



УДК 610.642 - 053.13/31 : 618.3](571.6)«2005/.2010»

О.В. Островская¹, Е.А. Зайцева³, Н.М. Пуховская², Н.М. Ивахнишина¹,
И.С. Мусатов², Е.Б. Наговицына¹, М.А. Власова¹, Л.И. Иванов²

LISTERIA MONOCYTOGENES ПРИ СПОНТАННЫХ ВЫКИДЫШАХ И ПЕРИНАТАЛЬНОЙ СМЕРТНОСТИ

*Институт охраны материнства и детства СО РАМН¹,
680022, ул. Воронежская, 49, корп. 1, тел.: 8(42-12)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru;
Хабаровская противочумная станция², 680031, Санитарный пер., 7, тел.: 8(42-12)-33-46-25, г. Хабаровск;
НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН³,
690087, ул. Сельская, 1, тел.: 8(42-32)-44-11-47, г. Владивосток*

Самопроизвольным прерыванием завершается 20-25% беременностей [5]. Показатель перинатальной смертности на Дальнем Востоке имеет тенденцию к снижению, но превышает российский уровень и показатели высокоразвитых стран. Так, в 2008 г. перинатальная смертность в Дальневосточном федеральном округе составила 9,7‰, в России — 8,3‰ [2]. В Швеции, Финляндии, Германии, Великобритании, США показатель перинатальной смертности варьирует от 5,4 до 7,9‰ [1]. Этиологию потерь плода и новорожденного не удается установить стандартными методами исследования в 40% случаев [4, 8]. Поэтому весьма актуальным является поиск новых методов и подходов для установления причин перинатальных потерь.

Перинатальные потери могут быть связаны с листериозной инфекцией беременных женщин. При заражении во время беременности листерии могут преодолеть плацентарный барьер и вызвать самопроизвольные выкидыши, невынашивание, мертворождение [6, 7, 10]. При попадании в макроорганизм эти бактерии вызывают развитие заболевания, которое обусловлено продукцией ими белковых факторов патогенности, позволяющих листериям проникать в эукариотические клетки и паразитировать в них (белки - интернаины InlA, InlB, Auto, ActA, листериолизин O и др.) [6, 10]. Особая роль продукта гена inlA — белка интерналина А в развитии патологии плода была показана при экспериментальном изучении инвазии листерии в трофобласты [9].

Если до 80-х гг. листериоз был редкой инфекцией, выявляемой преимущественно среди людей, связанных с животноводством, то в настоящее время регистрируются

многочисленные эпидемические вспышки листериоза в развитых странах мира, связанные с употреблением в пищу продуктов, загрязненных листериями. Листериоз имеет тенденцию к росту заболеваемости в городах. Этому способствуют высокая заселенность территорий грызунами, большое количество домашних и бродячих животных, неконтролируемый на содержание листерии завоз грызунов из-за рубежа, высокая миграция населения, недостаточный уровень диагностики этой инфекции [3].

Целью исследования было изучение участия *Listeria monocytogenes* в формировании потерь плода и новорожденного.

Материалы и методы

В течение 2005-2010 гг. определяли частоту выявления *L.monocytogenes* в аутопсийном материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В 2005 г. исследовали образцы хориальной и плодовой тканей от ранних спонтанных выкидышей (89 случаев на сроке до 16 нед. гестации), пробы органов от поздних выкидышей (23 случая — от 16 до 28 нед. гестации) и перинатальной смерти (34 — на сроке 28-37 нед., из них 17 — мертворожденных и 17 новорожденных, родившихся живыми и умерших в первые 6 дн. жизни). Всего в 2005 г. исследовано 146 случаев гибели плодов и новорожденных, в последующие годы — по 25-30 случаев. ДНК *L.monocytogenes* выявляли в образцах плаценты, головного мозга, сердца, легких, почек, печени, селезенки, тимуса с помощью диагностических наборов ООО «АмплиСенс». Пробы ор-

ганов с ПЦР-положительным результатом изучали бактериологическими методами, рекомендованными ГОСТ 51921-2002 и МУК 4.2.1122-02. Сравнивали свойства выделенных из аутопсийного материала штаммов и изолятов листерий из продуктов питания, морских гидробионтов и грызунов, которые были получены из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (г. Москва) и музея Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВМиВ, г. Покров).

Определение генов, кодирующих белки факторов инвазии — интерналины (InlA, InlB, InlC, InlE), осуществляли с использованием праймеров, выбранных на основе последовательностей генов, полученных из базы данных ListiList (<http://www.pasteur.fr>), содержащей последовательность генома штамма EGD-e (положительного контроля). Секвенирование фрагментов ДНК проводили в Институте молекулярной биологии им. Энгельгардта в Центре «Геном» (г. Москва).

Для статистического анализа использованы ПК и программы Statistica V6.0, Excel 2000 для Windows XP.

Результаты и обсуждение

Возраст матерей погибших плодов и новорожденных с установленной листериозной инфекцией в среднем составил 31,0 г. Беременность была первой только у одной женщины, остальные были повторнобеременными с медицинскими абортными в анамнезе. Антенатальная гибель плода зарегистрирована в анамнезе у 2 женщин, пиелонефрит и гепатит С — у одной. Во время беременности трое перенесли ОРВИ, у двоих установлены субфебрилитет и высокая температура во время беременности и родов, еще у двоих — угроза невынашивания беременности. Масса тела погибших плодов и мертворожденных колебалась от 420 до 1500 г, погибших в неонатальном периоде живорожденных — от 980 до 3880 г.

В 2005 г. исследование проб хориальной и плодовой тканей при ранних выкидышах выявило ДНК *L. monocytogenes* лишь в одном образце из 89 (1,1±1,1%). При поздних выкидышах обнаружено 10 инфицированных листериями плодов из 23 исследованных (43,5±10,3%). Все зараженные листериями плоды погибли на сроке 24-26 нед. гестации. Частота выявления *L. monocytogenes* при перинатальной смертности составила 4 случая (11,8±5,5%). В 2005 г. инфицированный листериями материал от погибших плодов и новорожденных был собран в июне-сентябре, в целом зараженность изученных погибших плодов и новорожденных составила 10,3±2,5%. Весной-летом 2006 г. при изучении аутопсийного материала от 25 погибших плодов и новорожденных *L. monocytogenes* была выявлена в 2 случаях (8,0±5,4%). В 2007-2010 гг. *L. monocytogenes* определяли в единичных случаях или не определяли. Причины высокой зараженности листериями материала от поздних выкидышей в 2005 г. (43,5%) остаются неясными. Очевидно, инфицированность листериями погибших плодов и новорожденных колеблется в широком диапазоне, обусловлена многими факторами, в частности ростом зараженности листериями объектов окружающей среды в отдельные годы, завозом партий продуктов, обсемененных листериями. Эти связи могут быть предметом дальнейшего, более глубокого изучения.

Резюме

В 2005-2010 гг. методом ПЦР изучена инфицированность листериями аутопсийного материала от 146 случаев гибели плодов и новорожденных. В 2005 г. ДНК *Listeria monocytogenes* обнаружена в 10,3% от числа исследованных. Чаще всего ДНК *L. monocytogenes* обнаруживали в пробах органов от поздних самопроизвольных абортов — 43,5%. ПЦР-позитивные образцы изучали бактериологически с применением питательных сред. Изолированы штаммы ДНК *L. monocytogenes*. На инбредных мышах и морских свинках показана вирулентность изолятов. Чаще всего ДНК *L. monocytogenes* определяли в образцах плаценты, печени, селезенки. Все выделенные штаммы *L. monocytogenes* имели ферменты, ассоциированные с развитием инфекционного процесса (каталаза, гиалуронидаза, лецитиназа, липолитическая активность), а также гены, кодирующие белки факторов инвазии, — интерналины (inlA, inlB, inC, inlE).

Ключевые слова: потеря плода, перинатальная смертность, листерия, ПЦР.

O.V. Ostrovskaya, E.A. Zaytseva, N.M. Pukhovskaya,
N.M. Ivakhnishina, I.S. Musatov, E.B. Nagovitsina,
M.A. Vlasova, L.I. Ivanov

LISTERIA MONOCYTOGENES IN SPONTANEOUS MISCARRIAGE AND PERINATAL MORTALITY

*Research Institute of Mother and Child Health Care,
Siberian Branch of Academy of Medical Sciences, Khabarovsk;
Khabarovsk Plague Control Center; Research Institute
of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch
of Academy of Medical Sciences, Vladivostok*

Summary

Contamination of autopsy material by *Listeria* was investigated by PCR method in 146 cases of fetus and newborn infant's deaths in the period 2005-2010. In 2005, DNA of *Listeria monocytogenes* was detected in 10,3% of cases. DNA of *L. monocytogenes* was found mostly in late spontaneous abortions — 43,5%. PCR-positive samples were examined bacteriologically with the usage of special media. The *L. monocytogenes* strains were isolated. The virulence of these strains was demonstrated in the inbred mice and guinea pig models. Most frequently, the DNA of *L. monocytogenes* was revealed in the samples of placenta, liver and spleen. All isolated strains had enzymes, associated with the development of infection process (catalase, hyaluronidase, lecithinase, lipolytic activity), and genes, coding the invasive factors proteins — internalins (inlA, inlB, inlC, inlE).

Key words: fetus lost, perinatal morbidity, *Listeria*, PCR.

Частота определения ДНК *L. monocytogenes* в отдельных органах варьировала: в пробах плаценты находили возбудителя в 15,3% случаев, печени — 12,3%, селезенки — 12,3%, головного мозга — 10,8%, почек — 7,7%, легких — 1,5%.

Пробы органов, в которых методом ПЦР была выявлена ДНК *L. monocytogenes*, исследовали бактериологически с применением питательных сред. В результате изолированы штаммы, которые по культуральным и био-

Ферментативная активность, связанная с патогенностью *L.monocytogenes* в зависимости от источника выделения (%)

Фермент. активность	Группы				P
	Погибшие плоды (n=20)	Продукты питания (n=50)	Морские гидробионты (n=20)	Грызуны (n=28)	
	1	2	3	4	
Каталазная	100,0	100,0	100,0	100,0	1 и 2 p=1,0000 1 и 3 p=1,0000 1 и 4 p=1,0000
Гемолитическая	100,0	100,0	100,0	100,0	1 и 2 p=1,0000 1 и 3 p=1,0000 1 и 4 p=1,0000
Гиалуронидазная	100,0	92,0	60,0	100,0	1 и 2 p=0,1971 1 и 3 p=0,0031* 1 и 4 p=1,0000
Лецитиназная	100,0	79,5	81,8	80,0	1 и 2 p=0,0318* 1 и 3 p=0,0526* 1 и 4 p=0,0387*
Липазная в отношении: - твин 20	20,0	60,0	50,0	82,1	1 и 2 p=0,0035* 1 и 3 p=0,0539* 1 и 4 p=0,0001*
- твин 60	100,0	100,0	100,0	100,0	1 и 2 p=1,0000 1 и 3 p=1,0000 1 и 4 p=1,0000
- твин 80	10,0	62,0	30,0	75,0	1 и 2 p=0,0002* 1 и 3 p=0,1221 1 и 4 p=0,0001*

Примечание. * — различия достоверны.

химическим свойствам отнесены к патогенному виду *L.monocytogenes*. Среди выделенных из аутопсийного материала изолятов листерий преобладал серовариант 4b (15 из 22 штаммов), считающийся наиболее опасным в эпидемиологическом плане [6].

Известно, что развитие клинических проявлений листериоза обусловлено наличием факторов патогенности *L.monocytogenes*, в том числе ферментов, которые могут участвовать в развитии инфекционного процесса (каталаза, гиалуронидаза, лецитиназа, липолитическая активность). Все выделенные штаммы *L.monocytogenes* имели эти ферменты, были каталазоположительными, продуцировали гемолиз на кровяном агаре, лецитиназу на среде ГРМ №1 с активированным углем, обладали липолитической активностью на средах, содержащих твин 20, 60, 80. Гиалуронидаза была выявлена у всех изолированных нами культур листерий. Выявлены отличия в ферментативной активности в зависимости от источника выделения, изоляты листерий от погибших плодов и новорожденных об-

ладали более выраженной лецитиназной активностью, чем штаммы из других источников (таблица).

Изучение степени вирулентности на белых инбредных мышцах и морских свинках показало, что культуры являются неоднородными. Встречались как вирулентные культуры, так и слабовирулентные.

Выделенные из клинического материала культуры *L.monocytogenes* были проанализированы с помощью ПЦР на присутствие генов *inlA*, *inlB*, *inlE*, *inlC*, кодирующих факторы адгезии и инвазии, — интерналины, которые принимают участие в проникновении листерий в эукариотические клетки на начальных этапах их взаимодействия. Проведенный сравнительный анализ по выявлению генов *inlA*, *inlB*, *inlE*, *inlC* у *L. monocytogenes*, выделенных из аутопсийного материала от погибших плодов и новорожденных в Хабаровске, показал, что все изучаемые культуры листерий обладали этими генами.

Выводы

1. Выявление ДНК *L. monocytogenes* в аутопсийном материале при спонтанных выкидышах и перинатальной смертности с подтверждением положительных находок, выделением культур листерий и определением их патогенности свидетельствуют о значении листериоза как этиологического фактора в формировании репродуктивных потерь.

2. Все культуры *L.monocytogenes*, выделенные из аутопсийного материала от погибших плодов и новорожденных, содержали факторы патогенности, в том числе гены *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlE*, кодирующие белки — интерналины.

3. В комплексную диагностику внутриутробных инфекций у беременных с осложненным течением беременности необходимо включать индикацию *L.monocytogenes* в зеве, моче, особенно при наличии катаральных явлений, гриппоподобного состояния, субфебрилитета.

4. Изучение аутопсийного материала погибших плодов и новорожденных методом ПЦР на наличие листерий (особенно при преждевременном излитии околоплодных вод или изменении цвета околоплодных вод) целесообразно для определения этиологии перинатальных потерь и выбора реабилитационных мероприятий для матери.

Л и т е р а т у р а

1. Демидов В.Н. Современные возможности диагностики состояния плода во время беременности // Охрана здоровья матери и ребенка: сб. науч. тр. V Рос. науч. форума. - М., 2003. - С. 376-379.
2. Демографический ежегодник России: стат. сборник. - М.: Росстат, 2008. - 557 с.
3. Родина Л.В. Организация эпидемиологического надзора за листериозом в условиях г. Москвы: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - М., 2003. - 24 с.
4. Серов В.Н., Сидельникова А.Н. Руководство по практическому акушерству. - М.: Триада-Х, 2002. - 304 с.
5. Сидельникова В.Н. Привычная потеря беременности. - М.: Триада-Х, 2000. - 304 с.
6. Тарковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. - М.: Медицина для всех, 2002. - 200 с.

7. Aljicevic M., Beslagic E., Zvizdic S. et al. *Listeria monocytogenes* in women of reproductive age // *Med. Arh.* - 2005. - Vol. 59. - P. 297-298.

8. Skjolderbrand-Spare L., Tolfenstam T., Paradoyiannakis N. et al. Parvovirus B 19 infections: association with third trimester intrauterine fetal death // *British Journal of Obstetrics and Gynaecology.* - 2000. - Vol. 107. - P. 476-480.

9. Lecuit M., Nelson D.M., Smith S.D. et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin // *PNAS.* - 2004. - Vol. 101, №16. - P. 6152-6157.

10. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants // *Clin. Microbiol. Rev.* - 2001. - Vol. 14. - P. 584-640.

Координаты для связи с авторами: *Островская Ольга Васильевна* — доктор мед. наук, вед. науч. сотр.,

рук. лаборатории вирусологии Института охраны материнства и детства СО РАМН, тел.: 8(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru; *Зайцева Елена Александровна* — доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаборатории экологии патогенных бактерий НИИЭМ СО РАМН; *Пуховская Наталья Михайловна* — канд. биол. наук, врач-вирусолог высшей категории Хабаровской противочумной станции; *Ивахнишина Наталья Михайловна* — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории вирусологии Института охраны материнства и детства СО РАМН; *Мусатов Игорь Святославович* — врач-микробиолог высшей категории Хабаровской противочумной станции; *Наговицына Елена Борисовна* — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории вирусологии Института охраны материнства и детства СО РАМН; *Власова Марина Александровна* — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории вирусологии Института охраны материнства и детства СО РАМН; *Иванов Леонид Иванович* — гл. врач Хабаровской противочумной станции.



УДК 618.1 : 616.831.14 : 618.11

И.В. Жуковец

СОСТОЯНИЕ ЯИЧНИКОВ У ЖЕНЩИН С ДИСФУНКЦИЕЙ ГИПОТАЛАМУСА В РЕПРОДУКТИВНОМ ВОЗРАСТЕ

*Амурская государственная медицинская академия,
675000, ул. Горького, 95, тел.: 8(4116)-52-68-28, e-mail: agma@amur.ru, г. Благовещенск*

Среди гинекологических эндокринных синдромов, связанных с гиперандрогенией метаболического происхождения, наиболее распространен нейрообменно-эндокринный синдром, или дисфункция гипоталамуса, который составляет от 3 до 5% среди всех заболеваний репродуктивной системы [1, 5].

Основными клиническими проявлениями синдрома являются нарушения менструального цикла, абдоминальный тип ожирения, андрогензависимая дермопатия, бесплодие [5]. Абдоминальный тип ожирения является маркером гиперинсулинемии и инсулинорезистентности. Инсулин повышает метаболизм андрогенов, чем обуславливает увеличение общего количества эстрогенов [6]. Жировая ткань является местом активации процессов ароматизации, в результате которой андростендион, синтезируемый корой надпочечников и клетками стромы яичников, трансформируется в эстрон. Часть эстрона в периферической ткани трансформируется в эстрадиол, но его концентрация не достигает уровня середины фолликулярной фазы, имеет монотонный характер, что свидетельствует о хронической ановуляции [6, 7]. Одновременно избыток андрогенов тормозит фолликулогенез, вызывая преждевременную атрезию фолликулов, что приводит к формированию вторичных поликистозных яичников [2, 8].

У 25,0% женщин с эндокринно-метаболическими нарушениями диагностируются ультразвуковые критерии синдрома поликистозных яичников, у 44,3% — опухолевидные образования яичников [1, 3, 4].

Эхография является необходимым, но недостаточным методом для оценки функционального состояния яичников, результаты следует оценивать в совокупности с другими клиническими и лабораторными изменениями. Для оценки фолликулярного резерва в современной практике используется ингибин В. Он определяет базальную секрецию ФСГ, вырабатывается клетками гранулезы антральных фолликулов [2].

Цель исследования заключается в комплексной оценке состояния яичников у женщин с дисфункцией гипоталамуса по данным стероидогенеза, фолликулогенеза и эхографического исследования.

Материалы и методы

Обследованы 185 женщин с дисфункцией гипоталамуса (основная группа) и 20 женщин — без эндокринных нарушений (группа сравнения). Группы сопоставимы по возрасту.

Всем больным для уточнения эндокринно-метаболических нарушений рассчитывался индекс массы тела