

О.В.Малецкая<sup>1</sup>, С.А.Щербакова<sup>2</sup>, А.П.Бейер<sup>1</sup>, Т.В.Таран<sup>1</sup>, Б.А.Хапаев<sup>1</sup>, Д.М.Бамматов<sup>3</sup>,  
Г.А.-Х.Муртазалиева<sup>3</sup>, Н.Ф.Василенко<sup>1</sup>, И.Н.Шарова<sup>2</sup>, И.Г.Карнаухов<sup>2</sup>, А.Н.Куличенко<sup>1</sup>

## ПРИНЦИПЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКИ И СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

<sup>3</sup>ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция», Махачкала

Отмечено, что в последние годы по эпидемическим проявлениям Крымская геморрагическая лихорадка стала одной из наиболее актуальных инфекций на юге европейской части Российской Федерации, где расположен ее единый природный очаг. Проанализированы данные мониторинга КГЛ за 12-летний период (с 1999 г.). Определены основные эпидемиологические особенности этой инфекции в современный период. Представлены принципы разработки единого стандарта эпидемиологической и лабораторной диагностики. Отмечено, что дифференциация объемов и номенклатуры диагностических исследований в лабораториях разного уровня позволяет повысить их надежность и качество, проводить верификацию получаемых результатов.

**Ключевые слова:** Крымская геморрагическая лихорадка, эпидемическая ситуация, эпидемиологическая и лабораторная диагностика, эпидемиологический сезон, эпидемиологический анализ, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, РНК, ПЦР, ИФА.

O.V.Maletskaia<sup>1</sup>, S.A.Shcherbakova<sup>2</sup>, A.P.Beyer<sup>1</sup>, T.V.Taran<sup>1</sup>, B.A.Khapaev<sup>1</sup>, D.M.Bammatov<sup>3</sup>,  
G.A.-Kh.Murtazalievaa<sup>3</sup>, N.F.Vasilenko<sup>1</sup>, I.N.Sharova<sup>2</sup>, I.G.Karnaukhov<sup>2</sup>, A.N.Kulichenko<sup>1</sup>

## Principles of Standardization of Crimean Hemorrhagic Fever Diagnostics and Its Present-Day Peculiarities in the Territory of the Russian Federation

<sup>1</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;

<sup>3</sup>Dagestanian Plague Control Station, Makhachkala

It is stated that due to epidemic manifestations Crimean hemorrhagic fever (CHF) has recently become one of the most pressing issues in the South of the European part of the Russian Federation, the area where its integrated natural focus is situated. In this respect, analyzed are the data on CHF monitoring over the past decade (since 1999); determined are the main epidemiological peculiarities of the infection in the modern period. Furthermore, outlined are the basic principles of development of the unified standard concerning epidemiological and laboratory diagnostics of the disease. Emphasized is the importance of differentiation in scope and nomenclature of diagnostic investigations in laboratory facilities of different echelons, which makes it possible to increase plausibility and quality of the surveys conducted, and carry out verification of the results obtained.

**Key words:** Crimean hemorrhagic fever, epidemiological situation, epidemiological and laboratory diagnostics, epidemiological season, epidemiological analysis, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, RNA, PCR, enzyme linked immunoassay (ELISA).

Вирусные геморрагические лихорадки в настоящее время представляют особую актуальность для национальных и международных систем здравоохранения. Регистрация новых очагов этих опасных инфекционных болезней, активные миграционные процессы с высоким риском заноса возбудителей инфекций на эндемичные территории, а также возможность использования вирусов в качестве биологического оружия усиливают остроту проблемы.

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – вирусная трансмиссивная природно-очаговая инфекция человека, вызываемая вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирусом ККГЛ), принадлежащим к роду *Nairovirus* семейства *Bunyaviridae*. Основным переносчиком вируса являются иксодовые клещи рода *Hyalomma*. КГЛ характеризуется широким географическим распространением, возникновением новых и активизацией ранее известных природных очагов, тяжестью течения и высоким уровнем летальности (до 80 %). Природные очаги КГЛ известны на обширной территории Европы, Азии и Африки. В Европе случаи заболевания КГЛ регистрируются в Албании, Болгарии, Греции, Венгрии, Косово, Югославии, Македонии, Португалии и на Украине.

В последние годы по эпидемическим проявлениям КГЛ стала одной из наиболее актуальных инфекций на юге европейской части Российской Федерации. Стремительное развитие эпидемической ситуации по КГЛ на Юге России, нарастающая угроза здоровью и жизни населения региона потребовали разработки мер по совершенствованию эпиднадзора за данной инфекцией, что, наряду с профилактическими мерами, предусматривает своевременное выявление случаев заболевания КГЛ, дифференциацию местных и заносных случаев инфекции. Лабораторная и эпидемиологическая диагностика инфекционной болезни с учетом рекомендаций ВОЗ должна осуществляться в соответствии с единым алгоритмом диагностики [4], что потребовало разработки принципов стандартного подхода к ее проведению.

Эпидемиологическая диагностика осуществляется путем анализа эпидемиологических данных, обобщения, определения их значения и взаимосвязи при сравнительном логическом исследовании. Принципы эпидемиологической диагностики инфекционной болезни основываются на знании ее основной эпидемиологической характеристики – количественных и качественных показателей эпидемиче-

ского процесса (уровень и динамика заболеваемости, распределение по территории и среди различных групп населения, механизмы, пути и факторы передачи инфекции) и факторов, их определяющих (компоненты паразитарной системы, экологические, социальные) [5]. Мониторинг КГЛ за 12 лет активного периода позволил суммировать полученные сведения и определить эпидемиологические особенности КГЛ на территории России в современных условиях.

Единый природный очаг КГЛ расположен на юге европейской части Российской Федерации на территории пяти субъектов Южного федерального округа (ЮФО) – Астраханская, Волгоградская, Ростовская области, Краснодарский край, Республика Калмыкия – и пяти субъектов Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) – Ставропольский край, Карачаево-Черкесская, Кабардино-Балкарская республики, Республики Ингушетия и Дагестан.

Состав иксодовых клещей, зараженных вирусом ККГЛ, на данной территории представлен 18 видами (таблица). Иксодиды распространены мозаично с доминированием некоторых видов в зависимости от погодных-климатических условий и ландшафтно-географических особенностей территорий.

Наибольшее количество видов вирусифорных клещей выявлено на территории Ставропольского края и Республики Дагестан (по десять видов). Обращает на себя внимание распространенность вирусифорных клещей *H. marginatum* на территории всех субъектов Российской Федерации, входящих в зону природной очаговости КГЛ.

Анализ территориального распределения больных КГЛ в Российской Федерации с 1999 г. свидетельствует о постепенном и значительном к настоящему времени расширении нозоареала КГЛ. Практически ежегодно до 2011 г. на территории ЮФО и СКФО выявлялись новые районы с эпидемическими проявлениями этой инфекции. Эпидемически активная

территория природного очага КГЛ, расположенного на Юге России, к настоящему времени равна около 290,8 тыс. км<sup>2</sup>, что составляет 49,4 % территории ЮФО и СКФО, и охватывает всю территорию Астраханской области, 25 районов Ставропольского края, 10 – Волгоградской области, 25 – Ростовской области, 11 – Республики Калмыкия, 11 – Республики Дагестан, 2 – Республики Ингушетия, 1 – Карачаево-Черкесской республики.

Анализ сезонных показателей динамики заболеваемости КГЛ в Российской Федерации, рассчитанный на основании суммации данных о количестве больных для каждого месяца за все годы рассматриваемого периода, показал, что первые больные КГЛ зарегистрированы в первой декаде апреля. Рост числа больных начинается со второй декады апреля, достигая своего максимума в третьей декаде мая. По декадам июня отмечается лишь незначительное снижение заболеваемости, но, в целом, за месяц суммарное количество больных является наибольшим. Индекс сезонности в этот период составляет 283 %, т.е. количество больных в июне примерно в 2,8 раза превышает средний годовой уровень заболеваемости. В июле наблюдается отчетливая тенденция к снижению заболеваемости (индекс сезонности составил 96 %). В августе, сентябре и октябре выявляются единичные случаи заболевания. Продолжительность эпидсезона на эндемичной территории Российской Федерации в среднем составляет (137,8±1,3) дня. Длительность сезонного подъема в среднем равна (65,1±1,4) дня. Продолжительность сезонного спада заболеваемости находится в пределах (65,8±1,2) дня.

Анализ распределения больных КГЛ (n=966) по путям и факторам передачи инфекции показал, что в подавляющем большинстве случаев заражение происходило при укусе клещом (59,6 % от общего числа больных), 10,5 % больных заразились при снятии и раздавливании клещей незащищенными руками.

Видовой состав иксодовых клещей, зараженных вирусом ККГЛ, на юге европейской части Российской Федерации

Виды клещей	Вирусифорные клещи в субъектах ЮФО и СКФО									
	Ставропольский край	Республика Калмыкия	Карачаево-Черкесская республика	Краснодарский край	Ростовская область	Республика Ингушетия	Республика Дагестан	Волгоградская область	Кабардино-Балкарская республика	Астраханская область
<i>Hyalomma marginatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhipicephalus rossicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Dermacentor marginatus</i>	+	+	+	+	+	+			+	
<i>Hyalomma scupense</i>	+	+	+				+			+
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	+	+					+			+
<i>Boophilus annulatus</i>	+			+		+	+		+	
<i>Ixodes ricinus</i>	+			+	+		+		+	
<i>Haemaphysalis punctata</i>	+		+	+	+					
<i>Dermacentor reticulatus</i>	+			+			+			
<i>Haemaphysalis parva</i>						+			+	
<i>Rhipicephalus turanicus</i>				+			+			
<i>Dermacentor niveus</i>		+							+	+
<i>Rhipicephalus bursa</i>	+						+			
<i>Hyalomma anatolicum</i>		+								
<i>Hyalomma detritum</i>							+			
<i>Rhipicephalus schulzei</i>										+
<i>Rhipicephalus pumilio</i>		+								
<i>Ixodes laguri</i>					+					

«Наползание» клеща отмечали 5,3 % больных КГЛ. Заболевание в результате контакта с больным КГЛ было установлено в 0,5 % случаев. В 24,1 % случаев путь передачи инфекции установить не удалось. Анализ таблиц сопряженности показал наличие статистически значимой связи между количеством больных КГЛ и путем передачи инфекции ( $p < 0,001$ ).

Анализ распределения больных КГЛ в Российской Федерации ( $n=577$ ) в зависимости от условий заражения показал, что большинство из них подвергались нападению клещей при уходе за сельскохозяйственными животными на частных подворьях (42,8 %). В меньшей степени, но практически с одинаковой частотой, люди заражались вирусом ККГЛ при уходе за сельскохозяйственными животными в общественном секторе, во время полевых работ и отдыха на природе (18,2, 18 и 16,1 % соответственно). Случаи заболевания среди лиц, подвергавшихся нападению клещей на пастбище при выпасе сельскохозяйственных животных, составили 4,7 %. Имело место заражение в ЛПУ при контакте с больным КГЛ (0,2 %).

Ведущим механизмом передачи возбудителя КГЛ является трансмиссивный с реализацией инокуляционного или контаминационного путей передачи инфекции при укусе зараженными клещами, при попадании слюны, гемолимфы на кожу рук и слизистые вследствие раздавливания инфицированных клещей, втирания экскрементов в кожу при их «наползании», а также при разрезании клещей (чаще сытых самок) во время стрижки животных, при удалении присосавшихся членистоногих с домашних животных (извлечение хоботка клеща с остатками слюны и участка кожи, являющихся наиболее опасным вирусосодержащим материалом). В отдельных случаях заражение человека может происходить при контактном и аспирационном механизмах передачи возбудителя КГЛ. При контакте с кровью и кровянистыми выделениями больного заражаются члены семьи, медицинские работники, больные, находящиеся в палате, и т.д. [3].

Несмотря на тот факт, что количество случаев заболевания КГЛ среди мужчин значительно превышает таковое у женщин, анализ таблиц сопряженности показал отсутствие существенной статистической связи между количеством больных КГЛ и полом ( $p > 0,05$ ). Установленная возрастная структура больных КГЛ подтверждает наиболее частые контакты с природными очагами людей трудоспособного возраста (от 20 до 60 лет), что определяет группу риска, средний возраст которой составил  $(41 \pm 0,7)$  лет. Анализ таблиц сопряженности показал наличие зависимости количества больных КГЛ от их возраста ( $p < 0,001$ ).

Распределение больных КГЛ по социально-профессиональным группам ( $n=964$ ) показало, что наибольший удельный вес больных отмечается среди неработающего населения, включая пенсионеров (46,7 %), в основном занимающегося содержанием и уходом за поголовьем сельскохозяйственных животных на частных подворьях или выращиванием сельскохозяйственных культур как на собственных приусадебных участках, так и на полях у частных

предпринимателей. Причем наибольшему риску заражения КГЛ подвержены безработные (34,6 %), так как они привлекаются к сезонным сельскохозяйственным работам, а также к периодическому уходу за животными по найму.

Заболеваемость сельского населения превышает заболеваемость городского в девять раз ( $p < 0,001$ ). Городские жители болеют в единичных случаях.

Таким образом, алгоритм эпидемиологической диагностики КГЛ включает определение причинно-следственных связей основных показателей эпидемиологического процесса КГЛ: пребывание в зоне природной очаговости КГЛ, сезон года, условия заражения, механизмы, пути и факторы передачи инфекции, принадлежность к группе риска, возраст больного, социально-профессиональная принадлежность, место проживания (город, сельская местность). Проведение двухфакторного дисперсионного анализа без повторений с целью определения наиболее влияющих факторов на количество больных КГЛ и оценку этого влияния на изменение уровня заболеваемости КГЛ на территории природного очага позволило установить, что наиболее значимыми факторами риска являются «профессиональная принадлежность», «возраст больного», «место проживания» и «условия заражения». Имеет значение также фактор риска «пребывание на эндемичной территории».

Проблема КГЛ на Юге России не теряет своей остроты на ближайшую перспективу, поэтому чрезвычайно важными остаются вопросы своевременной, качественной и надежной лабораторной диагностики болезни, для чего крайне необходимыми являются обязательная регламентация порядка проведения анализа в лабораториях разного уровня и разработка единого стандарта диагностики. Стандартизация лабораторной диагностики предусматривает рациональное оснащение лабораторий оборудованием, расходными материалами и диагностическими препаратами, позволит сократить время диагностики за счет уменьшения объемов исследований в лабораториях разных уровней, а главное обеспечит четкую дифференциацию всех этапов исследования в соответствии с правилами биологической безопасности. Исходя из этого и в соответствии с трехуровневой системой организации лабораторной диагностики инфекционных болезней в Российской Федерации, исследования проб биологического материала, собранного в ходе эпизоотологического обследования природного очага КГЛ, а также лабораторную диагностику КГЛ у людей согласно действующим нормативно-методическим документам [2] проводят ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации и противочумные учреждения, имеющие разрешение на работу с возбудителями II группы патогенности (опасности). При этом осуществляются детекция РНК вируса ККГЛ методом ПЦР, выявление антигена вируса ККГЛ и антител к нему с помощью ИФА с использованием диагностических препаратов, зарегистрированных в установленном порядке.

Материалом для исследования при обследовании

природных биотопов и животноводческих хозяйств служат иксодовые клещи, органы птиц и мелких млекопитающих (головной мозг, печень), пробы крови крупного и мелкого скота. Для выявления маркеров вируса ККГЛ в материале от людей используют: от больных – цельную кровь, плазму, сгусток крови, от трупа – секционный материал (печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг). Следует учитывать, что РНК вируса ККГЛ обнаруживается в крови больных с 1-х по 7-е сутки, иногда – до 14 сут от начала заболевания. Специфические антитела класса М (IgM) появляются на 5–7-й день, максимальные титры (1:20000 и более) выявляются на 2–3-й неделе, а к 90-м суткам IgM, как правило, обнаруживаются в невысоких титрах или не определяются совсем. Антитела класса G (IgG) появляются на 7–10-й день от начала заболевания, достигают пика к концу второго месяца, держатся в высоких титрах 6–8 мес. К концу первого года титр IgG снижается, и невысокие титры у некоторых больных сохраняются годами. У части больных к концу первого года IgG полностью исчезают из периферической крови.

Возможность экспресс-диагностики КГЛ методом ПЦР в первые дни заболевания является основой ранней диагностики болезни и, соответственно, своевременно начатого специфического лечения больных. Использование количественной ПЦР-диагностики позволяет не только выявить РНК вируса ККГЛ, но и установить уровень и продолжительность виремии при КГЛ. Целью серологического исследования являются ранняя диагностика КГЛ с выявлением вирусного антигена и IgM и подтверждение диагноза при четырехкратном и большем нарастании титра IgG в парных сыворотках крови.

Выявление РНК и/или антигена вируса ККГЛ в исследуемых образцах, взятых на ранних сроках заболевания (до 5–7-го дня), свидетельствует об инфицированности больных и в совокупности с данными эпидемиологического анамнеза, клинической картины и результатами клинической лабораторной диагностики может считаться основанием для постановки диагноза «КГЛ». При обнаружении IgM в титре 1:800 и более и IgG в любом титре диагноз «КГЛ» считается подтвержденным [2].

Выделение вируса ККГЛ осуществляется в специализированных вирусологических лабораториях, имеющих разрешение на работу с вирусами II группы патогенности. Для выделения вируса используют биопробных животных – 1–2-дневных сосунков белых мышей или клеточные линии Vero-E6, SW-13 и др.

Лаборатории референс-центра мониторинга КГЛ проводят генотипирование изолятов вируса ККГЛ методом прямого секвенирования, что становится ключевым элементом мониторинга циркуляции известных и заноса новых штаммов вируса ККГЛ на территории Российской Федерации, а также решения вопроса о возможных эпидемиологических и клинических отличиях КГЛ в России и Европе от КГЛ, регистрируемой в республиках Средней Азии, в Китае, на Ближнем Востоке и в Африке, где распространены

штаммы вируса ККГЛ других генетических линий [1]. В референс-центре, наряду с зарегистрированными тест-системами, возможно использование экспериментальных серий препаратов.

Изолированные штаммы вирусов передаются в Национальный центр верификации диагностической деятельности, выполняющий функции Государственной коллекции микроорганизмов, где осуществляют всестороннее изучение выделенных штаммов с помощью иммуносерологических и молекулярно-генетических методов.

Дифференциация объемов и номенклатуры диагностических исследований в лабораториях разного уровня позволит проводить верификацию получаемых результатов и повысить надежность и качество проводимых диагностических исследований.

Часть материалов, представленных в статье, получены в ходе выполнения государственного контракта № 67-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы) в 2011 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карань Л.С., Платонов А.Е., Смирнова С.Е. и др. Генетические исследования при КГЛ: от диагностики до молекулярной эпидемиологии. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: ЗАО «Гриф и К»; 2007. С. 57–61.
2. Методические указания «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки». МУ 3.1.1.2488-09.
3. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.; 2005. 320 с.
4. Топорков А.В., Кологоров А.И., Топорков В.П., Щербаклова С.А., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С. и др. Принципы стандартизации эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, новых и возвращающихся инфекционных болезней. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107): 62–5.
5. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: «Медицина»; 2001. 560 с.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Karan' L.S., Platonov A.E., Smirnova S.E. et al. [Genetic investigations in case of Crimean hemorrhagic fever (CHF): from diagnostics to molecular epidemiology]. In: [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.: ZAO Grif&Co: 2007. P. 57–61.
2. Methodic Regulations [Organization and implementation of the preventive and anti-epidemic measures against Crimean hemorrhagic fever]. MR 3.1.1.2488-09.
3. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Beyer A.P. [Crimean Hemorrhagic Fever]. M.: 2005. 320 p.
4. Toporkov A.V., Kologorov A.I., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S. et al. [Principles of standardization of epidemiological and laboratory diagnostics of particularly dangerous, emerging and re-emerging infectious diseases]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:62–5.
5. Cherkassky B.L. [Guidelines on General Epidemiology]. M.: Meditsina; 2001. 560 p.

#### Authors:

Maletskaya O.V., Beyer A.P., Taran T.V., Khapaev B.A., Vasilenko N.F., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru  
 Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Karnaukhov I.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru  
 Bammatov D.M., Murtazaliev G.A.-Kh. Dagestanian Plague Control Station. 13, 5th Zhilgorodok, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367015, Russia. E-mail: dag\_chum@bk.ru

#### Об авторах:

Малецкая О.В., Бейер А.П., Таран Т.В., Хапаев Б.А., Василенко Н.Ф., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru  
 Щербаклова С.А., Шарова И.Н., Карнаухов И.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru  
 Бамматов Д.М., Муртазалиева Г.А.-Х. Дагестанская противочумная станция. 367015, Махачкала, 5-й жилгородок, 13. E-mail: dag\_chum@bk.ru

Поступила 11.03.12.