

На правах рукописи

Кондрахина Ирина Никифоровна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ КОНТАГИОЗНЫМ  
МОЛЛЮСКОМ, НА ОСНОВАНИИ ИЗУЧЕНИЯ КЛИНИЧЕСКИХ И  
ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ  
(КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.00.11- кожные и венерические болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва - 2006

Работа выполнена в консультативно-диагностическом отделении Федерального Государственного Учреждения «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и в Центре специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний Минздрава и Минобороны России (г. Сергиев-Посад).

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

Кубанов Алексей Алексеевич

**Официальные оппоненты:**

кандидат медицинских наук

Гришко Татьяна Николаевна

доктор медицинских наук,

профессор

Резайкина Анна Васильевна

**Ведущее научное учреждение:**

Российский Университет Дружбы Народов, г. Москва

Защита состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006г. в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.115.01 при ГУ «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт» Росздрава по адресу: 107076, г.Москва, ул. Короленко д.3, корп.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт» Росздрава (г.Москва).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2006г.

Учёный секретарь

Диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Иванова Наталья Константиновна

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Контагиозный моллюск – доброкачественное вирусное заболевание, вызываемое ортопоксвирусом, который относится к семейству Poxviridae, подсемейству Chordopoxviridae, роду Molluscipoxvirus. Заболевание характеризуется появлением на коже и слизистых оболочках полушаровидных узелков величиной от булавочной головки до горошины с центральным пупковидным углублением (Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н., 1999). Это заболевание встречается в основном у детей и имеет тенденцию к частым рецидивам (Smith K.J., Skelton H., 2002). По данным ГУ ЦНИКВИ заболевание контагиозный моллюск составляет около 10% от общего числа обращающихся за амбулаторной помощью на приёме у детских дерматологов.

В последнее время наблюдается патоморфоз дерматозов, отмечается явная тенденция к увеличению торпидно текущих, резистентных к проводимой терапии кожных болезней (Кубанова А.А., Тихонова Л.И., 2004). Ухудшение экологической обстановки, неправильное питание и другие неблагоприятные факторы могут оказывать влияние на частоту возникновения и характер клинического течения контагиозного моллюска.

Наряду с характерной клинической картиной заболевания, в последнее время наблюдается большое количество атипичных клинических проявлений контагиозного моллюска, особенно у детей, одним из диагностических критериев для подтверждения контагиозного моллюска является обнаружение в содержимом узелков внутриклеточных базофильных включений, так называемых «телец моллюсков» или «телец Гендерсона – Патерсона» при бактериоскопическом исследовании (Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н., 1999). Однако при длительном течении заболевания, при атипичных клинических проявлениях не всегда удаётся определить внутриклеточные базофильные включения. При визуальной оценке клинической картины также возможны диагностические ошибки. Возможности светового микроскопа не позволяют обнаружить возбудитель.

В то же время для диагностики вирусных заболеваний широко используются молекулярные методы исследования. Данные литературы свидетельствуют о возможности использования направленной амплификации видоспецифических фрагментов геномной ДНК вируса в полимеразной цепной реакции при диагностике контагиозного моллюска (Гинзбург А.Л., 1996). Проведение полимеразной цепной реакции обеспечивает высокую специфичность обнаружения вируса контагиозного моллюска в биоматериале от больных детей и позволяет использовать этот метод для дифференциальной диагностики заболевания. До настоящего времени в Российской Федерации не были разработаны методы молекулярной идентификации вируса контагиозного моллюска, также не встречались данные об исследовании морфологической структуры вируса контагиозного моллюска.

Прогноз инфекционного заболевания, по мнению многих авторов, зависит от способности иммунной системы элиминировать патоген в результате активации (развития иммунного ответа) иммунокомпетентных клеток (Земсков А.В., Земсков В.М., Караулов А.В., 2005). Результаты изучения основных иммунорегуляторных, цитотоксических, активированных клеток, иммуноглобулинов, цитокинов, особенно обладающих цитотоксическим, противовирусным эффектом и участвующих в клеточных механизмах защиты у больных контагиозным моллюском, помогут выяснить роль иммунной системы в развитии различных клинических проявлений заболевания (распространенные или ограниченные высыпания).

Одним из основных методов лечения детей, больных контагиозным моллюском, является механическое удаление содержимого каждого элемента с его последующей обработкой дезинфицирующими средствами (Скрипкин Ю.К., Мордовцев В.Н., 1999). В последние годы у больных контагиозным моллюском показана эффективность крио – и лазеротерапии, иммуномодуляторов, интерферонов, противовирусных препаратов наружного и системного применения (Zabawski E.J., 2000). Однако ни один из методов лечения контагиозного моллюска у детей не дает гарантированного результата и очень

часто наблюдаются рецидивы заболевания. Таким образом, очевидна необходимость оптимизации ведения больных контагиозным моллюском с внедрением новых диагностических методов, изучением состояния иммунной системы, использованием полученных данных для обоснования и оценки эффективности назначения лечебных мероприятий, что определило цель и задачи исследования.

**Цель исследования.** Оптимизация лечения детей, больных контагиозным моллюском, с учетом клинических особенностей течения заболевания и иммунологических показателей.

**Задачи исследования.**

1. Изучить факторы риска возникновения и особенности клинического течения контагиозного моллюска у детей в современных условиях.
2. Разработать метод обнаружения вируса контагиозного моллюска с использованием направленной амплификации фрагментов его ДНК в полимеразной цепной реакции.
3. С помощью электронной микроскопии изучить морфологическую структуру вируса контагиозного моллюска.
4. Изучить уровень циркулирующих иммунокомпетентных клеток с различными дифференцировочными антигенами (CD3+,CD4+,CD8+,CD16+,CD21+,CD38+), иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), цитокинов (интерфероны альфа и гамма, фактор некроза опухолей, интерлейкины 2,6,8) и на основании полученных показателей установить их особенности у детей с различной клинической картиной заболевания.
5. Изучить эффективность применения полусинтетического препарата микробного происхождения (ликопида) в комплексной терапии детей, больных контагиозным моллюском.

**Научная новизна.**

Впервые установлено, что в современных условиях контагиозный моллюск достоверно чаще возникает у детей в возрасте от 1 до 7 лет, часто болеющих

острыми респираторно-вирусными инфекциями (ОРВИ), перенесших гнойно-воспалительные заболевания (отиты, ангины, пиелонефриты), детские инфекции (ветряная оспа, краснуха, скарлатина) и характеризуется распространенными высыпаниями, нередко атипичными, с экзематизацией и частыми рецидивами. У 18,8% детей выявляются клинические проявления других заболеваний вирусного происхождения (вульгарные бородавки, простой герпес).

Впервые обоснована структура видоспецифических праймеров, использование которых при постановке полимеразной цепной реакции обеспечивает высокую специфичность обнаружения вируса контагиозного моллюска в биоматериале больных детей и позволяет использовать этот метод для дифференциальной диагностики заболевания.

Впервые показано, что применение у детей, больных контагиозным моллюском, полимеразной цепной реакции и электронно-микроскопического анализа повышает качество и достоверность диагностики заболевания.

Впервые установлено, что у детей с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска и страдающих частыми ОРВИ, другими заболеваниями вирусного и бактериального генеза, наблюдаются как достоверное повышение количества зрелых Т- лимфоцитов (СД3+), лимфоцитов, обеспечивающих первую линию защиты (СД8+, СД16+), так и показателей активированного состояния иммунной системы (иммуноглобулины, цитокины) наряду со снижением относительного количества основных иммунорегуляторных клеток (СД4+). У детей с ограниченными высыпаниями имеются сдвиги меньшего количества иммунологических параметров при отсутствии признаков активации клеток иммунной системы.

В результате применения полусинтетического иммуномодулирующего препарата микробного происхождения глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида) после удаления высыпаний контагиозного моллюска у детей

исчезают рецидивы заболевания, уменьшается частота ОРВИ, которые сопровождаются положительной динамикой лабораторных показателей активности патологического процесса.

### **Практическая значимость.**

Предложен лабораторный метод идентификации вируса контагиозного моллюска с помощью полимеразной цепной реакции.

Показано, что электронно-микроскопическое исследование позволяет выявить скопления типичных форм вируса в пробах от больных.

Разработаны показания к применению полусинтетического иммуномодулирующего препарата микробного происхождения ликопада, которые заключаются в том, что после удаления высыпаний ликопад назначается по 1 мг 3 раза в день в течение 10 дней детям с распространенными высыпаниями, часто рецидивирующим течением, особенно после перенесенных заболеваний бактериального и вирусного генеза.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

Особенности контагиозного моллюска в современных условиях характеризуются возникновением распространенных, рецидивирующих и атипичных высыпаний, с экзематизацией достоверно чаще у детей в возрасте от 1 до 7 лет, часто болеющих ОРВИ, после перенесения гнойно-воспалительных заболеваний (отиты, ангины, пиелонефриты), детских инфекций (ветряная оспа, краснуха, скарлатина).

Направленная амплификация концевой последовательности фрагмента гена ДНК вируса контагиозного моллюска с использованием пары праймеров в полимеразной цепной реакции обеспечивает быстрое видоспецифическое обнаружение возбудителя в биоматериале от детей, больных контагиозным моллюском.

Лабораторная идентификация контагиозного моллюска, основанная на методе полимеразной цепной реакции и электронно-микроскопического анализа, повышает достоверность и качество диагностики.

У детей с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска и страдающих частыми ОРВИ и другими заболеваниями вирусного и бактериального генеза имеются достоверные признаки активированного состояния иммунной системы наряду со сниженными показателями Т-клеточного звена иммунной системы.

Рецидивирующее течение контагиозного моллюска с распространенными высыпаниями у детей, страдающих частыми ОРВИ, другими заболеваниями вирусного и бактериального происхождения с измененными иммунологическими показателями явилось основанием для применения полусинтетического иммуномодулирующего препарата микробного происхождения ликопада. Ближайшие и отдаленные результаты лечения с учетом динамики иммунологических показателей свидетельствуют об обоснованности и целесообразности включения ликопада в терапию детей, больных контагиозным моллюском.

**Апробация работы.** Основные материалы, представленные в диссертации, доложены и получили положительную оценку на заседаниях Ученого Совета Федерального Государственного Учреждения «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (2002-2006); на Всероссийской научно-прикладной конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний» (Москва, 2002); на Всероссийской конференции «Достижения и перспективы развития дерматовенерологии» (Екатеринбург, 2006).

**Публикации.** По материалам исследований опубликовано 4 печатные работы.

**Внедрение в практику.** Полученные результаты внедрены в практику консультативно-диагностического отделения Федерального Государственного Учреждения «Центральный научно-исследовательский кожно-



венерологический институт Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа изложена на 123 страницах компьютерного текста, состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных исследований (иллюстрированы 13 таблицами, 8 рисунками), заключения, выводов, указателя использованной литературы, включающего 142 источника отечественных и иностранных авторов.

### **Содержание работы**

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

Работа проведена на базе Федерального Государственного Учреждения «Центральный научно-исследовательский кожно-венерологический институт Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и на базе Центра специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний Минздрава и Минобороны России (г. Сергиев-Посад) в период с января 2002 по январь 2005гг. Пациенты отбирались методом произвольной выборки при амбулаторном обследовании.

В исследованиях под наблюдением находилось 80 детей с клиническим диагнозом контагиозный моллюск в возрасте от 1 года до 14 лет, из которых 45 - мальчики (56,3 %), 35- девочки (43,7 %). Больные распределялись следующим образом: с распространенными высыпаниями - 62,5 %, с ограниченными – 37,5 %. В клиническое обследование входило изучение анамнеза жизни и заболевания, оценка общего и локального статуса пациентов, обследование с применением клинико-лабораторных, иммунологических, молекулярно-биологических и электронно-микроскопических методов исследования. До и после курса лечения больным по показаниям проведена консультация педиатра.

Больные были разделены на 2 группы, в зависимости от способа лечения, сопоставимые по полу, возрасту и количеству высыпаний. Наблюдение за

результатами лечения в катамнезе (от 6 месяцев до 2 лет) проведено у 70 детей (87,5 %).

В исследованиях использовали культуры штаммов вируса контагиозного моллюска и других микроорганизмов из музейной коллекции Центра специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний Минздрава и Минобороны России (г. Сергиев - Посад). Материал для исследования вируса контагиозного моллюска получали из биопсийного материала от больных детей. В качестве исследуемых препаратов при постановке полимеразной цепной реакции использовали суспензию ортопоксвирусов, выращенных в 12-13 – суточных развивающихся куриных эмбрионах или культурах клеток. Для компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей секвенированных фрагментов использовали базу данных Gene/Protein Sequence Database GenBank R91.0, октябрь 1995г. В качестве основы буфера для проведения полимеразной цепной реакции использовали раствор, рекомендованный Т.Maniatis с соавторами (Thompson С.Н., Biggs I.M., DeZwart-Steffe R.T., 1990) . В реакционную смесь вносили 200-500 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,25 мкл препарата термостабильной ДНК-полимеразы Taq (активность - 5 ед.мкл<sup>-1</sup>) и 0,2-1,0 мкМ каждого праймера. Для выявления продуктов амплификации использовали электрофорез в 1 % горизонтальном агарозном геле и 1 М трис-ацетатный буфер (рН 7,2) с добавлением этидия бромида до конечной концентрации 0,5 мкг.мл<sup>-1</sup>. Разделение фрагментов ДНК проводили при напряженности электрического поля 5-10 В.см<sup>-1</sup>. Результаты электрофореза оценивали визуально при ультрафиолетовом облучении с длиной волны (305±10) нм и документировали.

В качестве маркеров молекулярной массы фрагментов ДНК использовали 1 kВ DNA Ladder («Pharmacia», Швеция). Выбор пар праймеров осуществляли с использованием программы Oligo 4.0 (Konya J., Thompson С.Н., De-Zwart-Steffe R.T., 1992), а также компьютерной программы Nuclon 2.0, разработанной В.В.

Зубовым. Химический синтез олигонуклеотидов осуществляли фосфоамидитным методом на автоматическом синтезаторе GeneAssembler Plus («Pharmacia», Швеция) из компонентов фирмы «Pharmacia». Концентрацию и чистоту растворов синтезированных праймеров и положительных контрольных препаратов ДНК определяли спектрофотометрическим методом.

Для электронной микроскопии препараты телец контагиозного моллюска фиксировали в 2 % растворе глутарового альдегида и выдерживали при температуре 4 °С в течение 12 час, после чего на микротоме готовили ультратонкие срезы. Срезы наносили на сетки, покрытые формваровой пленкой, укрепленной углеродом, и негативно контрастировали 1% раствором нейтрализованной фосфорно-вольфрамовой кислоты. Готовые препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100В при различном инструментальном увеличении.

Иммунологические исследования включали определение общего количества лейкоцитов, лимфоцитов, субпопуляций лимфоцитов, уровня иммуноглобулинов и цитокинов в сыворотке крови. Содержание субпопуляций иммунокомпетентных клеток определяли на проточном цитометре «Epics XL» с использованием флюоресцентных реактивов «Beckton Dickinson» в соответствии с рекомендациями фирмы изготовителя. Уровень цитокинов (интерлейкины 2, 6, 8, фактор некроза опухолей, интерфероны) определяли в иммуноферментном анализе с использованием соответствующих наборов «BD Bioscience» по протоколу фирмы-изготовителя, иммуноглобулинов – методом ИФА-диагностики.

### **Результаты исследования и их обсуждение.**

Под нашим наблюдением находилось 80 детей, больных контагиозным моллюском, в возрасте от 1 года до 14 лет, из них мальчиков было 45 ( 56,3 %), девочек – 35 (43,7 %). Большую часть пациентов - 60 человек (75 ±4,8%) составили дети от 1 до 7 лет, меньшую - 20 человек ( 25 ± 4,7%) от 7 до 14 лет (p<0,001). Пациенты обращались с жалобами на наличие высыпаний на коже

лица, конечностей, туловища. Давность заболевания колебалась от 1 недели до 2 лет, при этом у 60 детей ( $75 \pm 4,8\%$ ) она определялась от 6 месяцев до 2 лет, у 20 ( $37,5 \pm 5,4\%$ ) – до 6 месяцев ( $p < 0,001$ ). Частота рецидивов колебалась от 2 до 10 раз за весь период заболевания.

Больные распределялись следующим образом: распространенные высыпания были у 50 ( $62,5 \pm 5,4\%$ ): у 40 - в возрасте от 1 до 7 лет и у 10 - от 7 до 14 лет. Ограниченные высыпания были у 30 детей: у 20 детей в возрасте от 1 до 7 лет и у 10 – от 7 до 14 лет. Таким образом, у большинства детей наблюдались распространённые высыпания контагиозного моллюска ( $p < 0,001$ ).

При осмотре больных с распространёнными высыпаниями было выявлено расположение элементов контагиозного моллюска на различных участках тела, преимущественно на веках, на коже лица, на спине, животе, в области наружных половых органов. Высыпания были представлены множественными куполообразными папулами с пупковидным вдавлением в центральной части или без него, нередко окружённые ободком гиперемии. Размер элементов различный - от 1 до 15 мм в диаметре. Цвет элементов – жемчужно-белый, розовый или цвет нормальной кожи. Количество элементов колебалось от 5 до 20 (при ограниченных высыпаниях), от 20 до 200 (при распространённых). Высыпания, как правило, субъективно больных не беспокоили, в редких случаях пациенты жаловались на болезненность, зуд в местах высыпаний. У 10 больных ( $12,5\%$ ) папулы были окружены экзематизированными высыпаниями. Встречались больные – 45 человек ( $56,2\%$ ) с атипичной клинической картиной контагиозного моллюска, которым ранее были поставлены диагнозы – милиумы, фолликулиты, фурункулы.

У всех больных с ограниченными высыпаниями элементы контагиозного моллюска располагались на лице, чаще вокруг рта, в области щёк, на веках.

«Семейная форма» (когда болели и родители) контагиозного моллюска наблюдалась у 5 больных ( $6,25\%$ ). У большинства детей ( $60 \pm 5,5\%$ )

заболевание явилось рецидивом, у остальных ( $40 \pm 5,4 \%$ ) возникло впервые ( $p < 0,05$ ).

В результате изучения анамнеза установлено, что высыпания контагиозного моллюска начинались с единичных мелких элементов, но при отсутствии лечения приобретали распространённый характер после очередного обострения ОРВИ (до 5-6 раз в год) у 31 больного, детских инфекций (ветряная оспа, краснуха, скарлатина) – у 17, после гнойно-воспалительных заболеваний (отиты, гаймориты, ангины, пиелонефриты) – у 12. У 15 детей (18,8%) были выявлены другие вирусные заболевания: у 12 (15%) – вульгарные бородавки, у 3 (3,8%) – простой герпес.

Таким образом, клинический анализ результатов обследования детей, больных контагиозным моллюском, позволяет заключить, что  $75 \pm 7,7\%$  детей страдали частыми ОРВИ, гнойно-воспалительными заболеваниями (отиты, гаймориты, ангины, пиелонефриты), после очередного рецидива/обострения которых появлялись высыпания, обуславливая частые с распространёнными проявлениями рецидивы контагиозного моллюска, т.е. у детей имелись клинические признаки позднего иммунологического старта или вторичного иммунодефицита, которые явились основанием для включения в терапию больных иммуностропных препаратов и согласуются с результатами исследований педиатров, клинических иммунологов и аллергологов (Стефани Д.В., Вельтищев Ю.Е., 1996; Ильина Н.И., Гущин И.С., Латышева Т.В. и др., 2001).

Учитывая то, что невозможно выделить и размножить вирус контагиозного моллюска методами классической вирусологии, амплификация специфических фрагментов его ДНК в полимеразной цепной реакции представляется наиболее перспективным лабораторным методом исследования в диагностике этого заболевания, как одного из наиболее чувствительных и специфичных. Наибольшую значимость в этиологии заболевания имеет подтип I вируса контагиозного моллюска, нежели подтипы II, III и IV (Nakamura J., Arao Y.,

Yoshida M. et al., 1992), в связи с чем основные усилия в разработке средств идентификации возбудителя целесообразно сосредоточить, прежде всего на подтипе I вируса контагиозного моллюска. Электронная микроскопия структуры поксвирусов, отличающая их от других семейств вирусов, может быть существенным показателем при комплексной идентификации возбудителя контагиозного моллюска в сочетании с другими методами анализа.

Поставленные задачи по идентификации вируса контагиозного моллюска на основе полимеразной цепной реакции и электронной микроскопии были решены. При выборе праймеров для идентификации ДНК вируса контагиозного моллюска использовали нуклеотидную последовательность MOCDRNAP из базы данных GenBank (файл MOCDRNAP.GB). Она включает полные последовательности генов поли-А-полимеразы и двух субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Выбор исходной последовательности был обусловлен преимущественно высокой консервативностью подобных генов. Для поксвирусов характерна высокая генетическая стабильность, но встречаются и переменные участки, поэтому надёжнее было ориентироваться на заведомо консервативные районы генома.

Основная проблема, затрудняющая выбор праймеров - это высокое содержание GC-пар у данного вируса, следствием чего является большое количество тугоплавких шпилек (инвертированных повторов). Подобные структуры могут тормозить или даже полностью предотвращать амплификацию ДНК. Поэтому для подбора праймеров использовали только участки, свободные от шпилек. Достаточно протяжённых участков, пригодных для амплификации, оказалось совсем немного. При помощи программы OLIGO 4.0 было подобрано две пары праймеров с температурой отжига более 60°C.

Проведенные нами экспериментальные исследования показали, что применение пары праймеров VC5-VC6, комплементарных последовательностям гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы вируса контагиозного моллюска, обеспечивает ферментативный синтез копий ДНК и

видоспецифическое обнаружение возбудителя методом полимеразной цепной реакции в пробах и материалах, полученных от больных. Нами обоснована структура праймеров для видоспецифической полимеразной реакции с ДНК вируса контагиозного моллюска и условия проведения реакции с выбранными праймерами. Показано, что видоспецифичность метода достигается отжигом праймеров при температуре 55 °С.

Экспериментальными исследованиями нами показано, что неспецифическая нуклеосорбция высвобождаемой в ходе лизиса ДНК на микрочастицах стекла СРG-10/120 в присутствии высоких концентраций гуанидина тиоционата пригодна для подготовки потенциально содержащих вирус контагиозного моллюска проб к их анализу направленной амплификацией ДНК.

Полученные результаты исследований показали пригодность выбранных праймеров для амплификации фрагментов гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы вируса контагиозного моллюска и адаптированного метода пробоподготовки для выделения нуклеиновой кислоты возбудителя при изучении биопсийных материалов от больных людей с помощью полимеразной цепной реакции.

Использование в диагностике контагиозного моллюска только электронной микроскопии не позволяет провести идентификацию этого возбудителя в клинических материалах, т.к. выявляет только морфологические признаки, характерные для всего семейства ортопоксвирусов. Исследования, проведенные электронно-микроскопическими методами, позволили определить скопления типичных форм вируса контагиозного моллюска в биопсийных пробах, взятых от больных. При этом установлено, что вирусные частицы относятся к I подтипу вируса контагиозного моллюска, могут быть полиморфными и находиться на разных этапах морфогенеза.

Анализ результатов исследования показателей иммунной системы выявил, что у детей в возрасте от 1 до 7 лет с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска обнаружено достоверное снижение относительного количества CD4+ позитивных клеток ( $23,6 \pm 1,1\%$  - основная группа,  $23,7 \pm 2,8\%$  - группа сравнения против  $35 \pm 2,3\%$  в контроле;  $p < 0,001$  везде), иммунорегуляторного индекса ( $0,5 \pm 0,08$  - основная группа,  $0,4 \pm 0,02$  - группа сравнения против  $1,8 \pm 0,2$  в контроле;  $p < 0,0001$  и  $p < 0,001$  соответственно), повышение лимфоцитов ( $33,5 \pm 0,8\%$  - основная группа,  $34,7 \pm 0,6\%$  - группа сравнения против  $25 \pm 1,6\%$  в контроле;  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  соответственно), относительного количества CD8+- ( $49,1 \pm 0,7\%$  - основная группа,  $54,7 \pm 0,6\%$  - группа сравнения против  $21 \pm 1,6\%$  в контроле;  $p < 0,001$  везде), CD16+- ( $29,8 \pm 1,0\%$  - основная группа,  $30,1 \pm 1,3\%$  - группа сравнения против  $12 \pm 1,3\%$  в контроле;  $p < 0,001$  везде), CD38+- ( $32,0 \pm 1,1\%$  - основная группа,  $31,1 \pm 1,7\%$  - группа сравнения против  $26,6 \pm 0,58\%$  в контроле;  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно) клеток, уровня IgA ( $2,3 \pm 0,2$  г/л - основная группа,  $3,2 \pm 0,4$  г/л - группа сравнения против  $1,13 \pm 0,08$  г/л в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно), IgM ( $1,2 \pm 0,06$  г/л - основная группа,  $1,2 \pm 0,1$  г/л - группа сравнения против  $0,94 \pm 0,07$  г/л в контроле;  $p < 0,05$  везде), интерферона гамма ( $1829,6 \pm 42,2$  МЕ/мл - основная группа,  $1920, \pm 49$  МЕ/мл - группа сравнения против  $1200 \pm 250$  МЕ/мл в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно), провоспалительных цитокинов: интерлейкина 6 ( $975 \pm 25$  пкг/мл - основная группа,  $994 \pm 16$  пкг/мл - группа сравнения против  $500 \pm 30$  пкг/мл в контроле;  $p < 0,001$  везде), интерлейкина 8 ( $622 \pm 26$  пкг/мл - основная группа,  $618 \pm 29$  пкг/мл - группа сравнения против  $300 \pm 20$  пкг/мл в контроле;  $p < 0,001$  везде), фактора некроза опухоли альфа ( $71,3 \pm 2,2$  пкг/мл - основная группа,  $72 \pm 1,9$  пкг/мл - группа сравнения против  $35 \pm 15$  пкг/мл в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно), а у детей в возрасте от 7 до 14 лет - достоверно повышены были относительное количество CD16+ ( $16,6 \pm 1,8\%$  - основная группа,  $29,8 \pm 5,6\%$  - группа сравнения против  $12 \pm 1,3\%$  в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно), CD38+ ( $36,6 \pm 1,1\%$  - основная группа,  $36,6 \pm 2,4\%$  - группа



сравнения против  $26,6 \pm 0,58\%$  в контроле;  $p < 0,001$  везде) позитивных клеток, уровень IgA ( $2,7 \pm 0,4$  г/л - основная группа,  $3,8 \pm 0,5$  г/л - группа сравнения против  $1,54 \pm 0,42$  г/л в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$  соответственно), IgM ( $1,9 \pm 0,2$  г/л - основная группа,  $2,2 \pm 0,12$  г/л - группа сравнения против  $1,03 \pm 0,47$  г/л в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно), фактора некроза опухоли альфа ( $71,0 \pm 7,0$  пкг/мл - основная группа,  $71,0 \pm 2,6$  пкг/мл - группа сравнения против  $35 \pm 15$  пкг/мл в контроле;  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно), интерлейкина 8 ( $720 \pm 80$  пкг/мл - основная группа,  $796 \pm 37$  пкг/мл - группа сравнения против  $300 \pm 20$  пкг/мл в контроле;  $p < 0,05$  везде). Только у детей группы сравнения в возрасте от 7 до 14 лет достоверно снижены были относительное количество CD4+ клеток ( $22,6 \pm 1,3\%$  против  $35 \pm 2,3\%$  в контроле,  $p < 0,001$ ), иммунорегуляторный индекс ( $0,4 \pm 0,02$  против  $1,8 \pm 0,2\%$  в контроле,  $p < 0,001$ ), повышены - CD8+ клетки ( $50,0 \pm 0,4\%$  против  $21 \pm 1,6\%$  в контроле,  $p < 0,001$ ), уровень цитокинов: интерферона гамма ( $1985 \pm 53$  МЕ/мл против  $1200 \pm 250$  МЕ/мл в контроле,  $p < 0,001$ ), интерлейкина 6 ( $1126 \pm 81$  пкг/мл против  $500 \pm 30$  пкг/мл в контроле,  $p < 0,05$ ).

У детей с ограниченными высыпаниями контагиозного моллюска имело место достоверное повышение относительного количества лимфоцитов, CD3+-, CD4+-, CD8+-, CD16+-, CD38+- клеток, уровень IgA, в то время как содержание цитокинов было в пределах показателей лиц контрольной группы. Следовательно, у детей ограниченными высыпаниями не было достоверного снижения уровня хелперов/индукторов и в периферической крови отсутствовали маркеры-медиаторы активации клеток иммунной системы.

Результаты исследования позволяют судить о том, что у детей с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска, страдающих частыми ОРВИ, воспалительными заболеваниями других органов наличие активации иммунной системы, очевидно. Между тем, активированное состояние клеток иммунной системы у этих детей наряду с дефицитом основных иммунорегуляторных клеток (CD4+) вполне могут создать благоприятную ситуацию для срыва защитных механизмов. Таким образом,

клинические и лабораторные данные, полученные в результате обследования детей, больных контактиозным моллюском, аргументируют целесообразность использования после удаления высыпаний иммуномодулирующего препарата.

Из данных анамнеза, большинству больных (64 пациента) ранее проводилось лечение контактиозного моллюска с применением механического удаления элементов, использования наружных противовирусных препаратов, десенсибилизирующей терапии в виде назначения препаратов кальция, антигистаминных препаратов, энтеросорбентов. При экзематизированных формах контактиозного моллюска применялись топические кортикостероиды, антибактериальные препараты. Как правило, после первого удаления элементов очень часто высыпания появлялись снова. Проведенная терапия не только не оказывала ожидаемого результата, но и наоборот приводила к дальнейшему распространению кожного процесса - увеличению количества элементов контактиозного моллюска и увеличению частоты рецидивов у детей с сопутствующей патологией.

Критериями эффективности проводимой нами терапии являлись показатели полного отсутствия рецидивов или снижения их частоты, длительность межрецидивных периодов, иммунологические показатели.

Больные были разделены на 2 группы, в зависимости от методов лечения. Для лечения детей основной группы - 45 пациентов (30 больных с распространёнными высыпаниями: из них 25 – от 1 до 7 лет и 5 – от 7 до 14 лет, а также 15 больных с ограниченными высыпаниями: из них 10– от 1 до 7 лет и 5- от 7 до 14 лет), с давностью заболевания от 3 месяцев до 2 лет - помимо традиционного механического удаления, назначали препарат ликопид (МНН-глюкозаминилмурамилдипептид). Действующим началом ликопида является N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин, представляющий собой структурный компонент клеточной стенки бактерий. В тестах *in vitro* установлено, препарат увеличивает активность фагоцитов(макрофагов и нейтрофилов), Т- и В-лимфоцитов. При этом возрастает бактерицидная и цитотоксическая активность фагоцитов,

стимулируется синтез специфических антител и цитокинов (интерлейкинов, фактора некроза опухолей, интерферонов и колониестимулирующих факторов). Ликопид обладает выраженным иммуномодулирующим эффектом (увеличение сниженных, уменьшение повышенных иммунологических показателей). Установлено, что использование ликопида в комплексной терапии больных, страдающих псориазом, атопическим дерматитом, пиодермиями и другими заболеваниями способствует увеличению продолжительности ремиссии, уменьшению тяжести новых рецидивов (обострений), препарат разрешен к применению для лечения детей, позволяет значительно повысить эффективность противовирусной терапии, сократить продолжительность лечения.

При лечении детей ликопид назначался в дозе 1 мг (таблетированная форма выпуска) 3 раза в сутки внутрь в течение 10 дней. Больным группы сравнения - 35 пациентов (20 больных с распространёнными высыпаниями: из них 15 – от 1 до 7 лет и 5 – от 7 до 14 лет, а также 15 больных с ограниченными высыпаниями: из них 10 – от 1 до 7 лет и 5 – от 7 до 14 лет) элементы контактного моллюска удаляли механическим путём, без применения ликопида. Выраженность клинических проявлений, иммунологические показатели оценивали у всех больных до и после окончания курса лечения.

Терапевтическую эффективность оценивали в течение 3 недель после окончания лечения, по основному клиническому признаку – отсутствию рецидива заболевания.

Анализ иммунологических показателей после лечения в сравнении с до лечением показал, что у детей основной группы в возрасте от 1 до 7 лет с распространёнными высыпаниями наблюдалось достоверное снижение повышенного до лечения относительного количества лимфоцитов ( $33,5 \pm 0,8\%$  - до лечения,  $30,0 \pm 1,2\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), CD8+ ( $49,1 \pm 0,7\%$  - до лечения,  $23,8 \pm 1,2\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), CD16+ ( $29,8 \pm 1,0\%$  - до лечения,  $16,7 \pm 0,7\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), CD38+ ( $32,0 \pm 1,1\%$  - до лечения,  $28,9 \pm 0,7\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ) клеток, уровня интерферона гамма ( $1829,6 \pm 42,2$  МЕ/мл - до

лечения,  $1194,9 \pm 46,2$  МЕ/мл - после лечения,  $p < 0,05$ ), интерлейкина 6 ( $975 \pm 25$  пкг/мл- до лечения,  $556 \pm 38$  пкг/мл- после лечения,  $p < 0,05$ ), интерлейкина 8 ( $662,5 \pm 26$  пкг/мл- до лечения,  $351 \pm 29$  пкг/мл - после лечения,  $p < 0,05$ ), фактора некроза опухоли ( $71,3 \pm 2,2$  пкг/мл- до лечения,  $58 \pm 1,4$  пкг/мл - после лечения,  $p < 0,05$ ) и повышение количества CD4+ -клеток ( $23,6 \pm 1,1\%$ - до лечения,  $42,1 \pm 1,9\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), иммунорегуляторного индекса ( $0,5 \pm 0,08$  – до лечения,  $1,3 \pm 0,09$  – после лечения,  $p < 0,05$ ). Кроме того, уровень иммуноглобулинов класса А еще больше повысился у этих детей после лечения ( $2,3 \pm 0,2$  г/л- до лечения,  $3,2 \pm 0,2$  г/л - после лечения,  $p < 0,05$ ), достоверно снизился неизменный до лечения уровень интерферона альфа ( $3,1 \pm 0,04$  МЕ/мл- до лечения,  $2,6 \pm 0,06$  МЕ/мл - после лечения,  $p < 0,05$ ).

У детей группы сравнения после лечения была аналогичная динамика измененных до лечения иммунологических показателей за исключением того, что относительное количество CD38+ позитивных клеток не претерпевало достоверной динамики и снизилось неизменное до лечения количество CD21+ позитивных клеток ( $23,8 \pm 1,8\%$ - до лечения,  $16,9 \pm 1,4\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ). Следовательно, использование ликопида у детей в возрасте от 1 до 7 лет с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска и страдающих сопутствующей патологией вирусного и бактериального генеза оказывает модулирующий эффект на большинство иммунологических показателей.

У детей основной группы в возрасте от 7 до 14 лет с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска и страдающих сопутствующей патологией после лечения достоверно снизился исходно повышенный уровень фактора некроза опухолей, интерлейкинов 6,8 ( $p < 0,05$  везде), в то время как в группе сравнения достоверная динамика была у большинства исходно измененных показателей (относительное количество CD4+, CD8+, CD16+ -клеток, иммунорегуляторный индекс, уровень иммуноглобулинов класса М, интерферона гамма, фактора некроза опухоли, интерлейкинов 6,8;  $p < 0,05$  везде). У детей в возрасте от 7 до 14 лет наблюдается положительная динамика

лабораторных иммунологических показателей при механической элиминации вируса контагиозного моллюска, даже без применения ликопида. Различие иммунологических показателей после лечения с применением ликопида и без него у детей в возрасте от 7 до 14 лет с распространенными высыпаниями можно объяснить индивидуальными особенностями реагирования иммунной системы на разные виды лечебного вмешательства. Полученные данные у детей группы сравнения не противоречат данным других авторов о положительном влиянии на иммунологические показатели не только иммуностропных препаратов, но и других методов лечения, т.к. последние тоже снижают антигенную нагрузку на организм больных (Новиков А.И., 1997; Кубанова А.А., Резайкина А.В., Жилова М.Б., 2000, и др.).

У детей основной группы, с ограниченными высыпаниями контагиозного моллюска, достоверная положительная динамика исходно измененного показателя после лечения наблюдалась у детей в возрасте от 1 до 7 лет основной группы по одному параметру - повышение относительного количества уже повышенного до лечения CD38+ позитивных клеток ( $29,3 \pm 1,2\%$  - до лечения,  $33,5 \pm 1,5\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), а у детей в возрасте от 7 до 14 лет было достоверное повышение неизмененного до лечения уровня иммуноглобулинов класса М ( $0,4 \pm 0,3$  г/л - до лечения,  $1,2 \pm 0,13$  г/л - после лечения,  $p < 0,05$ ).

У детей группы сравнения с ограниченными высыпаниями контагиозного моллюска была динамика неизмененных до лечения показателей, а измененные - не претерпевали достоверной динамики. Так, у детей возрасте от 1 до 7 лет после лечения отмечалось достоверное повышение относительного количества CD21+ - клеток ( $18,0 \pm 2,3\%$  - до лечения,  $24,0 \pm 1,6\%$  - после лечения,  $p < 0,05$ ), уровня интерлейкина 6 ( $276 \pm 20$  пкг/мл - до лечения,  $467,0 \pm 39$  пкг/мл - после лечения,  $p < 0,05$ ) и снижение уровня IgG ( $12,6 \pm 1,3$  г/л - до лечения,  $9,6 \pm 0,8$  г/л - после лечения,  $p < 0,05$ ). У детей в возрасте от 7 до 14 лет после лечения не было достоверной динамики ни одного показателя.

Таким образом, у детей с ограниченными высыпаниями контагиозного моллюска после лечения, как в основной группе, так и в группе сравнения не было достоверно измененных до лечения иммунологических показателей, за исключением увеличения относительного количества CD38+ позитивных клеток (молодых клеток) у детей в возрасте от 1 до 7 лет основной группы. Выявленную динамику иммунологических показателей можно объяснить реакцией детской иммунной системы на любое вмешательство либо иммуностропным препаратом, либо механическим удалением элементов.

В результате проведенного лечения в основной группе были достигнуты положительные результаты. Полное отсутствие рецидивов после курса лечения - у 35 детей. У 10 детей наблюдались рецидивы заболевания через 3 недели после проведенной терапии, в виде единичных элементов контагиозного моллюска. В группе сравнения у 25 детей – полное отсутствие рецидивов, а у 10 детей наблюдались рецидивы в виде распространенных высыпаний. У больных, которым помимо удаления элементов контагиозного моллюска традиционными механическими методами, проводилось лечение иммуномодулятором ликолипидом положительный эффект, в виде отсутствия рецидивов, наблюдался чаще, чем в группе, где элементы контагиозного моллюска удаляли только механически. После проведенного курса лечения иммуномодулятором ликолипид отклонений в общем состоянии детей не отмечалось. При оценке показателей клинического анализа крови до и после курса лечения отрицательной динамики не регистрировалось.

Отдаленные результаты прослежены у 40 пациентов, получавших помимо традиционного удаления лечение иммуномодулятором ликолипид и у 30 больных группы сравнения. При этом оценивалось отсутствие или наличие рецидивов после курса лечения.

Через 1 месяца после окончания терапии отсутствие рецидивов наблюдалось у 35 пациентов основной группы и у 10 пациентов в группе сравнения ( $\chi^2 = 21,9$ ;  $p < 0,01$ ).

Через 3 месяца после окончания терапии отсутствие рецидивов наблюдалось у 35 пациентов основной группы и у 12 в группе сравнения ( $\chi^2 = 17,5; p < 0,01$ ).

Через 1 год после окончания терапии отсутствие рецидивов наблюдалось у 35 пациентов основной группы и у 12 в группе сравнения ( $\chi^2 = 17,5; p < 0,01$ ).

Таким образом, среди больных основной группы у значительно большего числа детей наступил положительный клинический эффект после курса лечения, достоверно уменьшилась частота рецидивов.

### **ВЫВОДЫ**

1. В результате обследования 80 детей в возрасте от 1 до 14 лет установлено, что у 60 (75%) из них рецидивы контагиозного моллюска возникают после частых ОРВИ, перенесенных гнойно-воспалительных заболеваний (отиты, ангины, пиелонефриты), детских инфекций (ветряная оспа, краснуха, скарлатина). Особенности течения контагиозного моллюска у детей в современных условиях являются наличие распространенных (от 10 до 50 элементов), нередко с экзематизацией (у 12,5%), атипичных высыпаний с частыми рецидивами, особенно в возрастной группе от 1 до 7 лет.
2. Разработан метод идентификации вируса контагиозного моллюска с использованием направленной амплификации видоспецифических фрагментов геномной ДНК, который подтверждает и повышает надежность диагноза заболевания.
3. С помощью электронной микроскопии изучены морфологические особенности вируса контагиозного моллюска. При этом установлено, что вирус, взятый из биопсийных проб от больных, относится к I подтипу вируса контагиозного моллюска.
4. У детей с распространенными высыпаниями контагиозного моллюска и страдающих частыми ОРВИ и другими заболеваниями вирусного и бактериального генеза наблюдается достоверное ( $P < 0,01$  везде) снижение относительного количества CD4 позитивных клеток и иммунорегуляторного

индекса, повышение – CD8+-, CD16+-, CD38+- клеток, уровня иммуноглобулинов (IgA, IgM), интерферона гамма, провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей альфа, интерлейкины 6,8), в то время как у детей с ограниченными высыпаниями содержание циркулирующих иммуноглобулинов и цитокинов определяется в пределах показателей лиц контрольной группы ( $P>0,05$ ).

5. Использование в терапии детей, больных контагиозным моллюском полусинтетического препарата микробного происхождения глюкозаминилмурамилдипептида (ликопида) после удаления высыпаний достоверно способствует исчезновению рецидивов заболевания ( $\chi^2=17,5$ ;  $p<0,01$ ) по сравнению с результатами лечения без применения этого препарата.

### **Практические рекомендации**

Результатом проведенного исследования является впервые разработанный в России метод направленной амплификации специфических фрагментов ДНК вируса контагиозного моллюска в полимеразной цепной реакции.

Определена тактика применения полусинтетического иммуномодулирующего препарата микробного происхождения ликопида у детей с распространенными высыпаниями элементов контагиозного моллюска, с часто рецидивирующим течением, особенно после перенесенных заболеваний бактериального и вирусного генеза.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1.Электронно-микроскопическая и молекулярно-биологическая диагностика вируса контагиозного моллюска/Кондрахина И.Н., Мазитова Л.П., Кузнецова Г.И., Бережной А.М., Зубов В.В.// Сборник тезисов 4-й Всероссийской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных заболеваний», М., 2002.- С.37

2.Инфицирование детей вирусом простого герпеса - значимый фактор развития контагиозного моллюска/Мазитова Л.П., Кондрахина И.Н.//Материалы



Всероссийской конференции «Современные проблемы детской дерматовенерологии и микологии», М.,2002.-С.20-21

3.Современное состояние изучения возбудителя дерматотропного вируса Molitor Hominis, вызывающего заболевание контагиозный моллюск (эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение)/ Мазитова Л.П., Кондрахина И.Н., Борисевич С.В., Логинова С.В., Хамитов Р.А., Меркулов В.А.// Труды 1-го съезда военных врачей медико-профилактического профиля Вооруженных сил Российской Федерации «Военная профилактическая медицина. Проблемы и перспективы», Санкт-Петербург, 2002.-С.296-297

4.Современные аспекты патогенеза и лечения контагиозного моллюска у детей/ Мазитова Л.П., Кондрахина И.Н.// Вестник дерматологии и венерологии.-2002.- № 5- С.12-14