

Материалы и методы. Для получения препарата наружных мембран клетки 18-часовых агаровых (агар Мартена, рН 7,6) культур штамма *Vibrio cholerae* Eltor 18950 (OmpT+, ctx-, tcr-, OmpU-, OmpW-) после смыва физиологическим раствором с 0,01% мертиолата и 1,5-часовой инкубации при комнатной температуре осаждали центрифугированием на холоду при 6000 об/мин. и разрушали с помощью УЗ-дезинтегратора модели Bandelin SONOPULS HD 3200 или механическим растиранием с песком. Лизаты центрифугировали при 105000g 1 час при 4°C. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок солибилизировали с помощью физиологического раствора с 1 % тритона X-100 (Serva) при комнатной температуре в течение ночи с последующим концентрированием в 2 - 4 раза ультрафильтрацией в системе Amicon (камера 10 RA, мембрана PM 30). Полученным препаратом двукратно иммунизировали внутрибрюшинно и подкожно 2 группы белых мышей в дозах 2,5, 5, 10 и 20 мкг. Через 21 день иммунизированных (опытных) животных заражали внутрибрюшинно агаризованной вирулентной культурой *V. cholerae* 569B в дозе 100 LD50. Для этого агар Нобля (Difco) растворяли в дистиллированной воде, кипятили в течение 30 минут на водяной бане при постоянном помешивании и после охлаждения до 45 °C соединяли со взвесью культуры *V. cholerae* 569 B, выращенной при температуре 37° C в течение 18 часов, в соотношении 1:1 до конечной концентрации агара 0,2 %. Гибель 100% контрольных (интактных) мышей в течение суток подтверждала наличие генерализованной инфекции. Срок наблюдения за опытными животными составлял 3 суток после заражения.

Основные результаты. Установлено, что степень иммуногенности зависит от способа аппликации и дозы вводимого антигена. Выявлено, что после внутрибрюшинной иммунизации дозой 2,5 мкг выживало 30% животных, при иммунизирующей дозе 5 мкг – 60%, 10 и 20 мкг – 80% белых мышей. Подкожная иммунизация оказалась менее эффективной: защитным действием обладали высокие иммунизирующие дозы (10 и 20 мкг), обеспечивая выживаемость 65% и 75% животных, соответственно. Иммунизирующие дозы 2,5 и 5 мкг предотвратили развитие генерализованной холерной инфекции у 25% белых мышей.

Заключение. Препарат наружных мембран, выделенный из культур атоксигенного штамма *V. cholerae* 18950, препятствовал развитию экспериментальной холеры у белых мышей, зараженных вирулентным штаммом возбудителя. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования наружных мембран для совершенствования специфической профилактики этого заболевания.

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ IN VIVO И IN VITRO ПРИ ЛЕПТОСПИРОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Петрова О.А., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Тотолян А.А.

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

Введение. Лептоспирозы – зооантропонозная инфекция, протекающая в виде острого лихорадочного заболевания, характеризующаяся признаками капилляротоксикоза, выраженной интоксикацией, поражением почек, печени, центральной нервной системы, развитием геморрагического синдрома.

Патогенез лептоспирозов сложен и на данный момент мало изучен. Лептоспиры обладают множеством механизмов, которые позволяют им уклоняться от иммунной системы хозяина и вызывать тяжелые формы инфекции, а в том числе с летальным исходом.

Цели и задачи. Изучение продукции про- и противовоспалительных цитокинов in vivo и in vitro.

Материалы и методы. In vivo. Было обследовано 50 пациентов больных лептоспирозом с подтвержденным диагнозом. От данных пациентов было получено 86 сывороток. В сыворотках определяли уровень цитокинов.

In vitro. Для эксперимента был взят штамм из коллекции лаборатории зооантропонозных инфекций НИИ Пастера - *Leptospira interrogans*. Возбудитель был выделен от больного в 2013г, мужчина умер от лептоспирозной инфекции. Данным штаммом (живым и инактивированным нагреванием) проводилась 24 часовая стимуляция цельной крови здорового донора. Через 1 час, 2 часа, 4, 6, 12, 24 часа отбирались супернатанты. Определение цитокинов в биоматериалах (сыворотки и супернатанты) проводилось на анализаторе “MagPlex” (“Millipore”, США), основанном на технологии xMAP компании Luminex (США) с использованием стандартной панели из 9 анализов: TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1Ra, IL-12(p70), IFN- γ .

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MS Excel, Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для описания полученных результатов использовали стандартные методы непараметрической статистики.

Основные результаты. При изучении цитокинов in vivo в группе больных лептоспирозом по сравнению с контрольной группой выявлены достоверно повышенные уровни IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α ($p < 0,05$).

В части in vitro была подобрана оптимальная концентрация *Leptospira interrogans* для стимуляции цельной крови человека - 1×10^6 лептоспир/мл. Было показано, что живые лептоспиры достоверно являются более сильными стимуляторами продукции цитокинов, чем те же лептоспиры инактивированные нагреванием. Впервые были получены данные о почасовой стимуляции цельной крови здорового донора живыми и инактивированными лептоспирами. Было показано, что пик стимуляции для большинства цитокинов приходится на 2-3 час стимуляции (IFN- γ , IL-12p(70), IL-1Ra, IL-4 (причем для двух последних цитокинов после достижения пика, продукция цитокинов выходит на плато) Непохожую на остальные цитокины динамику дали IL-8 и TNF- α , которые имеют более поздний, чем другие цитокины пики стимуляции приходящиеся на 6ч.

Заключение. В ходе нашего исследования было показано, что уровень цитокинов IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α при лептоспирозной инфекции достоверно выше, чем у контрольной группы. Эти данные также были подтверждены в ходе эксперимента in vitro. Необходимо проводить новые, обширные исследования о взаимодействии цитокинов и механизмах иммунопатогенеза лептоспирозов.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Рищук С.В., Дробченко С.Н.

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Существует мнение, что проблема диагностики хламидийной инфекции решена с внедрением и совершен-

ствованием молекулярно-генетических методов (ПЦР). В подтверждение этому разработанные рекомендации Российского общества дерматовенерологов и косметологов и Восточно-Европейской Ассоциацией по Сексуальному и Репродуктивному Здоровью предлагают диагностировать хламидийную инфекцию исключительно с применением метода ПЦР и игнорируют серодиагностику. Несмотря на растущую популярность метода ПЦР у врачей, его внедрение в практику показало возможность ложноотрицательных результатов из-за отсутствия возбудителя в первичных половых путях при хронизации инфекции и, в связи с этим, снижение вероятности его попадания в пробы для ПЦР. В 2013 году вышли новые рекомендации ВОЗ «Лабораторная диагностика передающихся половым путем инфекций, в том числе вирус иммунодефицита человека». В них указано, что использовать серологические методы необходимо в диагностике и/или скрининге осложненной хронической хламидийной (*S. trachomatis*) инфекции, неонатальной пневмонии и LGV инфекций, а также в эпидемиологических исследованиях. В настоящее время серологический анализ на антитела к *S. trachomatis* рекомендован в рутинное обследование бесплодных пар в Швеции и Нидерландах. Серологический скрининг групп молодых людей рекомендуется также в ряде других стран, включая США, Англию, Канаду и Японию.

Целью данной работы явилось определение информативности прямых и косвенных методов выявления хламидийной инфекции и их сопоставление с клиническими проблемами.

Методы: Обследовано 457 женщин и 752 мужчин, в составе которых были 353 пары, с различными нарушениями в репродуктивной системе. ДНК *S. trachomatis* определяли в соскобе из уретры у мужчин, а также из цервикального канала и уретры у женщин методом real-time ПЦР («АмплиСенс» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для исследования иммунного ответа использовались бесприборные иммуноферментные тест-системы ИммуноКомб, производства Organics Ltd., Израиль: ImmunoComb Chlamydia trachomatis Monovalent IgA для выявления видоспецифичных сывороточных и секреторных IgA антител к *S. trachomatis* и ImmunoComb Chlamydia Bivalent IgG для одновременного дифференцированного определения видоспецифичных IgG антител к *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*. На твердую фазу этих тест-систем (гребень) сорбированы антигены *S. trachomatis* штамма серотипа L2, с последующим удалением липополисахарида (LPS), вызывающего перекрестные взаимодействия с родоспецифичными антителами, что позволяет определять исключительно видоспецифические IgA и IgG к *S. trachomatis*. Использование фосфатазно-щелочного конъюгата позволяет достичь более высокой чувствительности по сравнению с тестами, основанными на пероксидазной реакции. В тест-системах ИФА российских производителей используется пероксидазная реакция и общие неочищенные антигены хламидий.

Результаты и обсуждение: У большей части обследованных выявлялись IgG и IgA к *S. trachomatis* вместе или по отдельности, у 217 мужчин (40%) и у 79 женщин (30%) отсутствовали обе разновидности иммуноглобулинов (IgG и IgA). У мужчин совместно или по отдельности специфические IgG к *S. trachomatis* в сыворотке крови были выявлены у 313 (42%), специфические IgA — у 319 (42,4%). При этом IgG к *S. pneumoniae* были обнаружены у 544 (72,3%), из которых у 280 (51,5%) — без IgG к *S.*

trachomatis. У женщин специфические IgG в сыворотке крови были выявлены у 227 (49,7%), специфические IgA — у 201(44,0%). При этом IgG к *S. pneumoniae* были обнаружены у 263 (57,5%), из которых у 101(38,4%) они определялись без IgG к *S. trachomatis*. При этом обнаружение возбудителя в real-time PCR у данного контингента больных имело место у женщин — в 3,7% случаев, у мужчин — в 4,4%. Диагноз хронической урогенитальной хламидийной инфекции был подтвержден у 42% мужчин и 44% женщин (на основании положительного серологического IgA-теста независимо от результата по IgG (чаще было сочетание с положительным тестом) и положительной ПЦР. Представленное сочетание лабораторных тестов регламентировано международными Рекомендациями. При этом получены достоверные корреляции положительных серологических тестов с тяжестью клинических проявлений и осложнениями у женщин и мужчин. Положительная real-time ПЦР не коррелировала ни с одной клинической ситуацией. Выявляемость хламидийной инфекции согласно отечественным рекомендациям (только с применением ПЦР) была на уровне 3,7% — у женщин и 4,4% — у мужчин, что соответственно в 12 и в 10 раз была ниже уровней, полученным согласно международным оценкам.

В последние годы опубликовано достаточно большое количество работ, доказывающих связь хламидийной инфекции с выкидышами и фертильностью пар на основании определения антител к *S. trachomatis*. При этом ДНК патогена в ПЦР у них не определялась. Абсолютизация метода ПЦР нередко приводит к значительной недооценке хламидийной инфекции при подготовке семейных пар к естественному и искусственному зачатию, что, в свою очередь, в последующем является причиной частых осложнений со стороны матери и плода.

Выводы: При хронизации хламидийной инфекции попытка обнаружения возбудителя в ПЦР недостаточна для оценки его этиологической роли в той или иной клинической ситуации. Сочетанное определение специфических противохламидийных антител в биоматериалах на тест-системах с использованием фосфатазно-щелочного конъюгата и антигенов *S. trachomatis*, очищенных от родоспецифического липополисахарида, приобретает первостепенное значение в установлении диагноза хронической персистирующей хламидийной инфекции. Всё это подтверждает необоснованность отечественных рекомендаций и дееспособность рекомендаций ВОЗ по диагностике урогенитальной хламидийной инфекции.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОКИНОВЫХ ИНДЕКСОВ ПРИ HELICOBACTER PYLORI-АССОЦИИРОВАННОМ ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ

Саранчина Ю.В., Агеева Е.С.

ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», Абакан, Россия

Введение. В развитии хронического гастрита ключевую роль играет инфекция *Helicobacter pylori* (HP) (Alakkaï A., 2011; Ивашкин В. Т., 2012). Благодаря наличию комплекса факторов патогенности, бактерия с легкостью колонизирует слизистую оболочку желудка, модулируя при этом иммунновоспалительную реакцию. В защите макроорганизма от HP, на ранней стадии инфицирования, основное значение приобретают клеточные адаптивные реакции иммунного ответа, которые активируются посредством экспрессии провоспалительных