2004). При этом наблюдается повышенная колонизация слизистой кишечника условно-патогенными микроорганизмами.

В работе Шишкиной Т.А. показано, что в крупных промышленных городах выявляются нарушения количественного и качественного состава микробной флоры кишечника ЧБД: достоверное снижение среднего уровня Ig концентрации *Lactobacillus* (при $p < 0,001$), повышение – *E. coli* со сниженными ферментативными свойствами (при $p < 0,01$), среди условно-патогенных микроорганизмов – увеличение *Proteus* (при $p < 0,01$) относительно нормативных показателей здоровых детей.

Исследования Султановой О.Д. также показали, что большинство ЧБД имеют дисбактериоз кишечника с преобладанием нарушений, соответствующих 2-й степени, характеризующийся снижением содержания лактобактерий, бифидобактерий, появлением лактозонегативных и гемолитических кишечных палочек. При этом было отмечено, что использование жидких (Нормофлорины L и B) и сухих (Линекс) штаммов пробиотиков для коррекции дисбактериоза кишечника у детей оказывает микробиологический и иммуномодулирующий эффекты.

В последнее время активно изучаются свойства и эффекты, оказываемые на организм человека, продуктов, направленных на коррекцию нарушений нормальной микрофлоры.

Среди препаратов, корригирующих различные дисбиотические изменения в микрофлоре, в настоящее время широко применяются пробиотики, реже – пребиотики. Пробиотики – это живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения положительные эффекты на физиологические и метаболические функции, а также биохимические и иммунные реакции организма хозяина через оптимизацию его микроэкологического статуса.

Воздействия, которые оказывают пробиотики на макроорганизм, сходно с таковым для компонентов нормальной микрофлоры. Действия

пробиотиков не сводится к простому заселению кишечника, их влияние более сложно и многопланово. Это – конкуренция с патогенной и условно-патогенной микрофлорой; адгезия к слизистой оболочке кишечника, иммуномодулирующий эффект.

В последние годы получены объективные данные об эффективности использования пробиотиков в профилактике и лечении ОРЗ. Так, по результатам многоцентрового исследования Феклисовой Л.В. и соавт. по применению комбинированного препарата–пробиотика «Флорин форте», у больных с респираторными инфекционными заболеваниями отмечалась тенденция к восстановлению количественно-качественного состава облигатных представителей: увеличилось число детей с нормальным содержанием бифидобактерий и лактобактерий, в меньшем проценте случаев высевалась гемолизирующая кишечная палочка. С учетом клинической эффективности Флорин форте пациенты реже нуждались в антибактериальной терапии, отмечено достоверное сокращение сроков стационарного лечения.

Также в исследовании deVreseM. при использовании комплекса пробиотических бактерий (*Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5) наблюдали существенное снижение выраженности основных симптомов острых респираторных заболеваний (ОРЗ) и средней продолжительности заболевания. Ведущим механизмом полученного результата явилась биоценозопосредованная активация клеточного иммунитета – повышение уровня цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) и Т-хелперов (CD4⁺).

В ходе другого исследования прием мульти пробиотического комплекса (*Lactobacillus GG*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium*) сопровождался снижением числа потенциально патогенных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* и бета–гемолитический стрептококк группы А) на слизистых оболочках верхних дыхательных путей. Учитывая тот факт, что в этих исследованиях пробиотические микроорганизмы не обнаруживали в микрофлоре полости носа после их приема, полагают, что это обусловлено не конкурентным или бактерицидным действием пробиотиков, а повышением иммунного ответа организма. Следовательно, терапевтическая эффективность пробиотиков не ограничивается только коррекцией микрoэкологических нарушений в отдельно взятом биотопе, а посредством активации системы иммунологического гомеостаза способна повысить эффективность лечения различных заболеваний.

Коррекция микрофлоры кишечника с помощью пробиотиков у часто болеющих детей имеет перспективы в плане повышения общей

сопротивляемости к инфекциям. Это связано с тем, что именно бактерии, являющиеся представителями нормальной микрофлоры и попадающие разными путями в организм извне, а также продукты их жизнедеятельности и распада, являются естественными стимуляторами и регуляторами иммунной реактивности человека. Наиболее часто используют пробиотики, содержащие бифидобактерии, лактобактерии, энтерококки, кишечную палочку. При введении в организм, бактериальные препараты имитируют естественный ход активации иммунной системы, при этом усиливается не только антибактериальный иммунитет, но и противовирусные, противогрибковые и противоопухолевые защитные механизмы организма.

Таким образом, исходя из вышеизложенного, актуальной на сегодняшний день остается проблема улучшения качества жизни, а также изучения состояния микробиоценоза кишечника и методы их коррекции у ЧБД.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФУРАНОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

В.Е. Митько, А.Б.Маргулис

ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», г. Казань

Одной из важнейших проблем современной микробиологии и медицины является все большее распространение бактериальных возбудителей, устойчивых к традиционным лекарственным препаратам. Особенно ярко эта проблема иллюстрируется широким распространением внутрибольничных инфекций, которые регистрируются в отделениях интенсивной терапии более чем у 20% пациентов. Распространение устойчивых к лекарственным препаратам форм патогенных бактерий, снижающее эффективность и обесценивающее все большее количество обычно применяемых традиционных лекарственных средств, и необходимость разработки способов подавления образования бактериями биоплёнок ставят вопрос о новых стратегиях борьбы с инфекционными заболеваниями, о создании лекарственных средств нового поколения, воздействующих на специфические биохимические системы микроорганизмов. Микроорганизмы обладают специфической системой регуляции роста и развития, включающей определенные биохимические механизмы, связанные с накоплением и физиологической активностью ауторегуляторных молекул.

В настоящее время принято считать, что одной из наиболее перспективных "мишеней" подобного рода является QS (quorum sensing) –регуляция. QS–системы участвуют в регуляции вирулентности бактерий и формировании ими биопленок.

Подавление функционирования QS-систем регуляции может быть достигнуто при помощи антагонистов аутоиндукторов, которые мешают связыванию аутоиндуктора с молекулами рецепторных белков. Показано, что такие ингибиторы могут конкурировать с АГЛ – в этом случае они структурно близки сигнальной молекуле аутоиндуктора и взаимодействуют с участком связывания АГЛ с рецепторным белком, но не активируют этот белок. Неконкурентные ингибиторы могут иметь слабое сходство с АГЛ, или вообще не быть сходными с ним. Эти соединения связываются с различными участками рецепторного белка. Подобные ингибиторы активно изучаются в настоящее время.

Все больше внимания уделяется природным антагонистам аутоиндукторов QS, производным фуранонов, в том числе галогенизированным. Обнаружено, что австралийская красная водоросль *Delisea pulchra* синтезирует различные галогенизированные фураноны, препятствующие колонизации этой водоросли морскими бактериями, у которых QS-система участвует в регуляции метаболических процессов, и, таким образом, защищает растения от действия бактерий. Фураноны *D. pulchra* содержат фурановое кольцо с замещенной в положении С–3 ацильной цепью и атомами брома в положении С–4. Замещения в положении С–5 могут варьировать.

Целью нашей работы было оценить влияние серосодержащих производных фуранонов на плотно-зависимые процессы у бактерий.

В работе решались следующие задачи:

–определить токсические и мутагенные эффекты серосодержащих производных фуранонов.

–оценить различия в скорости пигментообразования у *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии фуранонов.

–охарактеризовать изменение антибиотической активности выделенного штамма *Streptomyces* по отношению к *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии исследуемых соединений.

–оценить изменение антибиотикорезистентности *Micrococcus lysodeicticus* и *Serratia marcescens* при действии фуранонов.

В ходе работы применяли следующие фураноны: 5-гидрокси-4-[(4-метилфенил) сульфонил]-3-хлор-2(5Н)-фуранон (фуранон 1), 5-[(4-метилфенил)сульфонил]-3,4-дихлор-2(5Н)-фуранон (фуранон 2) и 7-гидрокси-2,3-дигидро-[1,4]дитиино[2,3-с]фуран-5(7Н)-он-4-оксид (фуранон 3) в концентрациях от 0,1 до 10 мкг/мл.

Были получены следующие результаты. Исследуемые серосодержащие производные фуранонов не проявили токсических эффектов в концентрациях от 0.1 до 10 мкг/мл. Исследуемые соединения не проявили мутагенных эффектов в концентрациях от 0.1 до 10 мкг/мл, за исключением фуранона №1 в концентрации 10 мкг/мл. Далее он был выбран в качестве исследуемого объекта в последующих экспериментах.

Показано, что, не оказывая токсического воздействия на клетки *Serratia marcescens*, фуранон в концентрациях 1 и 10 мкг/мл способен подавлять образование пигмента. Для *Micrococcus lysodeicticus* и *Streptomyces ssp.* показано снижение способности к образованию пигментов при совместном воздействии ацилгомосеринлактона с фураноном. Установлено, что образование антибиотика у данного *Streptomyces ssp.* начинается к 6-м суткам. Наибольшую чувствительность к антибиотику к 7-м суткам проявляют клетки *Micrococcus lysodeicticus* в контрольном образце и с обработкой ацилгомосеринлактоном. Клетки *Micrococcus lysodeicticus* более чувствительны к вырабатываемому антибиотику, по сравнению с *Serratia marcescens*.

Клетки *Serratia marcescens*, обработанные фураноном, в том числе, при совместном инкубировании с ГСЛ, не чувствительны к синтезируемому стрептомицетом антибиотику. Тот же эффект наблюдается и для микрококка, но на более ранних сроках (к 7-м суткам роста стрептомицета), а к 9-м суткам чувствительность к антибиотику клеток *Micrococcus lysodeicticus*, обработанных фураноном, увеличивается.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (ГК 14.740.11.1040).

НОВЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О БИМЕДИЦИНСКИХ СВОЙСТВАХ ПРОБИОТИКОВ

В. А. Емельяненко

Федеральное государственное унитарное предприятие
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток и предприятие по производству
бактерийных препаратов»

Пересмотреть бытующую точку зрения на пробиотики заставили, с одной стороны, не очень популярные, но распространённые примеры неэффективности их приёма с позиции влияния на собственную микробиоту, с другой стороны – эффективность пробиотических

препаратов в улучшении состояния здоровья при многих недугах организма. Новый взгляд на биомедицинские свойства пробиотиков сможет разрешить эту проблему. Сформулированные нами предположения основаны на обзоре литературных данных и собственных наблюдениях.

Адгезивная активность – не главное свойство пробиотических микроорганизмов. Доминирующая точка зрения на значение пробиотиков заключается в том, что бактерии, вводимые в организм в составе препаратов, продуктов, БАД, становятся активным компонентом симбиотной микрофлоры и приступают к выполнению своих функций. Исход, когда бактерии не смогли прижиться в макроорганизме сразу, наиболее вероятен. Тем не менее, их положительный эффект проявляется нередко даже при отсутствии пролонгированного действия. Адгезия к эпителию и дальнейшая пролиферация в максимальной степени зависит от индивидуальных особенностей, как штамма микроорганизма, так и от макроорганизма-хозяина. Может ли высокая адгезивная активность пробиотических штаммов гарантировать исключение патогенов кишечного эпителия? Однозначно положительный или отрицательный ответ на этот вопрос дать нельзя. Даже транзитный проход пробиотических бактерий через желудочно-кишечный тракт не остаётся бесследным для организма, а воздействует на него благоприятным образом. С этой точки зрения адгезивность – важный, но не решающий признак. Кроме того, некоторые авторы указывают, что одним из механизмов действия пробиотиков является транслокация микроорганизмов в кровь, лимфу, селезёнку, печень через эпителиальный барьер слизистых оболочек пищеварительного тракта. Живые бактерии выделяют биологически активные вещества (протеолитические ферменты, бактериоцины, антибиотики, иммуномодуляторы и пр.). Погибая, бактерии служат источником антигенов, способствующих стимуляции иммунитета и поддержанию уровня нормальных антител. Очевидно, что с лечебной целью эффективнее будут действовать жидкие препараты с активными жизнеспособными клетками и их метаболитами, даже в условиях их низкой адгезивной активности.

Антагонистическая активность – не главное свойство пробиотических микроорганизмов. При изготовлении пробиотических препаратов ведущим критерием остаётся их антибактериальная активность, прежде всего в отношении условно патогенных микроорганизмов. В свете новых представлений о биомедицинских свойствах пробиотиков мы принимаем положение, согласно которому антагонистическая деятельность бактерий микробиоты, как и в составе

пробиотических препаратов, не самая важная. Способность к ингибированию бифидобактериями условно патогенных бактерий, проявляющаяся в кислой среде, теряется при её нейтрализации. Это указывает, что антагонизм – не единственное оружие пробиотических бактерий, особенно в нейтрализуемых препаратах с низкой адгезивностью бактерий, но, тем не менее, эффективных для пациента. В пробиотических препаратах, видимо, антагонистические взаимодействия не занимают такое важное место, как в микробиоте, так как обычно препараты находятся в нейтрализованной форме, когда антибактериальное влияние кислой среды сведено к минимуму. Но если штамм-пробиотик является продуцентом антибактериальных субстанций, отличных от кислот, то такой препарат будет мощным аналогом антибиотика. Среди одних и тех же видов встречаются как сильные, так и слабые антагонисты. Антагонистическая активность – довольно лабильный, меняющийся под воздействием разных факторов, но, тем не менее, генетически закреплённый признак. Антагонизм микроорганизмов обусловлен также скоростью размножения микробной популяции, конкуренцией за источник питания и выработкой других веществ, подавляющих условно патогенные бактерии, в частности, лизоцима и пероксида водорода.

Иммуномодулирующая активность – важнейшее свойство пробиотических микроорганизмов. Возможно, это самая основная роль как пробиотических бактерий, вводимых извне, так и собственно микробиоты хозяина. Доказательств этому в литературе существует немало: действие убитых клеток бифидобактерий на некоторые функции фагоцитов (повышение потребления глюкозы, стимулирование цитотоксичности, усиление образования цитокина), повышение уровня митогенной активности исследуемых штаммов в опытах *in vitro*, что связано с влиянием бифидобактерий на иммунную систему макроорганизма *in vivo*. Клетки пупочной крови новорождённых являются потенциальными продуцентами интерлейкина ИЛ 12 после стимуляции *Bifidobacterium adolescentis* и *Lactobacillus plantarum*. Изучен иммуномодулирующий эффект белковых фракций, выделенных из бифидобактерий. Аллергия, рассматриваемая как одно из проявлений иммунных реакций, тоже зависит от действия бифидобактерий: иммуностимулирующие олигодезоксинуклеотиды *B. longum* супрессируют Th2 иммунный ответ мышей, что является предпосылкой для профилактики аллергических заболеваний.

Эффективность пробиотиков зависит не только от их дозы. Какое количество пробиотических бактерий необходимо для терапевтического эффекта? На этот дискуссионный вопрос сложно дать

единственно правильный ответ. Существует немало спекуляций по этой теме, причём часто каждый отстаивает свою точку зрения, выгодную ему с коммерческой или иной стороны. Для достижения эффекта необходимо, чтобы в организм попадало не менее определённого количества клеток бактерий, чтобы они размножились и приступали к активной жизнедеятельности. Важно, чтобы в организм попали клетки пробиотических бактерий в большом количестве и, самое главное, уже с набором их метаболитов и биологически активных веществ в нужных концентрациях и соотношениях. С этой точки зрения внесение 1 мл культуры с 10^8 бактериальных клеток не будет равнозначно приёму 10 мл культуры с 10^8 клеток, более предпочтительным с лекарственными целями будет приём именно 10 мл, а не 1 мл культуры с аналогичным числом клеток. Для пробиотических препаратов нужно брать естественную популяцию бактерий с набором их метаболитов в количестве не менее 10^6 КОЕ/мл и более (без верхней границы). Но если в популяции, допустим, 10^8 КОЕ/мл, то 100 мл и той, и другой культуры будут обладать одним биотерапевтическим действием. Снижение дозировки препарата при повышении в нём количества жизнеспособных клеток не имеет смысла.

Неадекватность кисломолочных продуктов с пробиотическими бактериями и немолочных пробиотиков. Отличные вкусовые качества, большая питательная ценность делают бифидосодержащие кисломолочные продукты ценным профилактическим продуктом, позволяющим поддерживать организм на здоровом уровне. Но тяжёлые формы заболеваний желудочно-кишечного тракта вылечить йогуртами нельзя. Приём 200–300 мл кефира или йогурта с бифидобактериями не приводит к каким-либо положительным сдвигам в состоянии больного, даже если сосчитать дозу (количество) принятых одновременно бактерий, принадлежащих к пробиотической группе. В то же время, рекомендуемая терапевтическая доза пробиотических бактерий обычно гораздо меньшая, чем суммарное количество молочнокислых бактерий в выпиваемом за один приём йогурте. Даже если они принадлежат к одному штамму, в зависимости от среды культивирования и способов сохранения биомассы, бактерии обладают разными свойствами при попадании в организм. В связи с этим можно предположить, что сквашенное пробиотическими микроорганизмами молоко не обладает свойствами других немолочных сред, в составе которых пробиотические бактерии показывают явно лечебный эффект, причём, если всё принимается в больших количествах.

Пробиотики следует принимать во время и после антибиотикотерапии. До сих пор остаётся открытым вопрос о

чувствительности пробиотических микроорганизмов к антибиотикам. Многие авторы утверждают, что бактерии нормофлоры устойчивы к действию большинства антибиотиков и высокоактивных бактериоцинов (например, бифидобактерии устойчивы к низину). Нередко в зависимости от схемы опыта, используемых концентраций и штаммов, бифидобактерии проявляют разную, часто низкую устойчивость к антибиотикам и бактериоцинам. Производственные штаммы и штаммы индигенной микрофлоры часто по-разному реагируют на тот или иной антибиотик. Сложно сказать, должны ли пробиотические бактерии быть полностью устойчивы к антибиотикам. Если да, то в какой мере? Например, чем лечить бактериемии и инвазии мягких тканей, вызванные лактобациллами? С экспериментальной точки зрения важно, чтобы разные таксономические группы бактерий обладали разной чувствительностью к антибиотикам с целью идентификации бактерий и для дифференциации штаммов.

Применение пробиотиков во время приёма антибиотиков, видимо, не является бесполезным действием, как полагают многие. Набор метаболитов пробиотических бактерий, содержащийся в препарате, удовлетворяет потребности организма в веществах, образующихся при обычной деятельности микрофлоры. С позиции новых представлений о биомедицинских свойствах пробиотиков, их приём должен оказывать благотворное воздействие на организм во время приёма антибиотиков. Приём жидких пробиотиков во время приёма антибиотиков способствует улучшению состояния больного, так как организм снабжается тем, чего ему в данный момент особенно не хватает – продуктами жизнедеятельности бактерий и клеточными структурами.

Пробиотики – препараты широкого спектра действия. Действия нормальной микрофлоры и пробиотиков вовсе не идентичны. Пробиотики обладают собственным влиянием на макроорганизм, отличным от влияния микробиоты, дополняющим и преобразующим его. Ещё не начав функционировать в составе микробиоты, бифидобактерии в составе пробиотических препаратов, находясь в окружении метаболитов и внутриклеточных структур, моментально быют по мишеням больного или ослабленного органа или функции. В этом – ключевая роль жидких пробиотических препаратов.

Посредством действия метаболитов и клеточных структур пробиотических бактерий, а также ферментов и других компонентов, попадающих в организм и разносящихся с кровяным руслом, другие органы и их системы, не связанные с микрофлорой напрямую, изменяют свою работу, особенно если она была нарушена какими-то внешними или внутренними факторами. Всё это приводит к репарации нарушений,

и в целом – к лечебному эффекту. Возможно, идёт влияние только на микробиоту, а она в свою очередь влияет на органы и их системы. В таком случае нам следует признать, что значение микробиоты больше, чем мы себе представляем, и мы скорее склонны недооценивать её функции, чем переоценивать.

Жидкие пробиотики – наиболее преимущественная их форма.

Самыми перспективными из пробиотиков являются их жидкие формы, так как помимо бактерий они содержат вещества и соединения, стимулирующие рост и размножение собственной облигатной микрофлоры, а также влияют на функции органов и тканей человека. Культуральная жидкость пробиотических бактерий является богатым субстратом как для микроорганизмов, так и для ферментных систем макроорганизма. И в этом – её одна из важнейших биологических функций. Многообразие действия пробиотиков подчёркивается наличием препаратов с бесклеточными структурами, полученных из пробиотических бактерий и их культуральной жидкости в отсутствие жизнеспособных клеток и классических пребиотиков. Например, в Пермском НПО «Биомед» изготовлен препарат «Микростим» из культуральной жидкости *Lactobacillus plantarum*8P-A3, действующим началом которого являются низкомолекулярные метаболиты лактобактерий, выделенные с помощью метода ультрафильтрации. Данный препарат, по сообщениям его авторов, увеличивает скорость роста лактобактерий, стимулирует функциональную активность бактерий нормофлоры, при пероральном введении стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов крови.

Наличие препарата такого рода доказывает возможность влияния на микробиоту и организм в целом не только непосредственного приживания в нём бактерий, формирующих микроценоз желудочно-кишечного тракта и размножающихся там, но и влияния на слизистые желудочно-кишечного тракта и остаточную микрофлору сконцентрированных в большом количестве продуктов жизнедеятельности пробиотических бактерий. Рассматривая возможные механизмы действия пробиотиков, мы убеждаемся, что путь использования метаболитов в активной форме, клеточных структур, а не только жизнеспособных клеток, которые транзитом проходят через желудочно-кишечный тракт, – наиболее оптимальный.

Всё это указывает на большую важность и необходимость пробиотических препаратов для лечения и поддержания здоровья человека. С учётом новых взглядов на свойства и функции пробиотиков можно с полной уверенностью утверждать, что за ними – будущее.

МИКРОФЛОРА РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Р.Я. Гильмутдинов, Е.С.Покровская, Н.Н.Хуснутдинов.

ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана», г. Казань
ГАУЗ «Городской диагностический центр по лабораторной
диагностике инфекционных заболеваний», г. Казань

В настоящее время известно несколько сотен видов микроорганизмов населяющих ротовую полость человека и животных. Бактерии сосредоточены в зубных бляшках на коронках зубов, гингивальных бороздах и на спинке языка, при этом ротовая жидкость, также представленная множеством видов микроорганизмов, осуществляет взаимосвязь между перечисленными зонами и организмом в целом. По данным разных авторов (Ушаков Н.В., Царев В.Н., 1998; Зеленова Е.Г. и соавт., 2004 и др.) количество бактерий в ротовой полости варьирует в диапазоне 43 млн/мл-5,5 млрд/мл.

Ключевым в формировании соответствующего микробного биоценоза ротовой полости, его количественного и качественного состава, является наличие и свойства слюны. Естественно, нормальная микрофлора полости рта обладает определенной устойчивостью к антибактериальным факторам (лизоцим, комплемент, пропердин и др.) ротовой жидкости, в первую очередь, слюны. Более того, она сама участвует в защите от поступающих извне микроорганизмов.

У большинства домашних и сельскохозяйственных животных в ротовой полости присутствуют в основном такие облигатные микроорганизмы, как аэробные стрептококки (*mutans*, *mitis*, *sanguis* пептострептококки и R-гемолитические), вейллонеллы и дифтероиды. В гораздо меньшем количестве обнаруживаются стафилококки, лактобациллы, спирохеты, лептоспиры и др. Предполагается, что вид животного скорее определяет количество микробных групп, а не их видовой спектр.

Количество публикаций о микрофлоре ротовой полости жвачных животных ограничено. У коров обнаружены *E. coli*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides bivicus*, *Fusobacterium nucleatum* и *Actinomyces israelii*; у овец – *E. coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Salmonella sp.* *Staphylococcus sp.*, *Peptococcus indolicus*. Между тем более глубокое изучение данного вопроса актуально не только с позиции профилактики инфекционных болезней собственно жвачных животных, но собственно человека. Так, известно, что *Peptococcus*

indolicus может передаваться от сельскохозяйственных животных человеку и вызывать заболевание.

При изучении микробного пейзажа ротовой полости коров и овец нами использовались для взятия образцов со слизистых оболочек и поверхности языка – бактериологический набор (тампон на металлическом стержне в среде Amies с углем) фирмы «Himedia» (Индия); для оценки общего микробного обсеменения – 5%-ый кровяной агар; для подсчет стафилококков – желточно-солевой агар, лактобактерий - растительно-молочная среда, кишечной микрофлоры - среда Эндо, других бактерий - сахарный бульон и колумбийский агар, грибов рода *Candida* – среда Сабуро с полимиксином, а также наборы коммерческих тест-систем Micro-La-Test и идентификационные полоски ОКСИ-, ПИРА-, ВП-, ОНП-тест фирмы «Pliva-Lachema Diagnostica» (Чешская республика), наборы для простого и сложного методов окрашивания. Бактериальные посевы инкубировались в термостате 24 ч, для идентификации грибов рода *Candida* – около 5 сут (Приказ Минздрава СССР от 22.04.85 № 535). Выделенные микроорганизмы окрашивали по Граму и идентифицировали на основании культурально-морфологических и биохимических признаков по D. Bergey (1988).

Большинство из выявленных в ротовой полости микроорганизмов (*Pantoea agglomerans*, *Citrobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sciuri*, *lentus* и *gallinarum*) являлись транзиторными.

Согласно полученным нами данным, в летнее время в полости рта коров в основном встречаются транзиторные грамотрицательные палочки сем. *Enterobacteriaceae* и облигатные грибы *Candida*; осенью и зимой - это транзиторные грамположительные стрептококки, соответственно в 75 и 50 % случаев. В весеннее время микрофлора ротовой полости была представлена в основном транзиторными грамотрицательными палочками и грамположительными кокками. Таким образом, можно констатировать круглогодичное наличие в ротовой полости коров транзиторных микроорганизмов, в основном представленных грамположительными кокками. Наибольшее обсеменение наблюдалось в весенне-летний период.

У овец в летний период микрофлора ротовой полости представлена транзиторными грамотрицательными палочками, а также транзиторными и облигатными грамположительными кокками. Осенью в мазках со слизистой оболочки рта овец в 100 % случаев этиологически значимый рост отсутствовал. Зимой микрофлора была представлена грамположительными кокками и в 50 % случаев встречался

Stomatococcus mucilaginosus. Весной часто идентифицировались транзиторные грамположительные стафилококки, в 75 % случаев встречался *Staphylococcus lentus*. В целом микробный пейзаж ротовой полости овец представляют в основном грамположительные кокки и наибольшая обсемененность транзиторными микробами имеет место в летне-весенний период.

Кроме вышеизложенного, нами выявлены гендерные различия в микрофлоре ротовой полости у овец. У овцематок стрептококки полости рта в 50 % случаев были представлены видом *viridans* и в 25 % – *salivarius*, тогда как у баранов в 25 % случаев встречался вид *galloliticus ssp macedonicus*. Стафилококки овцематок в 50 % случаев были представлены видом *lentus*; у баранов же их видовой состав был намного пестрее (*schleiferi*, *sciuri*, *gallinarum*) и встречались они с частотой 25 %. Помимо этого, у овцематок в 50 % случаев идентифицировался *Stomatococcus mucilaginosus* и в 25 % – *Escherichia coli*. У баранов (25 %) в мазках обнаруживались *Alcaligenes faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Kocuria kristinae*.

МИКРОФЛОРА ЗУБНОГО НАЛЁТА У ДЕТЕЙ ДЕТСКИХ ДОМОВ И ШКОЛ-ИНТЕРНАТОВ

Н.И. Смоляр, О.Т. Нарепеха, Г.А. Лаврик

Львовский национальный медицинский университет
имени Данила Галицкого, г. Львов

Важную роль в возникновении кариеса зубов играет гигиена полости рта. Обследование детей детских домов и школ-интернатов показало, что уровень гигиены у большинства из них неудовлетворительный. Это определило цель нашего исследования: проанализировать микрофлору зубного налета у детей детских домов и школ-интернатов.

Проведено микробиологическое исследование зубного налета у 40 детей возрастом от 6-ти до 15-ти лет, проживающих в школе-интернате. В качестве контрольной группы были задействованы дети аналогичной возрастной группы одной из общеобразовательных школ г. Львова (25 лиц).

Забор материала проводили утром натощак с пришеечной поверхности нижних центральных резцов и верхних первых моляров с помощью стерильного экскаватора. Забранный материал наносили на пластинку с избирательной средой для выделения микрофлоры полости рта. Идентификацию стрептококков ротовой полости проводили

используя среду “митис-саливариус агар” – MSA(Neogen corporation, Германия); выявление аэробной микрофлоры других групп используя кровяной агар и среду Сабуро для выделения дрожжеподобных грибов. Для изучения лактобактерий и определения их количественных уровней в составе микробного сообщества в зубном налёте использовали лактобакагар производства ФБУН (Россия). Определение стрептококков производили с учетом характерного роста на среде MSA, кровяном агаре с последующим тестированием с помощью биохимической панели Streptotest 16 (Lachema, Чехия).

Кариесогенные стрептококки групп *S. mutans*, а также групп *S. mitis* и *S. salivarius* были выявлены у всех обследованных опытной группы, причем на их долю среди других аэробных микроорганизмов пришлось от 30,3 до 75% (в среднем выявлялись 52,65%). Частота выделения *S. mutans* достигала 100%, однако содержание его среди других микроорганизмов сильно варьировало и в среднем составило $20,45 \pm 2,5\%$. Доля *S. mitis* составила 14,0%, а *S. salivarius* – 9,0% среди других аэробных бактерий исследуемого звена микроорганизмов. Бета-гемолитические стрептококки группы А не выявлялись.

У детей контрольной группы уровни выявления *S. mutans*, равно, как и *S. mitis* и *S. salivarius* были незначительны: отмечался рост единичных колоний на питательной среде MS-агар рост практически отсутствовал, хотя уровни высевания лактофлоры у интактных лиц достоверно не отличались от аналогичных показателей детей обследованной группы.

У большинства детей (75%) отмечено выделение непатогенных стафилококков, грибов рода *Candida* (72%) в разных количествах. Коринеформные бактерии, хотя и были обнаружены среди микробов зубного налета у всех исследованных, количество их было сравнительно невелико.

О недостаточно эффективной гигиене свидетельствует выделение бактерий кишечной группы, которые были высеяны от 50% исследованных детей. Лактобактерии были выявлены у всех детей, и их количественные уровни колебались от 10^2 до 10^5 КОЕ/мл.

У двух обследованных, от которых были выделены энтеробактерии, лактобактерии в забранном материале выявлены в количестве, не превышающем 10^2 КОЕ/мл.

При микробиологическом исследовании зубного налёта у детей контрольной группы стафилококков и энтеробактерий выявлено не было. Частота высевания дрожжеподобных грибов не превышала 15%. На основании проведенных исследований следует заключить, что у воспитанников детских домов и школ-интернатов в составе

микроорганизмов зубного налета чаще, чем у детей общеобразовательных школ, наряду с высоким уровнем выявления кариесогенных микроорганизмов групп *S. mutans*, а также *S. mitis* и *S. salivarius*, высеваются микроорганизмы, не являющиеся аутохтонными симбионтами ротовой полости (энтеробактерии и грибы *Candida*), что свидетельствует о снижении местного иммунитета у обследованных, а также отсутствии должного уровня личной гигиены.

МОРФО – ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ НА ФОНЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ *HELICOBACTER PYLORI*.

Ю.В. Валеева, А.М. Хромова, А.О. Поздеева

ГБОУ ВПО «Казанский государственный
медицинский университет»
зав. судебно-гистологического отделения
ГАОУЗ «Республиканское бюро
судебно-медицинской экспертизы» МЗ РТ.
ГБОУ ДПО «Казанская государственная
медицинская академия»

В последние годы особое внимание исследователей привлекает проблема возможной связи бактерий рода *Helicobacter* с развитием поражений печени и желчевыводящих путей у человека. К настоящему времени можно считать доказанной роль энтерогепатических хеликобактеров *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. canis*, *H. cholecystis*, *H. pullorum*, *H. odentium* и *H. rappini* в этиопатогенезе воспалительных заболеваний печени и желчевыводящих путей, карцином печени различного типа у разнообразных млекопитающих. В многочисленных исследованиях установлено присутствие *H. pylori* в желчевыводящих путях как при некалькулезных хронических воспалительных заболеваниях, так и при желчекаменной болезни.

Известно, что хроническая желчекаменная болезнь сопровождается существенными морфологическими изменениями эпителия желчного пузыря. Как правило, они бывают связаны с патологическими состояниями и процессами, предшествующими образованию и росту камней, либо с миграцией камней по полости пузыря и закупоркой желчных протоков.

Цель – установить морфо-гистологические изменения слизистой оболочки желчного пузыря на фоне инфицирования *H. pylori*.

Материал и методы исследования.

Материалом для исследования служили 32 биоптата слизистой оболочки желчного пузыря, отобранных у больных с желчекаменной болезнью при оперативном вмешательстве (холецистэктомии).

Все биоптаты слизистой оболочки были подвергнуты молекулярно – генетическому исследованию на наличие *H. pylori*.

Обнаружение ДНК *H. pylori* проводили методом, предложенным научно-производственной фирмой «Литех» [Моминалиев К.Т. и др., 2003]. Определяемыми фрагментами ДНК *H. pylori* являлись участки гена *ureC*. Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации «DNA Analyzer» («Литех», Москва). Образцы, положительные по гену *ureC*, в дальнейшем использовали для генотипирования по генам вирулентности *H. pylori*. Генотипирование выделенных штаммов *H. pylori* на наличие генов *cagA*, *vacA* (субтипы *s1*, *s2*, *m1* и *m2*), *babA* проводили с использованием наборов реагентов НПФ «Литех» (Москва).

При диагностировании морфологических изменений слизистой оболочки желчного пузыря биоптаты фиксировали 10% раствором нейтрального формалина с последующей проводкой через спиртовую батарею в автоматизированном процессоре TP 1020 (Leica, Германия) и заливкой в парафин. Гистологические срезы готовили на санном микротоме и окрашивали гематоксилином и эозином. Для описания и количественного микроскопического исследования применяли систему анализа изображений (микроскоп Nikon Eclipse E200, цифровой фотоаппарат Olympus SP 350, компьютер с операционной системой Windows XP, графический редактор Adobe Fotoshop 7.0 и программное обеспечение Tauscom).

Результаты.

При исследовании 32 биоптатов слизистой оболочки желчного пузыря частоты колонизации *H. pylori* желчевыводящих путей методом ПЦР были протестированы 24 образца биоптатов оболочки желчного пузыря больных желчекаменной болезнью. ДНК бактерий была обнаружена в 16 (66,6±9,6%) биоптатах слизистой оболочки желчного пузыря. Штаммы *H. pylori*, выделенные из слизистой оболочки желчного пузыря, представлены генотипом *vacAs1/m2* + 11 (45,8± 10,2%), *vacA m2* + 11 (45,8± 10,2%), *vacA s1* + 16(66,6%±9,6%), *babA*-, *cagA*-.

В проведенных нами гистологических исследованиях был установлен достаточно широкий спектр патоморфологических изменений слизистой желчного пузыря. Было выявлено наличие явлений атрофии, сглаживание складок слизистой и склероз подлежащих слоев. Также отмечены признаки травматизации слизистой оболочки конкрементами по типу асептического воспаления. В просвете пузыря

присутствовали слизь, слущенный эпителий и лейкоциты. Отмечено истончение стенок, утрата на внутренней поверхности желчного пузыря нормальной нежной складчатости, которая испещрена кровоизлияниями, язвами и рубцами. Гистологически в стенке пузыря были обнаружены лимфоцитарные и плазмоклеточные инфильтраты, разрастание соединительной ткани. Нервные волокна находятся в состоянии зернистого распада, а ганглиозные клетки в состоянии некробиоза.

В биоптатах слизистой оболочки желчного пузыря пациентов, перенесших холецистэктомию, у которых не был установлен факт микробной колонизации, выявлены явления атрофии, сглаживание складок слизистой и склероз подлежащих слоев.

Гистологические исследования слизистой желчного пузыря больных при желчекаменной болезни, у которых был установлен факт инфицирования его микроорганизмами, отличными, от *H. pylori*, выявлены многочисленные и разнообразные признаки воспалительного процесса стенки желчного пузыря.

В частности, имели место признаки гиперплазии (аденоматоз, аденомиоматоз, полипоз, наличие глубоких погружных ходов в стенке желчного пузыря), гипо- и атрофические процессы: уплощение рельефа, истончение слизистой оболочки и мышечного слоя со значительным урежением и деформацией ворсин стенки желчного пузыря.

Были выявлены признаки слизистой – серозного воспаления (очаговое утолщение слизистой оболочки, гиперемия, гиперсекреция слизи, минимальное усиление клеточной инфильтрации поверхностных слоев слизистой оболочки, дистрофия эпителия с набуханием и гипохромностью ядерных структур). Также отмечена межэпителиальная инвазия микроорганизмов. Обращал на себя внимание тот факт, что среди дескваматов измененных эпителиоцитов была значительная примесь желчи с образованием холестазов и формирующиеся конгломераты холестериновых камней. В цитоплазме части эпителиальных клеток обнаружены зерна бурого пигмента и мелкоочаговый холестероз – очаговое отложение масс, напоминающих холестерин в подслизистой оболочке.

Гистологические исследования слизистой желчного пузыря больных желчекаменной болезни, у которых был установлен факт инфицирования его микроорганизмами в ассоциациях с *H. pylori*, выявлены многочисленные и разнообразные признаки воспалительного процесса стенки желчного пузыря. В частности, имели место признаки гиперплазии (аденоматоз, аденомиоматоз, полипоз, наличие глубоких погружных ходов в стенке желчного пузыря), гипо- и атрофические процессы: уплощение рельефа, истончение слизистой оболочки и

мышечного слоя со значительным урежением и деформацией ворсин стенки желчного пузыря.

Проведенные патоморфологические исследования показали, что хроническая колонизация микроорганизмами желчевыводящих путей приводит к развитию более выраженных изменений стенки желчного пузыря. Вполне возможно, что в развитии подобных морфологических изменений определенная роль принадлежит и *H. pylori*, т.к. его обнаружение в исследуемых гистологических препаратах, дает основание предположить его участие в поддержании воспаления в слизистой оболочки желчного пузыря.

На возможную этиологическую значимость *H. pylori* может указывать и факт выделения бактерий из желчевыводящих путей больных с хроническими воспалительными заболеваниями гепатобилиарной системы в виде монокультуры, при отсутствии прочих микроорганизмов. Однако наши предположения требуют дальнейшего изучения.

Вывод: Микробную колонизацию слизистой желчного пузыря при холециститах сопровождают более выраженные морфологические изменения, по сравнению с характером деструкции эпителия у пациентов с неинфицированными желчевыводящими путями.