

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал
Выходит четыре раза в год
Основан в 1968 году

Главный редактор академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор **В.В.Кутырев**

*Журнал входит в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий,
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени доктора и кандидата наук*

Выпуск 2

2016

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.А.Бугоркова, докт. мед. наук
З.Л.Девдариани, докт. мед. наук, профессор
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук
Т.Б.Караваева (отв. секретарь), канд. мед. наук
Е.В.Куклев, докт. мед. наук, профессор
Н.И.Микшис, докт. мед. наук
М.Н.Ляпин, канд. мед. наук
А.В.Осин, канд. биол. наук
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор
С.А.Щербакова, докт. биол. наук
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск)
В.Е.Безмертный, канд. мед. наук (Москва)
В.П.Бондарев, докт. мед. наук, профессор (Москва)
С.В.Борисевич, докт. биол. наук, профессор (Сергиев Посад)
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, член-корр. РАН (Оболensk)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, академик РАН (Саратов)
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
В.Л.Мотин, профессор (Галвестон, США)
Г.Г.Онищенко, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
А.В.Ракин, канд. биол. наук (Мюнхен, Германия)
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
М.Скурник, профессор (Хельсинки, Финляндия)
А.В.Топорков, докт. мед. наук (Волгоград)

Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ, индексируется в Российском Индексе Научного Цитирования (РИНЦ) и размещен в Электронной научной библиотеке. Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 2016

2016, Issue 2

Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]

Scientific and Practical Journal
Issued quarterly. Founded in 1968

Problems of Particularly Dangerous Infections is published by Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Editor-in-Chief

Kutyrev V.V., Member of the RAS,
Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Board

Bugorkova S.A., Doctor of Medical Science
Devdariani Z.L., Doctor of Medical Science, Professor
Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science
Karavaeva T.B. (executive secretary), Candidate of Medical Science
Kouklev E.V., Doctor of Medical Science, Professor
Mikshis N.I., Doctor of Medical Science
Lyapin M.N., Candidate of Medical Science
Osin A.V., Candidate of Biological Science
Popov N.V., Doctor of Biological Science, Professor
Popov Yu. A., Doctor of Biological Science, Professor
Sayapina L.V., Doctor of Medical Science
Smirnova N.I., Doctor of Biological Science, Professor
Toporkov V.P., Doctor of Medical Science, Professor
Shcherbakova S.A., Doctor of Biological Science
Shchukovskaya T.N., Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Council

Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)
Bezsmertny V.E., Candidate of Medical Science (Moscow)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)
Borisevich S.V., Doctor of Biological Science, Professor (Sergiev Possad)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Corresponding Member of the RAS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
Kutyrev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Saratov)
L'vov D.K., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Motin V. L., Ph. D., Professor (Galveston, USA)
Onishchenko G. G., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Rakin A.V., Ph. D. (Munich, Germany)
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Skurnik M., Professor (Helsinki, Finland)
Toporkov A.V., Doctor of Medical Science (Volgograd)

Editorial Office Address:

46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation
Tel +7(845-2) 51-82-22. Fax +7(845-2) 51-52-12
E-mail: jour@microbe.ru
http://journal.microbe.ru

Подписной индекс в каталогах «Почта России» – 24687, «Пресса России» – 29448

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-35894

Адрес редакции: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: jour@microbe.ru. Сайт: http://journal.microbe.ru

Зав. редакцией Л.С.Пронина. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. 2016. Вып. 2. 1–110

Редакторы Е.С.Герасимова, Т.А.Поршакова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваевой, А.П.Рыжовой

Подписано в печать 07.06.16. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,5. Гарнитура Таймс. Заказ 583
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Обзоры

- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Тохов Ю.М., Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Шпак И.М., Бородай Н.В. Обеспечение эпидемиологического надзора и профилактики лихорадки Зика в Российской Федерации 5
- Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. 11
- Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире 14
- Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н. Сибирская язва: эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация в 2015 г., прогноз на 2016 г. 24
- Семакова А.П., Микшис Н.И. Адьювантные технологии в создании современных вакцин 28

Эпидемиология

- Буравцева Н.П., Мезентцев В.М., Рязанова А.Г., Антюганов С.Н., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Цыганкова О.И., Варфоломеева Н.Г., Аксёнова Л.Ю. Эпизоотолого-эпидемиологическая характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в Ставропольском крае и СКФО 36
- Иванова А.В., Сафронов В.А., Степанов Е.Г., Мочалкин П.А., Попов Н.В. Выявление территорий высокого риска заражения ГЛПС в Республике Башкортостан с применением ГИС-технологий 40
- Карнаухов И.Г., Шарова И.Н., Казакова Е.С., Морозов К.М., Щербаклова С.А., Кутырев В.В. Основные принципы создания мобильных лабораторий на базе автошасси для индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней 45
- Кириллов В.Б., Кириллова С.Л., Борисевич С.В. Прогнозирование последствий смоделированной вспышки гриппа А(Н7N9) на территории Российской Федерации 50
- Князева Т.В., Пяташина М.А., Зиятдинов В.Б., Хакимзянова М.В., Садреева Л.Ф., Гайнуллин А.А., Сайфуллина Г.Ш., Янтыкова Ю.Н., Губаева Д.Р., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В. Современное состояние природных очагов опасных инфекционных болезней на территории Республики Татарстан 53
- Полухина А.Н., Попов В.П., Орлов Д.С., Царук Е.В., Гильденскиольд О.А., Попов Н.В. Применение ГИС-технологий для выявления районов с разной степенью потенциальной эпидемической опасности в природных очагах туляремии Московской области 59

Reviews

- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Tokhov Yu.M., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Shpak I.M., Boroday N.V. Provision of Epidemiological Surveillance and Prophylaxis of Zika Fever in the Russian Federation 5
- Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Rusanova D.V., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. Review of Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2015 and Prognosis for 2016 11
- Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V. Cholera Vibrios of nonO1/nonO139 Serogroups in Etiology of Acute Intestinal Infections: Current Situation in Russia and Around the World 14
- Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Kulichenko A.N. Anthrax: Epidemiological and Epizootiological Situation in 2015, Prognosis for 2016 24
- Semakova A.P., Mikshis N.I. Adjuvant Technologies in the Construction of Advanced Vaccines 28

Epidemiology

- Buravtseva N.P., Mezentshev V.M., Ryazanova A.G., Antyuganov S.N., Eremenko E.I., Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Aksenova L.Yu. Epizootiological-Epidemiological Characteristics of the Stationary Hazardous as regards Anthrax Areas in the Stavropol Territory and North Caucasian Federal District 36
- Ivanova A.V., Safronov V.A., Stepanov E.G., Mochalkin P.A., Popov N.V. Detection of Territories of High Risk HFRS Exposure in the Republic of Bashkortostan, Applying GIS-Technologies 40
- Karnaukhov I.G., Sharova I.N., Kazakova E.S., Morozov K.M., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Basic Principles of Construction of Mobile Truck-Mounted Laboratories for Indication and Identification of Infectious Disease Agents 45
- Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V. Forecasting of the After-Effects of A(H7N9) Modelled Outbreak in the Territory of the Russian Federation 50
- Knyazeva T.V., Patyashina M.A., Ziatdinov V.B., Khakimzyanova M.V., Sadreeva L.F., Gainullin A.A., Saifullina G.Sh., Yantykova Yu.N., Gubaeva D.R., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V. Current State of Natural Foci of Dangerous Infectious Diseases in the Territory of the Russian Federation 53
- Polukhina A.N., Popov V.P., Orlov D.S., Tsaruk E.V., Gil'denskiol'd O.A., Popov N.V. Application of GIS-Technologies for Identifying the Areas with Different Degree of Potential Hazard in Natural Tularemia Foci of the Moscow Region 59

Микробиология

Богачева Н.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В., Ерёмкин А.В. Разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Yersinia pseudotuberculosis* серогруппы I

Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Широков А.А., Буров А.М., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba sp.* в экспериментальных условиях

Носов Н.Ю., Оглодин Е.Г., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и сопредельных стран

Охупкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К. Метод ускоренной оценки эффективности антибактериальных препаратов при экспериментальном бруцеллезе

Сазанова Е.В., Куклев В.Е., Малукова Т.А., Куклева Л.М., Малахаева А.Н., Вахрушина Н.И. Характеристика молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя чумы, перспективных для использования в учебном процессе

Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Бурлакова О.С., Черепакхина И.Я., Балахнова В.В. Роль кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу, обусловленному гипоксией

Спицын А.Н., Уткин Д.В., Щербак Н.Е., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Касьян И.А., Германчук В.Г., Куклев В.Е. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов возбудителя чумы

Биотехнология, иммунология

Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина

Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Пономарева Т.С., Атшабар Б.Б., Жунусова Г.Б., Тугамбаев Т.И., Туружанова А.А., Закарян С.Б., Алымкулова З.Т. Разработка реагента для оценки начальной стадии иммунного ответа на живую чумную вакцину

Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций

Microbiology

Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Eremkin A.V. Development of Immune-Chromatographic Monoclonal Test-System for the Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, Serogroup I

Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Exploratory Study of the Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in the Cells of Soil-Inhabiting Ameba – *Acanthamoeba Sp.*

Nosov N.Yu., Oglodin E.G., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Medieval Biovar from Natural Plague Foci of the Russian Federation and Bordering Countries

Okhupkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K. Method of Accelerated Evaluation of Antimicrobial Preparation Efficacy against Experimental Brucellosis

Sazanova E.V., Kuklev V.E., Malyukova T.A., Kukleva L.M., Malakhaeva A.N., Vakhrushina N.I. Characteristics of Molecular-Genetic Properties of Plague Agent Strains – Promising for Application with Educational Purposes

Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Burlakova O.S., Cherepakchina I.Ya., Balakhnova V.V. The Role of Cadaverine in Cholera Vibrio Adaptation to Stress Conditions, Induced by Hypoxia

Spitsyn A.N., Utkin D.V., Shcherbakova N.E., Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Kas'yan I.A., Germenchuk V.G., Kuklev V.E. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains

Biotechnology, Immunology

Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. Experimental Substantiation of Cultural Technologies Introduction into Manufacturing of Anti-Rabies Immunoglobulin

Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Denisova T.G., Ponomareva T.S., Atshabar B.B., Zhunusova G.B., Tugambaev T.I., Turuzhanova A.A., Zakaryan S.B., Alymkulova Z.T. Development of a Reagent for Evaluation of Incipient Immune Response to the Live Plague Vaccine

Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. Current State of the Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections

А.Ю.Попова^{1,2}, Е.Б.Ежлова¹, Ю.В.Демина¹, А.Н.Куличенко³, В.М.Дубянский³, О.В.Малецкая³,
Л.И.Шапошникова³, Ю.М.Тохов³, А.В.Топорков⁴, Д.В.Викторов⁴, В.П.Смелянский⁴, К.В.Жуков⁴,
И.М.Шпак⁴, Н.В.Бородай⁴

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА И ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ЗИКА В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ²Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Российская Федерация;
³ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;
⁴ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Эпидемическое распространение лихорадки Зика послужило основанием для объявления Всемирной организацией здравоохранения чрезвычайной ситуации в области международного здравоохранения. Для России основные риски связаны с заносом инфекции лицами, заразившимися на эпидемиологически неблагополучной территории, или завозом транспортными средствами международного сообщения инфицированных вирусом Зика переносчиков. В связи с этим разработан и нормативно регламентирован комплекс мероприятий по профилактике болезни, вызываемой вирусом Зика, включающий меры по предотвращению заноса инфекции с энзоотических территорий, мониторинг распространения переносчиков вируса *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, порядок дезинфекционных мероприятий. Разработан и внедрен в практику отечественный препарат для лабораторной диагностики и детекции РНК вируса Зика методом ПЦР. В статье рассматриваются вопросы возможного распространения переносчиков болезни в южных регионах России в связи с потеплением климата. Делается заключение, что в настоящее время вероятность локальной передачи вируса Зика в цикле «человек–комар» крайне мала и осложненной эпидемиологической ситуации по арбовирусным инфекциям, передаваемым *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, не ожидается.

Ключевые слова: лихорадка Зика, профилактика, переносчики, диагностика.

Корреспондирующий автор: Дубянский Владимир Маркович, e-mail: dvmplague@rambler.ru.

A.Yu.Popova^{1,2}, E.B.Ezhlova¹, Yu.V.Demina¹, A.N.Kulichenko³, V.M.Dubyansky³, O.V.Maletskaia³,
L.I.Shaposhnikova³, Yu.M.Tokhov³, A.V.Toporkov⁴, D.V.Viktorov⁴, V.P.Smelyansky⁴, K.V.Zhukov⁴, I.M.Shpak⁴,
N.V.Boroday⁴

Provision of Epidemiological Surveillance and Prophylaxis of Zika Fever in the Russian Federation

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;
²Russian Medical Academy for Post-Graduate Training, Moscow, Russian Federation; ³Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ⁴Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Epidemic outbreak of Zika fever has given WHO authority to declare emergency situation in the sphere of international health-care. Major risks for the Russian Federation are associated with the import of the disease by persons, infected in epidemiologically hazardous territory, or import of Zika virus vectors by transport means of international traffic. In this context, developed and normatively regimented is the complex of measures aimed at prevention of Zika virus disease, comprising activities to control import of the infection from enzootic territories, monitoring over the vectors of virus, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, and procedure for disinfection operations. Developed and introduced into practice is a home-made preparation for laboratory diagnostics and detection of Zika virus RNA using PCR. The article covers the issue of possible dissemination of the vectors in southern regions of Russia in view of climate warming. It is concluded that nowadays probability of local Zika virus transmission in “human-mosquito” cycle is extremely low and no complications of epidemiological situation on arboviral *Ae. aegypti*- and *Ae. albopictus*-borne infections are predicted.

Key words: Zika fever, prophylaxis, vectors, diagnostics.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Vladimir M. Dubyansky, e-mail: dvmplague@rambler.ru.

Citation: Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Dubyansky V.M., Maletskaia O.V., Shaposhnikova L.I., Tokhov Yu.M., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Shpak I.M., Boroday N.V. Provision of Epidemiological Surveillance and Prophylaxis of Zika Fever in the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:5–10. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-5-10

Масштабная вспышка болезни, вызванной вирусом Зика (ZIKV), в странах Северной, Центральной, Южной Америки, Карибского и Тихоокеанского регионов представляет собой проблему для международного здравоохранения. Эпидемическое распространение лихорадки Зика, наблюдающееся с начала 2015 г., в настоящее время охватило уже 31 страну.

По данным Панамериканской организации здравоохранения (Pan American Health Organization, PAHO, www.paho.org), с начала 2015 г. по февраль 2016 г. выявлено более 130000 случаев заболевания с клинической картиной, характерной для этой инфекции [16]. Наиболее неблагоприятная эпидемическая ситуация по лихорадке Зика в настоящее время складыва-

ется в Бразилии, Колумбии, Сальвадоре, Венесуэле, Суринаме, Мартинике. Также за период 2014–2016 гг. в мире зарегистрировано более 200 завозных случаев лихорадки Зика [17], в том числе один в Российскую Федерацию из Доминиканской Республики.

Складывающаяся ситуация послужила основанием для объявления Всемирной организацией здравоохранения чрезвычайной ситуации в области международного здравоохранения в связи с лихорадкой Зика [7] и необходимости реализации целого комплекса организационных и практических мер по оказанию поддержки странам, эпидемиологически неблагополучным по лихорадке Зика. ВОЗ и ее региональными представительствами разработан ряд методических документов по вопросам надзора за неврологическими расстройствами и врожденными аномалиями развития нервной системы, ассоциированными с лихорадкой Зика, лабораторной диагностики лихорадки Зика [6, 15], усилению сотрудничества государств-членов в целях совершенствования алгоритмов обнаружения, предотвращения и реагирования на вспышки инфекционных болезней, вызываемых арбовирусами, мерам борьбы и контроля за численностью комаров как основных переносчиков, предотвращению возможности передачи вируса Зика при переливании крови.

В Российской Федерации также разработан и реализуется комплекс мер, направленных на противодействие распространению болезни, вызванной вирусом Зика. Следует отметить, что основные риски связаны с заносом этой болезни в Россию лицами, заразившимися на эпидемиологически неблагополучной территории, или завозом транспортными средствами международного сообщения инфицированных вирусом Зика переносчиков возбудителя болезни.

Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 10.02.2016 № 14 «О мерах по недопущению распространения на территории Российской Федерации лихорадки Зика» определены первоочередные меры в рамках санитарной охраны территории страны от возможного завоза и распространения лихорадки Зика, включающие комплекс рекомендаций в части предупреждения распространения и профилактики, методического обеспечения готовности медицинских организаций к диагностике лихорадки Зика и оказания медицинской помощи больным, обеспечения безопасности донорской крови и ее компонентов, актуализации нормативных и методических документов, касающихся дезинфекционных и дезинсекционных мероприятий, информирования о рисках при посещении стран, неблагополучных по лихорадке Зика, и мерах профилактики заболевания.

В целях реализации положений Постановления Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 10.02.2016 г. утвержден План мероприятий по недопущению завоза и распространения лихорадки Зика на территории Российской Федерации. Среди основных организационных мер предусмотрены

организация информационно-аналитического мониторинга развития эпидемиологической ситуации по лихорадке Зика в мире, прогнозно-аналитическая оценка возможного распространения и численности переносчиков вируса Зика в Российской Федерации, подготовка специалистов-энтомологов по вопросам организации и проведения эпизоотологического мониторинга за основными переносчиками вируса Зика, организация межведомственного взаимодействия по вопросам профилактики инфекции, а также международного взаимодействия по вопросам информационного обмена в рамках международных организаций, регионального партнерства и объединений государств.

Планом предусматривается актуализация комплексных мероприятий по санитарной охране территорий субъектов Российской Федерации с учетом эпидемиологической ситуации по лихорадке Зика в мире, организация и проведение дополнительных мероприятий по усилению санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации в отношении лиц и транспортных средств, прибывающих из неблагополучных по лихорадке Зика регионов, организация дезинсекционных обработок транспортных средств при обнаружении переносчиков возбудителей трансмиссивных вирусных лихорадок, немедленное информирование Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при регистрации случаев с подозрением на лихорадку Зика и проведение регламентированного комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по недопущению распространения опасных инфекционных болезней на территории Российской Федерации.

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека подготовлено и направлено информационное письмо для руководителей Управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации «О ситуации по лихорадке Зика и дополнительных противоэпидемических мерах», содержащее рекомендации по усилению мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и санитарной охраны территории Российской Федерации.

Также к настоящему времени разработаны и направлены для использования в работе рекомендации по отбору материала для исследования на наличие РНК вируса Зика и порядке его направления на исследование, где приведены способы забора, хранения и транспортировки биоматериала для дальнейшего исследования методом ПЦР. Важнейшим направлением реализации Постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 10.02.2016 г. № 14 и Плана мероприятий Роспотребнадзора по недопущению завоза и распространения лихорадки Зика на территории страны является обеспечение готовности к проведению лабораторных исследований

на лихорадку Зика и проведению углубленных вирусологических и молекулярно-генетических исследований возбудителя. Схема лабораторной диагностики лихорадки Зика аналогична диагностике других флавивирусных инфекций и основана на выделении вируса из биологического материала, обнаружении в нем маркеров ZIKV с помощью серологических и молекулярно-генетических тестов.

Основной лимитирующий фактор широкого использования серологических тестов при диагностике лихорадки Зика – выраженная перекрестная иммунореактивность сывороток больных в отношении родственных флавивирусов (денге, чикунгунья, японского энцефалита и др.) [11].

Важнейшее значение в постановке диагноза придается детекции РНК вируса в анализируемом образце с помощью ПЦР (ОТ-ПЦР). Этому методу ОТ-ПЦР на сегодняшний день отводится ведущая роль в диагностике лихорадки Зика в первую неделю заболевания. Вирус обнаруживается в биологических жидкостях больных лихорадкой Зика – в плазме и сыворотке крови (в первую неделю заболевания концентрация вируса в крови находится в диапазоне от 10^3 до $5 \cdot 10^5$ коп/мл), слюне (первая неделя заболевания), моче (с 3–5 до 10–15-го дня болезни), сперме (возможно обнаружение вируса в инкубационном периоде, а также позднее двух недель после выздоровления в концентрации от 10^7 коп/мл), грудном молоке. Следует отметить, что возможно выявление РНК вируса в слюне при отрицательных результатах исследования крови (до 20 %) и получение положительных результатов исследования крови при отрицательных результатах исследования слюны (до 10 %). В связи с этим на первой неделе болезни рекомендуется одновременное исследование проб слюны и крови от больных, подозрительных на заболевание лихорадкой Зика.

В настоящее время разработан и внедрен в практику отечественный препарат для лабораторной диагностики и детекции РНК вируса Зика методом ПЦР «АмплиСенс *Zika virus*-FL». Доступны несколько валидированных генодиагностических наборов зарубежного производства для детекции РНК вируса – RealStar *Zika Virus* RT-PCR Kit 1.0 (Altona diagnostics GmbH, Германия), *Zika virus* ready-to-use PCR kit (Genekam Biotechnology AG, Германия), Liferiver *Zika Real Time* RT-PCRkit (LiferiverBio-Tech, США) и ряд других. Имеется также ряд перспективных отечественных разработок, предназначенных для лабораторной диагностики лихорадки Зика, среди которых средства иммунодетекции вируса в формате иммуночипов, набор реагентов для выявления специфических антител к вирусу Зика методом ТИФА.

Наряду с комплексом мер по санитарной охране территории Российской Федерации важная роль отводится организации систематического эпизоотологического мониторинга комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* – эффективных переносчиков вируса Зика и некоторых других опасных арбовирусов, прежде все-

го в регионах, где они были обнаружены в последние годы, а также на территориях, где возможно их распространение.

Специалистами Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И.Марциновского и ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ» комары *Ae. aegypti* были выявлены в причерноморской зоне Сочи на участках побережья от государственной границы с Республикой Абхазия до Туапсе. Территория возможного распространения этого комара охватывает участки вдоль черноморского побережья Краснодарского края до п. Джубги Туапсинского района и вглубь побережья до высоты Красной Поляны (538 м над уровнем моря). Комары *Ae. albopictus* зафиксированы на черноморском побережье Краснодарского края до п. Джубги и в п. Красная Поляна. На территории Республики Абхазия комары *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti* обнаружены на побережье от Сухума до российской границы [1, 2, 3].

Возможное распространение комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*. Согласно данным литературы [4, 5], ареал вида *Ae. albopictus* ограничивается территориями с изотермой января ($-1 \dots -3^\circ\text{C}$). Комары *Ae. aegypti* более теплолюбивые, ареал этого вида ограничен изотермой января 0°C . Еще один климатический фактор, ограничивающий распространение комаров, – среднегодовая сумма осадков не менее 450 мм. Кроме климатических факторов, важны индекс NDVI (normalized difference vegetation index), который используется для определения густоты покрытия территории растительностью (определяется с использованием методов дистанционного зондирования Земли из космоса), и плотность населенных пунктов [10]. NDVI является, с одной стороны, индикатором локальных показателей увлажненности, с другой – индикатором возможных мест выплода *Ae. albopictus* и, отчасти, *Ae. aegypti*, так как для густой растительности характерна повышенная влажность. Плотность населенных пунктов важна для прогноза распространения комаров, так как оба вида синантропны.

Многолетние наблюдения за расселением *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* показывают, что глобальное потепление климата является определяющим фактором для расширения их ареала [4, 5]. Заметное расширение ареала комаров данных видов произошло именно после 2000 г., когда климатические изменения стали наиболее заметны. Потепление климата имеет свои особенности на территории Российской Федерации в силу географического положения нашей страны. В частности, в России происходит более быстрое повышение средних температур, причем в основном в зимние месяцы, что позволяет успешно перезимовывать комарам этих видов. Прогнозные оценки, проведенные в 2013 г. [4, 5], позволяют определить области, которые станут пригодными для обитания комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* при глобальном потеплении на $1,5^\circ\text{C}$ по сравнению с периодом 1980–2000 гг. При условии сохранившейся тенденции потепления

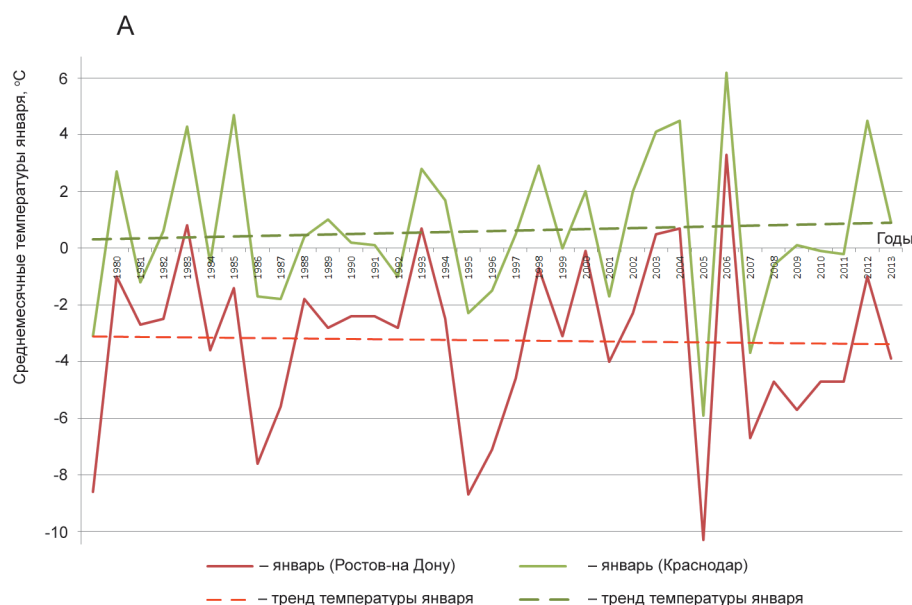
климата *Ae. aegypti* в будущем могут заселить большую часть территории Крыма и Дагестана, а *Ae. albopictus* – еще и территорию Украины, Беларуси и прилегающей к ним европейской части России.

В настоящее время возможно расселение *Ae. albopictus* на территории южного берега Крыма в районе городов-курортов Ялта и Алушта. На черноморском побережье Кавказа его дальнейшее распространение возможно до п. Кабардинка Геленджикского района.

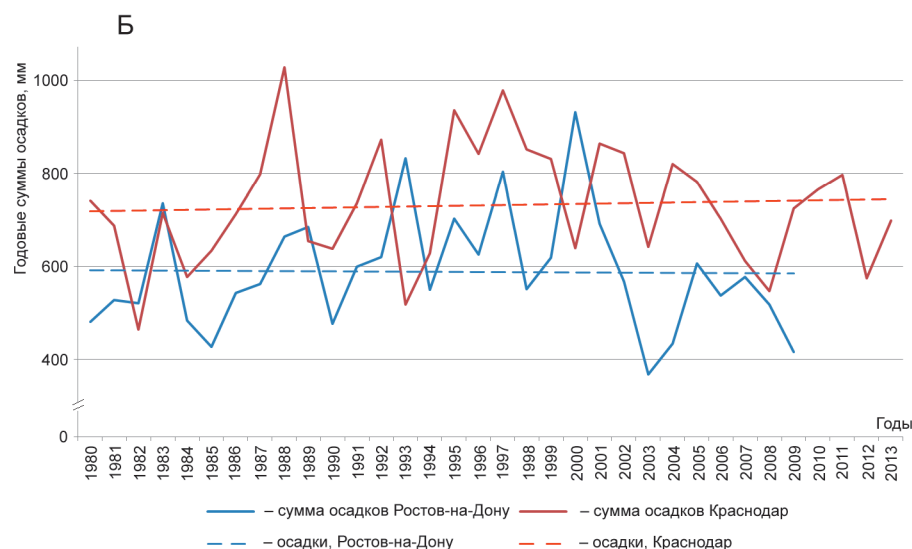
По данным метеостанции «Махачкала», среднегодовая температура с 2001 по 2014 год повысилась на $0,71^{\circ}\text{C}$ ($0,05^{\circ}\text{C}$ в год) при увеличивающемся среднегодовом количестве осадков. При сохраняющихся тенденциях благоприятные условия для расселения комаров в низменных и наиболее увлажненных районах Дагестана возможны через 15–17 лет. По данным метеостанций «Сочи», «Красная поляна», «Краснодар», «Ростов-на-Дону», «Армавир», «Ставрополь» к 2015 г. сложились подходящие климатические условия для расселения

комаров *Ae. aegypti* на черноморском побережье Кавказа, в Юго-Западных районах Краснодарского края. Среднемесячные температуры и суммы годовых осадков в последние годы были достаточны для выживаемости комаров. По всей территории Краснодарского края, за исключением высот более 700 м н.у.м., в настоящее время имеются благоприятные условия для существования *Ae. albopictus*. В то же время метеоусловия Ростовской области и Ставропольского края пока не благоприятны для размножения комаров этих видов (рисунок). Учитывая, что в Краснодарском крае города и поселки не интенсивно агрегированы, расселение комаров возможно в основном за счет завоза яиц и личинок с грузами из регионов, где эти комары уже обитают, что значительно снизит вероятность их распространения.

Температурные условия зимних месяцев на территории южного берега Крыма (ЮБК) в отдельные годы могут быть благоприятными для зимовки яиц комаров данных видов в случае завоза и размножения имаго в теплое время года. В то же время ми-



Среднемесячные температуры января (А), суммы осадков (Б) и многолетние тренды, по данным метеостанций «Краснодар» и «Ростов-на-Дону»



нимальным рекордом является температура зимы ($-10,2^{\circ}\text{C}$) в 2006 г. (Ялта). Основные территории полуострова – это типичные степные ландшафты с недостаточной для комаров данных видов влажностью. Следовательно, благоприятные условия для быстрого размножения, поддержания стабильной популяции на ЮБК и дальнейшего распространения комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на север по территории Крымского полуострова в настоящее время отсутствуют.

Следует обратить внимание, что еще в 30–50-х годах прошлого столетия *Ae. aegypti* обитали на черноморском побережье Кавказа и ЮБК [8]. При этом среднегодовая температура воздуха в Сочи в 1930–1950 гг. была на $0,63^{\circ}\text{C}$ ниже периода 2001–2014 гг.

Вероятно, расселение комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* не лимитируется полностью только указанными выше климатическими факторами.

В пользу вывода о крайне малой вероятности установления локальной передачи вируса в цикле «человек–комар» на территориях Российской Федерации говорят приведенные недавно сведения о динамике накопления флавивирусов в слюнных железах переносчиков и критичных для нее климатических факторах (среднесуточные температуры не ниже 25°C в течение большей части года, высокая влажность) [12].

Дополнительным свидетельством в пользу этой позиции является и тот факт, что и другие тропические флавивирусные лихорадки (денге, желтая и т.д.), переносчиками возбудителей которых являются комары рода *Aedes* тех же видов, в настоящее время на территории Российской Федерации не отмечены.

По направлению совершенствования дезинфекционных (дезинсекционных) мероприятий разработан ряд методических документов по вопросам защиты населения от переносчиков инфекции, мониторингу комаров и технологии дезинсекционных обработок объектов окружающей среды, дезинфекционных режимов медицинских организаций при поступлении больного (подозрительного на заболевание) лихорадкой Зика. Отдельное внимание в плане профилактических мероприятий в отношении лихорадки Зика уделяется проведению исследований по оценке чувствительности основных переносчиков заболевания к используемым дезинсектицидам (ларвицидам) и формированию на их основе рекомендуемых к применению перечней препаратов.

Установлено, что популяции *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* полностью восприимчивы к перитроидам. Согласно данным американских исследователей [13], в США встречаются популяции комаров *Ae. albopictus*, устойчивые к ДДТ, карбофосу, органофосфатам и к некоторым регуляторам роста насекомых. В Таиланде некоторые популяции *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* демонстрировали устойчивость к «Temephos» и перметрину. *Ae. aegypti* был более устойчивым, чем *Ae. albopictus* к обоим инсектицидам [14]. В Центральной Африке у отдельных популяций дан-

ных видов комаров обнаружена устойчивость к ДДТ и дельтаметрину. Однако в основной популяции были чувствительны к «Bti», «Temephos», ДДТ, дельтаметрину, фенитроотиону и пропоксуру [9].

Можно сделать заключение, что практически во всех частях света встречаются отдельные популяции *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, не чувствительные к определенным дезинсекционным препаратам. Поэтому в процессе проведения противокомариных обработок необходимо постоянно вести контроль их эффективности. Показаниями для проведения обработок являются наличие в открытых водоемах личинок комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* (единичные и более), наличие в подъездах домов окрыленных комаров (единичные и более). Критериями для оценки эффективности обработок являются отсутствие в открытых водоемах личинок комаров *Ae. aegypti* и отсутствие окрыленных комаров в местах учета. В случае, если обработка проведена по правилам, а эффективность низкая, можно подозревать устойчивость популяции к дезинсекционному препарату и провести ротацию пестицида.

Таким образом, принимая во внимание существующую угрозу заноса лихорадки Зика на территорию Российской Федерации, необходима реализация всего комплекса регламентированных мер санитарной охраны территории страны от распространения опасных инфекционных болезней, проведению адекватных мероприятий по профилактике лихорадки Зика, обеспечению готовности к проведению эффективной диагностики инфекции и обнаружению ее возбудителя в объектах окружающей среды, что позволит предотвратить эпидемиологические осложнения болезни на территории Российской Федерации. В то же время на основании анализа энтомологических данных и прогнозных показателей климатических условий на сезон весна–лето 2016 г. можно заключить, что осложнения эпидемиологической ситуации по арбовирусным инфекциям, передаваемым *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*, на территории Черноморского побережья Краснодарского края, южного берега Крыма и южной части каспийского побережья Республики Дагестан в предстоящий сезон не ожидается. В то же время в этих регионах необходим специализированный энтомологический мониторинг за комарами для выявления их возможного появления и уточнения лимитирующих экологических факторов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Ганушкина Л.А., Безжонова О.В., Патраман И.В., Таныгина Е.Ю., Сергиев В.П. Распространение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на Черноморском побережье Кавказа. *Мед. паразитол. и паразитар. бол.* 2013; 1:45–6.
2. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L., *Aedes albopictus* Skus. – новая биологическая угроза для юга России. *Мед. паразитол. и паразитар. бол.* 2012; 3:49–54.
3. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* на территории Российской Федерации.

clus Skus. на территории Российской Федерации. *Мед. паразитол. и паразитар. бол.* 2012; 1:3–4.

4. Попов И.О., Титкина С.Н., Семенов С.М., Ясюкевич В.В. Моделирование распространения переносчиков некоторых болезней человека в XXI веке в России и соседних странах. *Пробл. экол. мониторинга и моделирования экосистем.* 2013; 25:395–427.

5. Ясюкевич В.В., Титкина С.Н., Попов И.О., Давидович Е.А., Ясюкевич Н.В. Климатозависимые заболевания и членистоногие переносчики: возможное влияние наблюдаемого на территории России изменения климата. *Пробл. экол. мониторинга и моделирования экосистем.* 2013; 25:314–360.

6. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Interim guidance for laboratory detection and diagnosis [cited 04 Mar 2016]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=30176&Itemid=270.

7. Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005). WHO; 2016 [cited 20 Feb 2016]. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergencycommittee-zika/en/>.

8. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. 1989 [cited 20 Feb 2016] <http://apps.who.int/iris/handle/10665/60575>.

9. Kamgang B., Marcombe S., Chandre F., Nchoutpouen E., Nwane P., Etang J., Corbel V., Paupy C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors.* 2011; 4:79. DOI: 10.1186/1756-3305-4-79.

10. Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A., Mlyne A.Q.N., Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Bortel W.V., Hendrickx G., Schaffner F., Elyazar I.R.F., Teng H.-J., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.M., Scott T.W., Smith D.L., Wint G.R.W., Golding N., Hay S.I. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife.* 2015; 4:e08347. DOI: 10.7554/eLife.08347.

11. Lanciotti R.S., Kosoy O.L., Laven J.J., Velez J.O., Lambert A.J., Johnson A.J., Stanfield S.M., Duffy M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(8):1232–9. DOI: 10.3201/eid1408.080287.

12. Li M., Wong P.S., Ng L.C., Tan C.H. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(8):e1792. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001792.

13. Marcombe S., Farajollahi A., Healy S.P., Clark G.G., Fonseca D.M. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *PLOS One.* 2014; 9(7):e101992. DOI: 10.1371/journal.pone.0101992.

14. Ponlawat A., Scott J.G., Harrington L.C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J. Med. Entomol.* 2005; 42(5):821–5. DOI: 10.1093/jmedent/42.5.821.

15. Strategy for Enhancing National Capacity to Respond to Zika virus Epidemic in the Americas. PAHO; 3 February 2016. [cited 02.03.2016]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=33129&lang=fr.

16. Suspected and confirmed Zika cases reported by countries and territories in the Americas, 2015–2016. PAHO, WHO. [cited 02.03.2016]. Available from: http://ais.paho.org/phis/viz/ed_zika_epicurve.asp

17. Weekly epidemiological situation. European Centre for Disease Prevention and Control. Updated 26 February 2016 [cited 02.03.2016]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/zika-outbreak/Pages/epidemiological-situation.aspx.

References

- Ganushkina L.A., Bezzhonova O.V., Patraman I.V., Tanygina E.Yu., Sergiev V.P. [Dissemination of mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. across the Black Sea territories of Caucasus]. *Med. Parazit. Parazitarn. Bol.* 2013; 1:45–6.
- Ganushkina L.A., Dremova V.P. [Mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* Skus. – new biological threat to the South of Russia]. *Med. Parazit. Parazitarn. Bol.* 2012; 3:49–54.
- Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. [Concerning detection of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. in the territory of the Russian Federation]. *Med. Parazit. Parazitarn. Bol.* 2012; 1:3–4.
- Popov I.O., Titkina S.N., Semenov S.M., Yasyukevich V.V. [Modeled estimates for dissemination of vectors of certain human diseases in the XXI century in Russia and neighboring states]. *Probl. Ekologich. Monitoringa i Modelir. Ekosistem.* 2013; 25: 395–427.
- Yasyukevich V.V., Titkina S.N., Popov I.O., Davidovich E.A., Yasyukevich N.V. [Climate-dependent diseases and arthropod vectors: possi-

ble impact of the witnessed in the Russian Federation climate change]. *Probl. Ekologich. Monitoringa i Modelir. Ekosistem.* 2013; 25: 314–360.

6. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas: Interim guidance for laboratory detection and diagnosis [cited 04 Mar 2016]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=30176&Itemid=270.

7. Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005). WHO; 2016 [cited 20 Feb 2016]. <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergencycommittee-zika/en/>.

8. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. 1989 [cited 20 Feb 2016] <http://apps.who.int/iris/handle/10665/60575>.

9. Kamgang B., Marcombe S., Chandre F., Nchoutpouen E., Nwane P., Etang J., Corbel V., Paupy C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites & Vectors.* 2011; 4:79. DOI: 10.1186/1756-3305-4-79.

10. Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A., Mlyne A.Q.N., Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Bortel W.V., Hendrickx G., Schaffner F., Elyazar I.R.F., Teng H.-J., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.M., Scott T.W., Smith D.L., Wint G.R.W., Golding N., Hay S.I. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *eLife.* 2015; 4:e08347. DOI: 10.7554/eLife.08347.

11. Lanciotti R.S., Kosoy O.L., Laven J.J., Velez J.O., Lambert A.J., Johnson A.J., Stanfield S.M., Duffy M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(8):1232–9. DOI: 10.3201/eid1408.080287.

12. Li M., Wong P.S., Ng L.C., Tan C.H. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(8):e1792. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001792.

13. Marcombe S., Farajollahi A., Healy S.P., Clark G.G., Fonseca D.M. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *PLOS One.* 2014; 9(7):e101992. DOI: 10.1371/journal.pone.0101992.

14. Ponlawat A., Scott J.G., Harrington L.C. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J. Med. Entomol.* 2005; 42(5):821–5. DOI: 10.1093/jmedent/42.5.821.

15. Strategy for Enhancing National Capacity to Respond to Zika virus Epidemic in the Americas. PAHO; 3 February 2016. [cited 02.03.2016]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=33129&lang=fr.

16. Suspected and confirmed Zika cases reported by countries and territories in the Americas, 2015–2016. PAHO, WHO. [cited 02.03.2016]. Available from: http://ais.paho.org/phis/viz/ed_zika_epicurve.asp

17. Weekly epidemiological situation. European Centre for Disease Prevention and Control. Updated 26 February 2016 [cited 02.03.2016]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/zika-outbreak/Pages/epidemiological-situation.aspx.

Authors:

Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy for Post-Graduate Training; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., Demina Yu.V. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.

Kulichenko A.N., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Tokhov Yu.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Shpak I.M., Boroday N.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия последипломного образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Куличенко А.Н., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Тохов Ю.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Шпак И.М., Бородай Н.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 28.03.16.

Пробл. особо опасных инф. 2016; 2:11–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-11-13

УДК 616.98:579.841.93(470)

Г.И.Лямкин, Д.Г.Пономаренко, А.А.Худолеев, Д.В.Русанова, С.В.Вилинская, А.Н.Куличенко

ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2015 г. И ПРОГНОЗ НА 2016 г.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Представлены данные анализа эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г., которая характеризуется как напряженная. В сравнении с 2014 г. (368 случаев, ИП – 0,26) отмечен рост количества заболевших бруцеллезом людей на 5,1 % (393 случая, ИП – 0,27). Наиболее высокий уровень заболеваемости людей регистрировался в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах, основным источником инфекции в которых является крупный и мелкий рогатый скот. Отмечается значительное увеличение случаев бруцеллеза в Ставропольском крае. Актуальными будут оставаться внешние эпидемиологические риски, связанные с активизацией сотрудничества в области поставок животноводческой продукции из стран Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота. Учитывая стабильно сохраняющуюся напряженную эпидемиологическую и эпизоотологическую обстановку, с учетом внутренних и внешних рисков инфицирования бруцеллезом, в 2016 г. прогнозируется уровень заболеваемости людей бруцеллезом в пределах 390–420 случаев.

Ключевые слова: бруцеллез, заболеваемость, эпидемические проявления, эпизоотический процесс.

Корреспондирующий автор: Лямкин Геннадий Иванович, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

G.I.Lyamkin, D.G.Ponomarenko, A.A.Khudoleev, D.V.Rusanova, S.V.Vilinskaya, A.N.Kulichenko

Review of Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2015 and Prognosis for 2016

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Given are the results of assessment of epidemiological and epizootiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2015. It is characterized as challenging. Compared to 2014 (368 cases, intensive index – 0.26), recorded is 5.1 % increase in the number of people infected with brucellosis (393 cases, intensive index – 0.27). The highest incidence rates among the population are registered in the North-Caucasian, Southern and Siberian Federal Districts, where the main source of infection is cattle and small ruminants. Revealed is a significant rise in brucellosis incidence in the Stavropol region too. External epidemiological risks, associated with the intensification of cooperation in the supply of livestock products from the Mediterranean countries, Middle East, and South America, which are endemic as regards cattle brucellosis, will remain pressing. Given the sustained adverse epidemiological and epizootic situation, taking into account the internal and external risks of infection with brucellosis, brucellosis incidence among the population is predicted to be within the range of 390–420 cases.

Keywords: brucellosis, incidence, epidemic manifestations, epizootic process

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Gennady I. Liyamin, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Rusanova D.V., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. Review of Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2015 and Prognosis for 2016. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:11–13. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-11-13

Экспертная оценка эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации (РФ) проведена на основе анализа официальных статистических данных Роспотребнадзора и Россельхознадзора о заболеваемости бруцеллезом людей и сельскохозяйственных животных [1, 3], анализа материалов и сообщений, представленных в специальной научной и периодической печати по вопросам бруцеллеза сельскохозяйственных животных и людей в РФ, данных эпидемиологического расследования случаев заболевания бруцеллезом, полученных Референс-центром по мониторингу за возбудителем бруцеллеза из Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ, а также обобщенных Федеральным центром гигиены и эпидемиологии сведений по заболеваемости бруцеллезом в разрезе субъектов Российской Федерации.

В 2015 г. в РФ сохранялась напряженная эпи-

демиологическая обстановка по бруцеллезу, зарегистрировано 393 случая заболевания людей. После существенного снижения заболеваемости в 2013 г., в последние два года прослеживается тенденция к ежегодному увеличению количества случаев впервые выявленного бруцеллеза у людей (рис. 1) [2].

Основная часть больных людей регистрировалась на территории трех федеральных округов: Северо-Кавказского (СКФО), Сибирского (СФО) и Южного (ЮФО).

В СКФО было зарегистрировано 267 случаев заболевания людей бруцеллезом (ИП – 2,77), из которых основное количество заболевших пришлось на Республику Дагестан, где зарегистрировано 140 случаев впервые выявленного бруцеллеза (ИП – 4,7), в 2014 г. – 144 случая (ИП – 4,9). Восемьдесят процентов заболевших в республике составляют жители сельской местности (112 чел.), которые заболели в

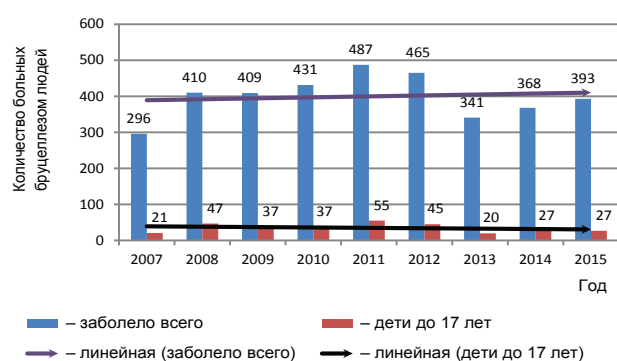


Рис. 1. Динамика количества заболевших бруцеллезом людей в Российской Федерации в 2007–2015 гг. (абсолютные цифры)

период с мая по сентябрь с максимумом в августе – 32 случая (22,8 %). Зарегистрировано 12 случаев заболевания бруцеллезом у лиц в возрасте до 17 лет (ИП – 1,36), что составляет 40 % от общероссийских показателей заболеваемости бруцеллезом среди детей. Наиболее неблагоприятные административные территории республики – Цумадинский район и город Махачкала. По данным эпидемиологического расследования, было установлено, что в 37,1 % случаев источником инфекции был мелкий (МРС), в 26,4 % – крупный рогатый скот (КРС), инфицированные возбудителем бруцеллеза, в 36,5 % – источник не выявлен. Из установленных факторов передачи инфекции в 42 случаях были продукты животноводства (молоко, кисло-молочные продукты, мясные продукты), в 38 – сырье животного происхождения. В 89 случаях путь передачи инфекции был контактный, в 42 – алиментарный.

В 2015 г. в Ставропольском крае отмечено существенное увеличение случаев заболевания бруцеллезом (118 случаев, ИП – 4,22), что на 55 % больше, чем в 2014 г. (76 случаев, ИП – 2,73). Среди заболевших 96 человек (81,3 %) – жители сельской местности, 22 – представители городского населения. В ходе эпидемиологического расследования установлено, что из 118 заболевших 26 – профессионально связаны с животноводством, 13 – индивидуальные владельцы скота. Источниками инфекции в 26 случаях был КРС, в 2 случаях – МРС, в 90 случаях источник инфекции не установлен. Превалировал алиментарный путь передачи возбудителя бруцеллеза (55 случаев, 46,6 %), при этом факторами передачи инфекции были продукты животного происхождения (молоко, кисло-молочные продукты, мясные продукты). Наиболее неблагоприятными по бруцеллезу людей административными районами края являются: Левокумский (18 случаев), Нефтекумский (16 случаев), Курской (13 случаев). Эти территории имеют общую границу с Республикой Дагестан и Республикой Калмыкия, в которых регистрируется самая высокая в Российской Федерации заболеваемость людей бруцеллезом.

В других административных субъектах СКФО зарегистрирована спорадическая заболеваемость людей бруцеллезом: Чеченская Республика – 6 случаев (ИП – 0,44), Кабардино-Балкарская Республика – 2

случая (0,23), Республика Северная Осетия-Алания – 1 случай (ИП – 0,14).

В ЮФО выявлено 33 случая заболевания людей бруцеллезом (ИП – 0,24). Большая часть заболевших зарегистрирована в Республике Калмыкия (17 случаев, ИП – 6,04) и Волгоградской области (10 случаев, ИП – 0,39). В остальных субъектах ЮФО регистрировалась спорадическая заболеваемость. Более чем в 70 % случаев источником бруцеллезной инфекции являлся КРС.

В СФО зарегистрировано 46 человек, заболевших бруцеллезом: в Республике Тыва – 11 случаев (ИП – 3,52), Новосибирской области – 11 случаев (ИП – 0,40), Забайкальском крае – 10 случаев (ИП – 0,92), Кемеровской области – 7 случаев (ИП – 0,26), Томской и Омской областях – по 3 случая (ИП – 0,28 и 0,15, соответственно) и 1 случай – в Красноярском крае. Источником бруцеллезной инфекции в 90 % случаев был КРС.

В Центральном федеральном округе зафиксирован 21 случай (ИП – 0,05) заболевания людей бруцеллезом, 6 случаев (ИП – 0,5) – в Москве, 8 (ИП – 0,11) – Московской области, 4 (ИП – 0,26) – Тульской области, 3 (ИП – 0,31) – Смоленской области. В большинстве случаев источник инфекции не установлен.

В остальных федеральных округах зарегистрирована спорадическая заболеваемость людей бруцеллезом: Уральском – 10 случаев (ИП – 0,08), Приволжском – 9 (ИП – 0,03), Северо-Западном – 4 (ИП – 0,03), Дальневосточном – 3 (ИП – 0,05). В Крымском федеральном округе бруцеллез не регистрировался. В большинстве случаев источник инфекции не установлен.

С целью установления видовой структуры циркулирующих возбудителей бруцеллеза на территории субъектов РФ проведено 3543 бактериологических исследования клинического материала от 2084 лиц, в том числе от 1524 больных и лиц с подозрением на заболевание, от 74 человек по эпидпоказаниям и 486 человек с профилактической целью. Возбудитель выявлен у 21 больного. Референс-центром по мониторингу за возбудителем бруцеллеза с использованием питательной среды для транспортировки и накопления бруцелл бактериологическим методом из клинического материала от больных бруцеллезом людей в Ставропольском крае изолировано 12 штаммов возбудителя бруцеллеза: *Brucella melitensis* – 8 штаммов (II биовар) *B. abortus* – 4 штамма (III биовар – 3 штамма, VI биовар – 1 штамм).

Масштабы эпидемических проявлений бруцеллеза закономерно связаны с уровнем заболеваемости сельскохозяйственных животных (КРС и МРС) в административных субъектах с развитым животноводством.

В период с 2010 по 2014 год в Российской Федерации отмечалось ежегодное увеличение количества новых неблагоприятных по бруцеллезу пунктов и больных сельскохозяйственных животных. По итогам 9 месяцев 2015 г. можно констатировать стабилизацию показателей эпизоотологического не-

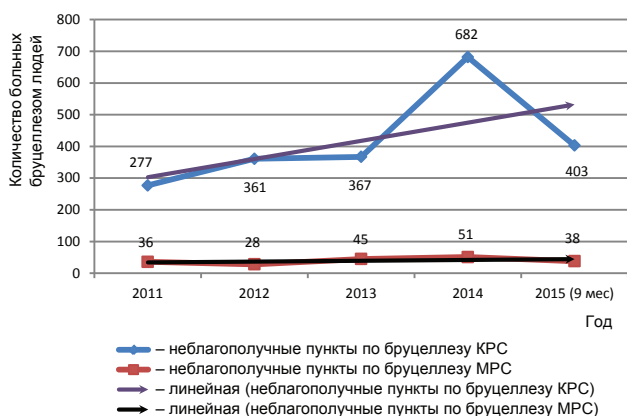


Рис. 2. Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС в Российской Федерации в 2011–2015 гг.

благополучия на уровне прошлого года (рис. 2 и 3).

В 2015 г. основное количество неблагополучных по бруцеллезу хозяйств и большого поголовья выявлено на территории СКФО, ЮФО, СФО и Приволжского федерального округа.

Экспертная оценка эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. позволяет констатировать сохраняющуюся напряженную эпизоотическую ситуацию, увеличение уровня заболеваемости людей бруцеллезом на фоне относительной стабилизации эпизоотологической обстановки по бруцеллезу сельскохозяйственных животных.

Стабилизирующее влияние на эпизоотолого-эпидемиологическую обстановку в приграничных с Республикой Казахстан административных субъектах оказало введение Россельхознадзором с июля 2015 г. временного ограничения на поставки в РФ из Казахстана овец и коз, молока и молочных продуктов в связи с возникновением оспы овец и коз на территории Казахстана.

Эпидемиологический прогноз на 2016 г. будет определяться совокупностью факторов, ключевым из которых остается неблагополучная эпизоотологическая обстановка по бруцеллезу в ряде субъектов СКФО и ЮФО. В условиях продолжения реализации региональных программ импортозамещения

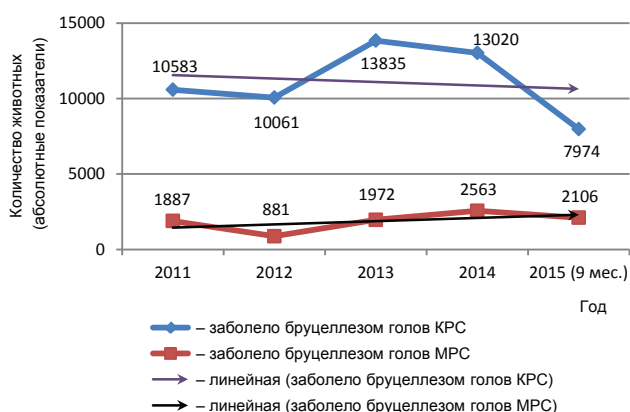


Рис. 3. Динамика заболеваемости бруцеллезом КРС и МРС в Российской Федерации в 2011–2015 гг.

в животноводческой отрасли сельского хозяйства, усиления интереса к развитию овцеводства и козоводства среди индивидуальных предпринимателей сохраняется высокая вероятность заноса возбудителя бруцеллеза с больными животными из неблагополучных административных территорий (Республика Дагестан, Калмыкия, Монголия, Казахстан) в благополучные по бруцеллезу регионы. Продолжает оставаться высокой вероятностью заражения населения возбудителем бруцеллеза в регионах, где постоянно регистрируются случаи несанкционированной торговли продукцией животноводства без ветеринарно-санитарных документов, оформленных в установленном порядке.

Актуальными будут оставаться внешние эпидемиологические риски, связанные с активизацией сотрудничества в области поставок животноводческой продукции из стран Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу КРС и МРС, а также планируемым созданием так называемых «зеленых коридоров» по линии таможенной и фитосанитарной служб для сельхозтоваров, проходящих через Махачкалинский и Астраханский морские порты.

С учетом вышеназванных факторов в 2016 г. прогнозируется уровень заболеваемости людей бруцеллезом в пределах 390–420 случаев.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2015 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. URL: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938 (дата обращения 20.02.2016).
2. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах-участниках Содружества Независимых Государств. *Инф. бол.: новости, мнения, обучение.* 2016; 1:68–74.
3. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. URL: <http://fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html> (дата обращения 09.03.2016).

References

1. [Infectious morbidity in the Russian Federation in January–December 2015. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare]. (Cited 20 Feb 2016). http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938.
2. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Vilinskaya S.V., Zaitsev A.A., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation and in the Commonwealth of Independent States]. *Infek. Bol.: Novosti, Mneniya, Obuch.* 2016; 1: 68–74.
3. [Epizootic situation in the Russian Federation. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance]. (Cited 11 Mar 2016). <http://fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html>

Authors:

Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 21.03.16.

Е.В.Монахова, И.В.Архангельская

ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП В ЭТИОЛОГИИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ: СОВРЕМЕННАЯ СИТУАЦИЯ В РОССИИ И В МИРЕ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону,
Российская Федерация

Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп (НАГ-вибрионы) широко известны как естественные обитатели открытых водоемов и как возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) различной степени тяжести. На фоне текущего стремительного распространения новых высоковирулентных штаммов *Vibrio cholerae* Эль Тор моральный и экономический ущерб, наносимый НАГ-вибрионами, не столь заметен, но, тем не менее, реален и достаточно значителен. Несмотря на редкую причастность к крупным вспышкам, НАГ-вибрионы занимают не последнее место в этиологии ОКИ во всем мире и представляют потенциальную угрозу здоровью населения нашей страны. В обзоре рассматривается современная ситуация по заболеваемости НАГ-инфекциями в разных странах, включая Россию, а также молекулярные основы патогенности и лекарственной устойчивости возбудителей. Анализ литературных данных выявил крайнюю гетерогенность популяций НАГ-вибрионов, циркулирующих на определенных территориях, по наличию/отсутствию детерминант факторов патогенности, персистенции, жизнеобеспечения и антибиотикорезистентности. Совокупный генофонд популяции представлен достаточно большим набором генов и может пополняться за счет заносов штаммов с отличными от имеющихся генотипами из других регионов. Отсюда вытекает опасность формирования клонов с повышенным патогенетическим, а возможно, и эпидемическим потенциалом за счет генетического обмена, и последствия их возникновения непредсказуемы. Поэтому НАГ-вибрионы требуют внимания со стороны исследователей и санэпидслужб Российской Федерации.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, НАГ-вибрионы, заболеваемость, факторы патогенности, антибиотикорезистентность, гетерогенность популяций.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: unicorn54@mail.ru.

E.V.Monakhova, I.V.Arkhangel'skaya

Cholera Vibrios of nonO1/nonO139 Serogroups in Etiology of Acute Intestinal Infections: Current Situation in Russia and Around the World

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups (NAG vibrios) are well known as natural inhabitants of aquatic environments and as agents of acute intestinal infections (AII) with different degree of severity. On the background of the current vehement dissemination of the new highly virulent *Vibrio cholerae* El Tor strains, the moral and economic damage from NAG vibrios is not that evident, but still, not less real and rather significant. In spite of rare association with large outbreaks, NAG vibrios rank in the etiology of AII all over the world and pose a potential threat for the population health in our country. The paper reviews the present-day morbidity as regards NAG infections in various countries, including Russia; as well as the molecular premises of the agents' pathogenicity and drug resistance. Analysis of the published data has revealed an utter heterogeneity of NAG populations, circulating in certain territories, by reference to the presence/absence of genetic determinants of pathogenicity, persistence, housekeeping and antibiotic resistance factors. Nevertheless, the joint gene-pool of the population includes rather a wide set of genes and can expand due to importations of strains, which differ from resident ones in the genotypes, from other regions. This brings about the danger of emergence of clones with higher pathogenic and, probably, even epidemic potential driven by gene exchange, and the consequences of their occurrence are unpredictable. Therefore, the NAG vibrios demand proper attention from investigators and sanitary-epidemiological institutions of the Russian Federation.

Key words: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, NAG vibrios, morbidity, pathogenicity factors, antibiotic resistance, population heterogeneity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: unicorn54@mail.ru.

Citation: Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V. Cholera Vibrios of nonO1/nonO139 Serogroups in Etiology of Acute Intestinal Infections: Current Situation in Russia and Around the World. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:14–23. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23

Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп (далее, для краткости, НАГ-вибрионы) известны как естественные обитатели открытых водоемов и как возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до алгидных форм с летальным исходом [2, 3, 22, 26, 35, 50]. На фоне текущего стремительного распространения новых высоковирулентных штам-

мов Эль Тор моральный и экономический ущерб, наносимый НАГ-вибрионами, не столь заметен, но реален и достаточно значителен. Практически по всему миру постоянно регистрируются случаи НАГ-инфекций как множественные (в пределах одного региона) [2, 11, 18, 23, 25, 27, 40, 44, 46, 50, 53], так и единичные – «домашние» (domestic), либо завозные («диарея путешественников») [37]; имеются сообще-

ния и о вспышках [2, 23, 42]. В середине прошлого столетия в литературе регулярно появлялись многочисленные публикации о ОКИ, вызванных НАГ-вибрионами в различных регионах, однако они почти не содержали данных о генотипических свойствах выделенных штаммов. В дальнейшем зарубежными и, в меньшей степени, отечественными авторами стали проводиться разносторонние ретроспективные и оперативные исследования их геномов. В настоящем обзоре рассматривается современная ситуация по заболеваемости кишечными НАГ-инфекциями в России и в мире, а также молекулярные основы патогенности возбудителей.

Роль НАГ-вибрионов в этиологии ОКИ. НАГ-вибрионы редко содержат детерминанты основных факторов патогенности – холерного токсина (*ctxAB*) и токсин-корегулируемых пилей ТСП (*tcpA*) и даже при их наличии не склонны к эпидемическому распространению. До настоящего времени крупная вспышка, вызванная одним холерогенным клоном O37 серогруппы в Судане в 1968 г. (460 заболевших, 125 летальных исходов), остается единственной описанной в литературе [3]. Напротив, локальная вспышка (10 случаев) в США в 2011 г., возбудителем которой был токсигенный клон O75 серогруппы, характеризовалась кратковременностью и легким течением заболевания, не требовавшим ни госпитализации, ни регидратационной терапии [42]. Из бывших республик СССР ОКИ, обусловленные токсигенны-

ми штаммами, были официально зарегистрированы только в Узбекистане [1, 3, 5], однако сведения о том носила ли заболеваемость вспышечный характер, к сожалению, недоступны. В остальных случаях множественной заболеваемости отдельные токсигенные штаммы изредка встречались вместе с превосходящими их по численности нетоксигенными, а *ctxAB*⁺ штаммы O141 серогруппы, которым приписывали потенциальную способность к глобальному распространению, до сих пор выделяются лишь от спорадических больных в разных регионах земного шара.

На эндемичных по холере территориях НАГ-инфекции, как правило, сопровождают эпидемические вспышки типичной холеры и находятся в меньшинстве по сравнению с числом случаев, обусловленных представителями O1 серогруппы. Часто НАГ-вибрионы выделяются и во время вспышек ОКИ иной этиологии наряду с галофильными патогенными вибрионами и другими бактериями кишечной группы [25, 43, 55]. Нередки случаи микст-инфекций с выделением от одного и того же больного *V. cholerae* nonO1/nonO139 и O1, либо иных возбудителей [29, 44]. Напротив, в благополучных по холере странах НАГ-вибрионы большей частью являются единственными возбудителями спорадических случаев и локальных вспышек. Данные о заболеваемости НАГ-инфекциями с 2000 г. по настоящее время представлены в табл. 1.

Таблица 1

Множественные случаи и вспышки ОКИ, вызванных *V. cholerae* nonO1/nonO139 в разных странах с 2000 по 2014 год, в том числе на фоне вспышек холеры и диарей иной этиологии

Страна	Регион	Год	Всего случаев	Идентифицировано штаммов	В том числе <i>V. cholerae</i>		Ссылка
					O1/O139	неO1/неO139	
Индия	Kolkata	2002–2010	12719	2206	1841/84	281	[25]
	Kolkata	2003	197	197	135/2	54	[18]
	East-Medininpur	2009	39	30	17/0	4	[43]
	Hubli, Karnataka	2000–2004	NI	256	129/61	66	[17]
Бангладеш	NI	2000–2001	NI	NI	NI	15	[41]
Китай	Zhejiang	2005–2011	795	40	0/0	40	[35]
	Guangzhou	2001–2009	3398	NI	0/0	101	[58]
	Maanshan	2012	6	6	0/0	6	[19]
Тайвань	Tainan	2009–2014	NI	45	NI	45	[20]
Индонезия	Jakarta <i>et al.</i>	2000–2001	NI	NI	153/0	14	[55]
	Bauchi, Maiduguri, Ife	2009–2010	NI	17	12/0	5	[36]
Ирак	NI	2007–2009	Тысячи	80	70/0	10	[47]
Аргентина	Tacuman	2003–2005	NI	34	0/0	34	[27]
Гаити	NI	2010	>0,5 млн	81	39/0	17	[29]
Куба	9 провинций	2007	422	422	0/0	422	[13]
США	Florida	2011	10	8	0/0	8	[42]
Австрия	NI	2005	NI	NI	0/0	8	[14]
Узбекистан	NI	2000–2001	NI	266	0/0	266	[1]
	NI	2002–2003	NI	510	228/0	282	[5]
Украина	Несколько обл.	2011–2013	NI	100	NI	100	[7]
Россия	Ростовская обл.	2000–2014	30	30	0/0	30	[2]

Примечание. NI – не указано.

В России и бывших республиках СССР большинство вспышек НАГ-инфекций было зарегистрировано в прошлом столетии [1, 2, 9], затем число сообщений о них значительно снизилось. Невозможно однозначно определить вызвано ли это ослаблением внимания со стороны санэпидслужб и недостаточно эффективной бактериологической диагностикой или тем, что массовые заболевания на множестве территорий действительно остались лишь историческим фактом. Тем не менее НАГ-инфекции продолжают регистрироваться в России и в нынешнем столетии, хотя по большей части в виде спорадических случаев.

Источники и пути передачи инфекции.

НАГ-вибрионы являются естественными обитателями открытых пресноводных и соленых водоемов и достаточно хорошо приспособлены к существованию в них как в виде планктонных микроорганизмов, так и в ассоциации с беспозвоночными и позвоночными гидробионтами, водоплавающими птицами, которые могут служить «промежуточными хозяевами», мигрирующими на большие расстояния, способствуя диссеминации возбудителей [12, 28]. Из воды и биотических объектов вибрионы выделяются гораздо чаще, чем от людей, в том числе и в периоды вспышек в конкретных регионах, и в литературе представлено намного больше публикаций о свойствах штаммов из окружающей среды по сравнению с таковыми клинических штаммов. Обращает на себя внимание глобальное распространение НАГ-вибрионов, затра-

гивающее как эндемичные, так и вполне благополучные по холере территории, расположенные не только в южных, но и в средних и даже северных широтах [2, 42, 49]. Независимо от наличия/отсутствия выявленных больных, многие водные штаммы сохраняют способность к реализации патогенетического потенциала, что было неоднократно показано при их тестировании на моделях *in vitro* и *in vivo* [22, 31, 44, 48, 50 и др.]. Водный путь заражения характерен для внекишечных форм НАГ-инфекций, которые носят спорадический характер, возникают в основном на фоне хронических системных заболеваний и выходят за рамки настоящего обзора. Причиной заражения ОКИ служит не только непосредственно вода, но и некачественные продукты питания, в которых размножаются и накапливаются НАГ-вибрионы [42]. Поэтому риск возникновения НАГ-инфекций существует везде, где имеются зоны рекреации и используются в пищу продукты из гидробионтов, в том числе импортные.

Серогруппы НАГ-вибрионов. Для характеристики НАГ-вибрионов широко используется их серотипирование, однако лишь в отдельных случаях его результаты позволяют говорить о клональности той или иной вспышки. В табл. 2 суммированы все опубликованные на сегодняшний день данные о серогрупповой принадлежности штаммов, вызвавших в ряде стран множественные заболевания. Как видно из табл. 2, подавляющее большинство возбудителей

Таблица 2

Серогрупповая принадлежность штаммов *V. cholerae* nonO2/nonO139, вызвавших множественные случаи и вспышки ОКИ в разных странах с 1987 по 2014 год

Место выделения	Год	Выделено штаммов	Серогруппы	CTX ⁺	Ссылка
Индия (Delhi)	1995	72	42 шт. – O10 , 30 н/т	NI	[46]
Индия (Kolkata)	1989–1991	26	O5, O7, O8, O11, O14, O26, O34, O39, O97, н/т	2 (н/т)	[44]
	1993–1995	93	29 серогрупп + н/т	1 (O74)	[40]
	1995–1996	11	O6, O8, O9, O19, O39, O58, O144	0	[11]
	1996	15	O6, O8, O11, O12, O19, O39, O58, O144, н/т	0	[50]
	1997–1998	77	Минимум 12 серогрупп	NI	[54]
	2003	54	18 серогрупп + н/т	1 (O36)	[18]
	2002–2010	281	80 серогр+н/т	0	[25]
Таиланд (Bangkok)	1993–995	69	37 серогрупп, в т.ч. 7 шт. – 1 клон O37	0	[23]
Бангладеш	2000–001	15	O2, O14, O15, O24, O37, O39, O49, O94, O145	0	[41]
Китай (Guangzhou)	2001–2009	101	26 серогрупп+ н/т	NI	[58]
Япония Tokyo	1996	13	O2, O5, O8, O9, O12, O14, O27, O51, O88, O97, O161	0	[37]
Бразилия (Amazonas, Paraiba, Pernambuco, Ceara, Bahia)	1991–2000	131	54 серогруппы+ н/т	7 (O26+н/т)	[53]
Мексика (Cancun)	1983	22	7 серогрупп, в т.ч. 10 шт. – 12(Smith)	NI	[26]
Перу (Lima)	1994	58	O2, O10 , O12 , O28, O34, O53, н/т	0	[22]
США (Florida)	2011	8	O75	8	[42]
Австрия	2005	8	O12, O37	8	[14]
Узбекистан	1987–2001	266	34 серогруппы+ н/т	22 (O9, O15, O28, н/т)	[1]
Калмыкия	1990–2014	73	33 серогруппы+ н/т	0	[1]
Астраханская обл.	1990–2014	48	15 серогруппы+ н/т	0	[1]
Ростовская обл.	1980–2014	127	24. серогруппы + н/т	0	[2]

Примечания: NI – не указано, н/т – не типировались. Жирным шрифтом выделены преобладающие серогруппы.

отличалось крайним разнообразием серологических свойств, и даже охарактеризованные по этому признаку токсигенные штаммы относились более чем к одной серогруппе (кроме вспышки в США). Для нетоксигенных же изредка можно было выделить преобладающие, но далеко не единственные серогруппы. С одной стороны, это может быть связано с исходной неоднородностью популяции, присутствующей в источнике инфекции (воде, гидробионтах) и вытекающей отсюда возможностью заражения сразу несколькими штаммами, хотя в литературе имеется пока единственное сообщение о выделении от одного и того же больного (в Таиланде) штаммов O111 и O159 серогрупп [23]. С другой стороны, причина может заключаться в настолько высокой степени изменчивости локуса ДНК, ответственного за синтез О-антигена, что за ней «не поспевает» никакое расширение схем серотипирования. Действительно, если в 1930-е годы число известных серогрупп равнялось 7, то в 1970-х годах оно возросло до 60, в 1980-х – до 137, в 1990-х – до 193, а к началу текущего столетия их насчитывалось уже 206 [18, 44] и, тем не менее, при использовании соответствующего набора типизирующих сывороток часть штаммов по-прежнему не агглютинируется ни одной из них [18, 25, 58]. Еще сложнее обстоит дело в России: за неимением в распоряжении ни соответствующих мировым стандартам наборов сывороток, ни типовых штаммов для их получения (кроме O2–O11, O13–O22, O24, O25, O27–O39) отечественными исследователями (сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб», а затем и РостНИПЧИ) была разработана собственная схема серотипирования [1], позволяющая идентифицировать 80 серогрупп НАГ-вибрионов, 45 из которых (O40–O84) не соответствуют описанным в мировой литературе, что делает невозможным сравнение полученных данных с данными зарубежных авторов. Если эта схема в прошлом столетии все же позволяла выявить хотя бы доминирующие серогруппы, то с течением времени при ее применении даже «для внутреннего пользования» наблюдалось все большее увеличение числа нетипизируемых штаммов [1, 2]. Поэтому вопрос о целесообразности использования серотипирования для характеристики НАГ-вибрионов, циркулирующих в нашей стране, остается дискуссионным. Возможно, дальнейшие исследования позволят решить является ли совершенствование этого направления действительно актуальным, либо всего лишь «безнадежной погоней за изменчивостью холерных вибрионов».

Факторы патогенности. Поскольку лишь небольшая часть НАГ-вибрионов обладает генами холерного токсина [18, 40, 44, 53], исследователей давно интересовал вопрос о том, за счет каких других факторов представляющие подавляющее большинство лишенные их штаммы проявляют патогенные свойства. По-видимому, ответом на данный вопрос может служить предложенная нами концепция о взаимозаменяемости факторов патогенности холерных вибрионов, которая распространяется и на нетокси-

генные штаммы O1 серогруппы [4]. Однако главная роль в вирулентности НАГ-вибрионов чаще отводится тем из известных токсических субстанций, которые были впервые выявлены именно у представителей данной группы микроорганизмов. В первую очередь, это термостабильный токсин – активатор гуанилатциклазы, вызывающий развитие тяжелой диареи за счет повышения уровня цГМФ [4]. Проблема состоит в том, что ген этого токсина встречается у вибрионов не намного чаще, чем гены *ctxAB*, хотя и присутствует во многих популяциях, «населяющих» разные страны. В частности, он был обнаружен у штаммов, выделенных в Индии, Таиланде, Вьетнаме, Китае, Японии, Кубе, Италии [23, 24, 32, 37, 41]. В России штаммов НАГ-вибрионов, достоверно содержащих этот ген, пока не выявлено. Другой фактор – cholix-токсин, блокатор белкового синтеза, действующий подобно экзотоксину А псевдомонад. Его ген достаточно широко распространен среди НАГ-вибрионов, он идентифицирован в геномах штаммов, циркулирующих в Индии, Китае, Кении, США [32, 34] и в Ростовской области России [2]. Его считают причастным в основном к развитию внекишечных форм заболеваний, однако поскольку его гены встречаются у штаммов, вызвавших диарею [2, 34], не исключено, что он может усиливать тяжесть НАГ-инфекций, способствуя развитию воспалительных процессов [34]. Наконец, значительная роль в вирулентности НАГ-вибрионов отводится контакт-зависимым системам секреции белков – третьего и шестого типов (T3SS и T6SS) [4]. Кластер генов T3SS и находящиеся за его пределами гены ряда эффекторов присутствуют у многих штаммов различного происхождения, но чаще у клинических [2, 18, 32, 35]. Что касается T6SS, то практически все штаммы содержат гены ее структурных компонентов, но лишь часть из них – последовательности, кодирующие актин-связывающий и пептидогликан-связывающий домены ее эффекторов. Способность к экспрессии T6SS свойственна в основном НАГ-вибрионам, хотя была выявлена и у некоторых вибрионов Эль Тор [4]. В отсутствие генов *ctxAB* ОКИ могут быть вызваны и другими факторами, такими как гемолизин HlyA, цитотоксин MARTX, цитотонический фактор Cef, протеазы и др. [2, 4]. Отдельные штаммы содержат гены токсинов Zot и Ace, а также факторы колонизации Ser в составе профага pre-CTX, ген *tcpA* в составе острова VPI, гены термостабильного и родственного ему гемолизина (*tdh*, *trh*) *V. parahemolyticus* [4]. Число известных токсинов продолжает увеличиваться. S.R.Isac *et al.* [31] недавно выделили из клинического штамма O54 серогруппы и описали внеклеточный фактор, обладающий цитотоксической и энтеротоксической активностями, который сочли возможным участником патогенеза. M.Sen *et al.* [48] было показано, что нетоксигенные НАГ-вибрионы продуцируют НАД-гликогидролазу (НАДазу). Ранее НАД-гликогидролазную активность приписывали только А-субъединице холерного токсина и исполь-

зовали для идентификации токсигенных штаммов. На основании способности этого фермента оказывать цитотоксическое действие на культуру клеток HeLa, а продуцирующих его нетоксигенных штаммов (в отличие от не продуцирующих) вызывать накопление жидкости в кишечнике мышей-сосунков авторы предположили, что он может играть существенную роль в патогенезе НАГ-инфекций.

Так или иначе, мнения разных исследователей сходятся в том, что энтеропатогенность НАГ-вибрионов обусловлена продукцией более чем одного фактора, и оценивать ее следует суммарно [40, 44 и др.]. Так, T.Ramamurthy *et al.* [44] при изучении 28 штаммов отнесли их к 6 «фенотипам вирулентности» и показали, что представители самого значимого из них одновременно продуцировали гемолизин(ы), цитотоксин и связанный с клеткой гемагглютинин. Исследованные нами НАГ-вибрионы из Ростовской области, вызвавшие ОКИ со сходной симптоматикой, также существенно различались по наборам генов факторов патогенности. Среди них были выявлены как штаммы с интактными детерминантами мощных факторов типа T3SS, VPI или MARTX, так и имеющие минимальный набор генов патогенности [2]. По-видимому, у разных штаммов основная роль в патогенезе принадлежит различным факторам и их сочетаниям: для одних это T3SS [40], для других – MARTX, либо гемолизин HlyA, для третьих – сериновая протеаза, либо гемагглютинин/протеаза (HapA) и т.д. [4].

Антибиотикорезистентность НАГ-вибрионов. Изучение спектров чувствительности НАГ-вибрионов к антибиотикам как в нашей стране, так и за рубежом носит скорее ретроспективный, чем оперативный характер. Во многих работах отмечено нарастание числа резистентных и полирезистентных штаммов с течением времени. Например, если среди штаммов, выделенных от больных в Калькутте в 1989–1991 гг., ни один не обладал устойчивостью к налидиксовой кислоте [44], то среди выделенных там же с 2002 по 2010 год резистентных к этому антибиотику было 57,6 % [25]. Приобретение как отдельных, так и множественных маркеров резистентности в течение нескольких лет констатировано рядом авторов при изучении клинических штаммов из Индии [17], Таиланда [23], Индонезии [55]. Согласно данным ретроспективных исследований, штаммы, выделенные ранее в ряде регионов России, не обладали антибиотикорезистентностью [9], тогда как выделенные в Ростовской области имели до 18 различных профилей, включающих и чувствительные, и с множественной устойчивостью (от 1 до 6 маркеров у одного штамма) [8]. Обращает на себя внимание частая встречаемость антибиотикорезистентных штаммов в водных объектах. В последние годы они были зарегистрированы в Индии, Китае, Вьетнаме, Индонезии, Марокко, бассейне Карибского моря, Мексике, России [8, 24, 32, 38, 54]. У ряда из них с помощью ПЦР выявлены гены β -лактамаз, детер-

минанты устойчивости к ампициллину, неомицину, стрептомицину, сульфаметизол-сульфадиазину [24, 54]. Гены антибиотикорезистентности чаще всего находятся в составе интегративных конъюгативных элементов (SXT/ICE). При молекулярно-генетических исследованиях они были идентифицированы в геномах НАГ-вибрионов из Индии, Таиланда, Бразилии [23, 54]. Описаны SXT, не содержащие генов антибиотикорезистентности. У клинических штаммов, выделенных на Гаити в 2010 г., выявлен ICE элемент нового типа (ICEVchHai2), в котором эти гены отсутствовали [16]. Другой «пустой» SXT был обнаружен А.В.Фадеевой и соавт. [9] у одного из штаммов из Ростовской области 1974 г. выделения. Такие штаммы могут рассматриваться как потенциальные реципиенты генов лекарственной устойчивости. Кроме SXT/ICE, гены антибиотикорезистентности могут находиться в составе других мобильных генетических элементов (МГЭ). Например, у штамма, выделенного в Китае, две кассеты генов, кодирующих устойчивость к триметоприму (*dhfr27*), стрептомицину и спектиномицину (*aadA16*), присутствовали в составе конъюгативной плазмиды; обе они отличались по нуклеотидным последовательностям от соответствующих кассет вибрионов O1 серогруппы [52]. Некоторые индийские штаммы также содержали интегроны класса 1 на плазидах [54]. У штамма из Аргентины ген β -лактамазы (также измененный) был выявлен в области мегаинтегрона VCR [38]. Наличие МГЭ и мегаинтегрона создает благоприятные условия для успешного горизонтального переноса генов от штамма к штамму и не исключает дальнейшего нарастания числа резистентных, что вызывает необходимость эффективного выбора средств этиотропной терапии НАГ-инфекций.

Гетерогенность популяций и генетический обмен. НАГ-вибрионы представляют собой крайне неоднородную группу, включающую множество геновариантов, выявляемых при анализе как отдельных генов и их кластеров, так и тотальной ДНК. Рядом авторов была показана высокая гетерогенность популяций этих микроорганизмов, циркулирующих в одних и тех же регионах, по наборам содержащихся в их геномах детерминант факторов патогенности [2, 41] и по другим молекулярно-генетическим характеристикам – риботипам [22], VNTR-типам [2, 6], MSLT-типам [41], PFGE-типам [25, 50], RAPD-PCR-профилям [53]. Лишь в отдельных случаях отмечена клональность по 1–2 характеристикам. Так, среди клинических штаммов, выделенных в Калькутте в 2003 г., пять *tcpA*-позитивных имели один и тот же риботип, но относились к разным серогруппам [18]; среди возбудителей вспышки 1994 г. в Лиме (Перу) все штаммы O12 серогруппы имели идентичные риботипы, к другому риботипу относились 83 % штаммов O10 серогруппы, однако риботипы остальных штаммов были уникальны [22]; в Бангкоке (Таиланд) в 1990-е годы среди представителей множества серогрупп были выявлены 7 штаммов O37 серогруппы

с общим риботипом, но один из них содержал плазмиду [23]; 6 штаммов (по два O6, O26 и O45 серогрупп) из Бразилии имели идентичные RAPD-PCR-профили [53]; 4 клинических штамма из Нигерии не различались по MLSA- и PFGE-профилям [36]; 10 из 22 изученных токсигенных штаммов, выделенных в Узбекистане, имели общий VNTR-генотип [6], RAPD-PCR-профиль, одинаковый набор генов факторов патогенности и персистенции, но при этом различались по числу мутаций в последних [3] и по серогрупповой принадлежности [3, 6].

Многообразие используемых разными авторами подходов не позволяет провести полноценный сравнительный анализ полученных ими данных, однако можно предположить, что результаты филогенетических исследований одних и тех же штаммов с применением неодинаковых методов в основном не совпадают. На примере популяции НАГ-вибрионов, циркулирующих в Ростовской области в течение полувека, нами было установлено, что 169 штаммов образуют 165 ПЦР-генотипов в составе 15 кластеров и 164 VNTR-генотипа в составе 16 кластеров, причем между ними не обнаруживалось никакой взаимосвязи, как и с серогрупповой принадлежностью [2].

Штаммы НАГ-вибрионов, циркулирующие в объектах окружающей среды, отличаются еще большей, чем клинические, генотипической изменчивостью и чаще обладают меньшими наборами генов факторов патогенности [2]. Тем не менее, они сохраняют детерминанты факторов, которые необходимы для жизнеобеспечения и в то же время обладают биологической активностью (мы называем их факторами патогенности/персистенции), такими как *HlyA* и *Cef* [4]. Практически все содержат видоспецифичный ген гемолизина *HlyA*. Многие обладают генами цитотоксического комплекса MARTX, островом патогенности VPI-2 с геном нейраминидазы, хотя оба эти кластера могут содержать делеции в разных участках [2, 4]. Иногда у них выявляют детерминанты токсинов, играющих существенную роль в патогенезе, причем это касается и штаммов, «населяющих» эндемичные территории, где отсутствует заболеваемость населения. Например, штаммы с СТХ-элементом либо геном термостабильного токсина, обнаружены среди обитателей открытых водоемов не только Юго-Восточной Азии, Латинской Америки, но и США, Италии, Германии, Австралии [29, 32, 41, 53], а содержащие кластеры T3SS довольно широко распространены среди представителей водных популяций во многих странах, включая Россию [2, 4, 29]. В Австралии и Китае выявлены штаммы, содержащие ген *cholix*-токсина [32]. Большинство зарубежных авторов считает НАГ-вибрионы, выделяемые из объектов окружающей среды, потенциально опасными независимо от качественного и количественного состава генов факторов патогенности, а также от «эндемичности» мест их выделения. В России им придается меньшее значение, вероятно, в связи с тем, что они обнаруживаются практически во всех водоемах,

где проводится мониторинг, тогда как случаи заражения людей на прилегающих территориях весьма немногочисленны. Более того, при выявлении больных с подтвержденным диагнозом «НАГ-инфекция» оперативное исследование предполагаемых источников заражения на наличие возбудителей не проводится, поэтому сравнить их с клиническими на генетическом уровне не представляется возможным. Осуществленное нами ПЦР- и VNTR-типирование 42 штаммов, выделенных из воды Азовского моря и рыбы в 2011–2012 гг., не выявило близкого родства со штаммами, вызвавшими в те же годы случаи ОКИ в Таганроге, однако изначально не было и сведений о контактах заболевших именно с этими водными объектами [2]. Очевидно, при наличии больных расширенные генетические исследования штаммов, выделяемых на той же территории из объектов окружающей среды, следует признать актуальными.

Несмотря на значительную гетерогенность популяций, циркулирующих в определенных регионах, в совокупности в них часто присутствует достаточно большой набор генов факторов патогенности, персистенции, жизнеобеспечения и антибиотикоустойчивости, что предполагает возможность их горизонтального переноса. «Виртуальные» свидетельства наличия процессов рекомбинации в генетически неоднородной эстуарной популяции НАГ-вибрионов на северо-востоке США были получены В.М. Schuster *et al.* [49] при биоинформационном анализе данных MLSA-типирования с использованием нескольких компьютерных программ. Реальная способность к горизонтальной передаче была неоднократно показана в условиях эксперимента для самых разнообразных генов как в пределах группы НАГ-вибрионов, так и между ними и представителями O1 серогруппы. Помимо «традиционной» передачи фага СТХφ TCP-позитивным штаммам, значительная роль отводится и другим фагам. В частности, в прибрежных водах Калифорнии обнаружены литические фаги, способные переносить СТХ-элемент от штаммов Эль Тор НАГ-вибрионам [21]. Штаммы O141 серогруппы, неспособные образовывать инфекционные вирионы СТХφ (классического типа), успешно передавали профаг штаммам Эль Тор в микрокосмах с хитиновым субстратом и O141-специфическим литическим бактериофагом за счет трансформации [56]. Описан конъюгативный перенос плазмиды, несущей несколько генов антибиотикорезистентности, от донора O1 серогруппы чувствительным штаммам НАГ-вибрионов [30]. На основании результатов секвенирования кластера генов биосинтеза О-антигенов (*rfb*) штамма O37 серогруппы M. Li *et al.* [33] пришли к выводу о возможности их горизонтального переноса. Впоследствии это предположение было подтверждено M. Blokesch, G. K. Schoolnik [12], успешно осуществившими передачу O37-специфичных генов с помощью трансформации ДНК штамма O37 серогруппы в штамм O1 серогруппы в присутствии хитина, при этом в ДНК рекомбинантов произошла

делеция O1-специфичных генов. S.Basu, R.K.Ghosh [10] показали, что заражение штамма *V. cholerae* O1 умеренным фагом PS166 приводит к образованию лизогенов, утративших агглютинабельность O1-холерной сывороткой при сохранении CTX и VPI, а также обнаружили среди клинических нетоксигенных НАГ-вибрионов 2 штамма, способных к образованию инфекционных частиц этого фага. Однако еще до появления в печати указанных работ конъюгативная передача генов *rfb* от штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 токсигенным штаммам *V. cholerae* O1 и O139 и обратно с последующим изменением серогрупповой принадлежности была показана отечественными авторами [51].

Происхождение НАГ-вибрионов. По поводу происхождения НАГ-вибрионов и их эволюционных связей с *V. cholerae* O1 нет единого мнения. Одни авторы считают, что первые могут являться «потомками» последних, утративших способность к агглютинации O1-холерной сывороткой. Подтверждением этой гипотезы служит существование так называемых R-вариантов Эль Тор, которые не агглютинируются O1 сывороткой, но содержат ген O1-антигена [18, 39]. Шесть таких штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*), выделенных в Калькутте в 2003 г., имели общие риботипы с одновременно выделенными там же штаммами Эль Тор [18]. Из 7 описанных R.K.Mitra *et al.* [39] индийских клинических штаммов 1992–1997 гг. выделения 6 содержали ген O1- и 1 – O139-антигена, но не агглютинировались соответствующими сыворотками. При их риботипировании было установлено близкое родство со штаммами O1 и O139 серогрупп, выделенными в тот же период. O1-специфичный ген *wbeN* был выявлен и у 2 клинических штаммов НАГ-вибрионов, выделенных в Бразилии во время вспышки холеры, причем один из них принадлежал к O26 серогруппе (второй не типировался). Оба содержали 4 гептануклеотидных повтора в промоторной области *ctxA* и по последовательностям генов рРНК были близко родственными штаммам O1 серогруппы в отличие от *wbeN*-негативных штаммов O26, попавшими в другой кластер [15]. Другие авторы, напротив, подчеркивают роль НАГ-вибрионов в возникновении новых клонов эпидемически опасных штаммов O1 и O139 серогрупп [40, 50, 56]. На наш взгляд, эволюция *V. cholerae* может происходить в обоих этих направлениях.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что НАГ-вибрионы, несмотря на редкую причастность к крупным вспышкам, занимают не последнее место в этиологии ОКИ во всем мире и представляют потенциальную угрозу здоровью населения нашей страны. Будучи лучше (по сравнению с *V. cholerae* O1) приспособленными к персистенции в объектах окружающей среды даже в условиях умеренного климата, они служат природными резервуарами генов факторов патогенности, которые могут передавать другим холерным вибрионам. Это положение, высказанное подавляющим большин-

ством авторов [18, 29, 32], очевидно, имеет право на статус доказанного научного постулата. Популяции НАГ-вибрионов, «привязанные» к определенным территориям, отличаются крайней генетической гетерогенностью, однако в целом содержат достаточно широкий «ассортимент» генов факторов патогенности и антибиотикорезистентности, который может пополняться за счет заносов возбудителей из других регионов. По всей видимости, поддержание полного набора интактных и способных к экспрессии генов в сравнительно небольшом геноме одного штамма было бы невыгодно энергетически, но совокупный генофонд популяции позволяет ей сохранять патогенетический потенциал. Горизонтальный перенос генов в водной среде, либо в организме человека создает благоприятные условия для его реализации. Кроме того, генетический обмен, по всей видимости, не ограничивается пределами вида *V. cholerae*, в нем могут участвовать и другие патогенные для человека вибрионы. Косвенным подтверждением этому служит обнаружение, хотя и довольно редкое, генов холерного и термостабильного токсинов, острова VPI, прямого термостабильного гемолизина (*tdh*) *V. parahaemolyticus*, генов T3SS у *V. cholerae* nonO1/nonO139, *V. mimicus*, *V. alginolyticus* и *V. hollisae*; TDH-родственного гемолизина (*trh*) у *V. cholerae* nonO1/nonO139 и *V. (Listonella) anguillarum* [4, 57]. Отсюда вытекает опасность формирования новых клонов с повышенным патогенетическим, а возможно, и эпидемическим потенциалом (как в случае с *V. cholerae* O139), последствия распространения которых непредсказуемы. Поэтому данная группа возбудителей требует внимания со стороны исследователей и санэпидслужб Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Воронежская Л.Г., Цедова Э.Г., Монахова Е.В., Михась Н.К., Ньематов А.С., Иногамова И.А., Обороткина Н.Ф., Малькова Г.И., Давыдова В.К., Агапов Б.Л. Особенности циркуляции различных по происхождению холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2006; 2:19–22.
2. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопоьянов А.С., Водопоьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015; 3:25–7.
3. Ерошенко Г. А., Краснов Я. М., Фадеева А. В., Одинокоев Г. Н., Кутырев В. В. Генетическая характеристика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* неO1/неO139 из Средней Азии. *Генетика.* 2013; 49(10):1165–73.
4. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор). *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:60–8.
5. Мустанов А.Н., Нематов А.С., Миртазаев О.М. Определение эпидемической значимости холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территории республики Узбекистан. *Профилактика и клин. мед.* 2007; 3(8):147–9.
6. Онищенко Г.Г., Мишанькин Б.Н., Водопоьянов А.С., Ломов Ю.М., Водопоьянов С.О., Воронежская Л.Г., Сучков И.Ю., Черепанина И.Я., Дуванова О.В., Шишияну М.В. Холерные вибрионы серогрупп неO1, выделенные в Узбекистане в 1987–1990 гг.: ретроспективный VNTR-анализ. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2003; 6:25–9.

7. Петренко Е.В., Хайтович А.Б., Пидченко Н.Н., Ильичев Ю.А. Изучение структуры генома *V. cholerae* non-O1, выделенных от больных острыми кишечными инфекциями в Украине. *Світ медицини та біології*. 2014; 4(47):52–6.
8. Селянская Н.А., Веркина Л.М., Архангельская И.В., Тришина А.В., Водяницкая С.Ю. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов неO1/не O139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области в 2011–2014 гг. *Здоровье населения и среда обитания*. 2015; 7:33–6.
9. Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ СХТ констита антибиотикочувствительного штамма *Vibrio cholerae* неO1/неO139 серогруппы. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):102–3.
10. Basu S., Ghosh R.K. Identification and characterization of phage PS166 lysogens from non-O1, non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. *Med. Sci. Monit.* 2009; 15(10):BR281–8.
11. Bhattacharya M.K., Dutta D., Bhattacharya S.K., Deb A., Mukhopadhyay A.K., Nair G.B., Shimada T., Takeda Y., Chowdhury A., Mahalanabis D. Association of a disease approximating cholera caused by *Vibrio cholerae* of serogroups other than O1 and O139. *Epidemiol. Infect.* 1998; 120(1):1–5. DOI: 10.1017/S0950268897008352.
12. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.
13. Bravo F.L., Fernández A., Ramírez M.M., Llop A., Martínez G., Hernández R.I., Cabrera L.E., Morier L., Fraga J., Núñez F.A., Aguila A. Microbiological characterization of non-O1 *Vibrio cholerae* isolated in Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2007; 59(3):227–33.
14. Brownick T.S., Das M., Ruppitsch W., Stoeger A., Pietzka A.T., Allerberger F., Rodrigues D.P., Sarkar B.L. Detection of virulence-associated and regulatory protein genes in association with phage typing of human *Vibrio cholerae* from several geographical regions of the world. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58:1160–7. DOI: 10.1099/jmm.0.008466-0.
15. Cariri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.
16. Ceccarelli D., Spagnoletti M., Hasan N.A., Lansing S., Huq A., Colwell R.R. A new integrative conjugative element detected in Haitian isolates of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Res. Microbiol.* 2013; 164(9):891–3. DOI: 10.1016/j.resmic.2013.08.004.
17. Chandrasekhar M.R., Krishna B.V., Patil A.B. Changing characteristics of *Vibrio cholerae*: emergence of multidrug resistance and non-O1, non-O139 serogroups. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2008; 39(6):1092–7.
18. Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri A., Chowdhury G., Bhattacharya M.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Klose K.E., Nandy R.K. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(4):1087–95. DOI: 10.1128/JCM.02026-08.
19. Chen D.L., Zhang P., Wang D.C., Chen J., Yu B.Q., Cheng X.F., Diao B.W., Zhou H.J., Zhu M., Hu W.F., Zhan S.W., Jing H.Q., Kan B. Molecular analysis on non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2012; 33(12):1265–8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.015.
20. Chen Y.T., Tang H.J., Chao C.M., Lai C.C. Clinical manifestations of non-O1 *Vibrio cholerae* infections. *PLoS One.* 2015; 10(1):e0116904. DOI: 10.1371/journal.pone.0116904.
21. Choi S., Dunams D., Jiang S.C. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(3):1015–22. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04502.x.
22. Dalsgaard A., Albert M.J., Taylor D.N., Shimada T., Meza R., Serichantalergs O., Echeverria P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(10):2715–22.
23. Dalsgaard A., Forslund A., Bodhidatta L., Serichantalergs O., Pitarangsi C., Pang L., Shimada T., Echeverria P. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogeneous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122(2):217–26. DOI: 10.1017/S0950268899002137.
24. Diep T.T., Nguyen N.T., Nguyen T.N., An H.K., Nguyen T.Q., Nguyen V.H., Nguyen T.V., Nguyen T.N., Izumiya H., Ohnishi M., Yamashiro T., Nguyen L.T. Isolation of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain carrying *ctxA*, *st*, and *hly* genes in southern Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 2015; 59(5):262–7. DOI: 10.1111/1348-0421.12248.
25. Dutta D., Chowdhury G., Pazhani G.P., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Ranjendran K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya M.K., Mitra U., Takeda Y., Nair G.B., Ramamurthy T. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3):464–7. DOI: 10.3201/eid1903.121156.
26. Finch M.J., Valdespino J.L., Wells J.G., Perez-Perez G., Arjona F., Sepulveda A., Bessudo D., Blake P.A. Non-O1 *Vibrio cholerae* infections in Cancun, Mexico. *Am. J. Med. Hyg.* 1987; 36(2):393–7.
27. González Fraga S., Villagra de Trejo A., Pichel M., Figueroa S., Merletti G., Caffer M.I., de Castillo M.C., Binsztajn N. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 isolates associated with diarrhea. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009; 41(1):11–9.
28. Halpern M., Senderovich Y., Izhaki I. Waterfowl – the missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathog.* 2008; 4(10):e1000173. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000173.
29. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(29):E2010–7. DOI: 10.1073/pnas.1207359109.
30. Hofer E., Quintaes B.R., dos Reis E.M., Rodrigues Ddos P., Seki L.M., Feitosa I.S., Ribeiro L.H., Ferreira M.R. The emergence of multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* isolated from gastroenteritis patients in Ceará, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32(2):151–6.
31. Isac S.R., Nair G.B., Singh D.V. Purification and characterization of cytotoxin produced by a clinical isolate of *Vibrio cholerae* O54 TV113. *Appl. Biochem. Bacteriol.* 2012; 167(4):809–23. DOI: 10.1007/s12010-012-9718-4.
32. Li F., Du P., Li B., Ke C., Chen A., Chen J., Zhou H., Li J., Morris J.G. Jr, Kan B., Wang D. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 *Vibrio cholerae* aquatic isolates from China. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(16):4987–92. DOI: 10.1128/AEM.01021-14.
33. Li M., Shimada T., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2441-2453.2002.
34. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel).* 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.
35. Luo Y., Ye J., Jin D., Ding G., Zhang Z., Mei L., Octavia S., Lan R. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiol.* 2013; 13:52. DOI: 10.1186/1471-2180-13-52.
36. Marin M.A., Thompson C.C., Freitas F.S., Fonseca E.L., Aboderin A.O., Zailani S.B., Quartey N.K.E., Okeke I.N., Vicente A.C.P. Cholera outbreaks in Nigeria are associated with multidrug resistant atypical El Tor and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(2):e2049. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002049.
37. Matsushita S., Noguchi Y., Yanagawa Y., Igarashi H., Morita K., Wada H., Watanabe N., Shibata M., Kanamori M., Kudoh Y., Shimada T. Sporadic diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 and characteristics of the isolates. *Kansenshogaku Zasshi.* 1997; 71(12):1204–9. DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.71.1204.
38. Melano R., Petroni A., Garutti A., Saka H.A., Mange L., Pasterán F., Rapoport M., Rossi A., Galas M. New carbencillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(7):2162–8. DOI: 10.1128/AAC.46.7.2162-2168.2002.
39. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
40. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Mitra R., Basu A., Rajendran K., Dutta D., Bhattacharya S.K., Shimada T., Takeda T., Takeda Y., Nair G.B. Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcutta: a 3-year (1993 to 1995) analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(10):2537–43.
41. Octavia S., Salim A., Kurniawan J., Lam C., Leung Q., Ahsan S., Reeves P.R., Nair G.B., Lan R. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE.* 2013; 8(6):e65342. DOI: 10.1371/journal.pone.0065342.
42. Onifade T.J.M., Hutchinson R., Van Zile K., Bodager D., Baker R., Blackmore C. Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, March to April 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16(20):19870.
43. Panda S., Pati K.K., Bhattacharya M.K., Koley H., Pahari S., Nair G.B. Rapid situation & response assessment of diarrhoea outbreak in a coastal district following tropical cyclone AILA in India. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:395–400.
44. Ramamurthy T., Bag P.K., Pal A., Bhattacharya S.K., Bhattacharya M.K., Shimada T., Takeda T., Karasawa T., Kurazono

- H., Takeda Y., Karasawa T., Kurazono H., Takeda Y., Nair G.B. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.* 1993; 39(4):310–7. DOI: 10.1099/00222615-39-4-310.
 45. Ranjbar M., Rahmani E., Nooriamiri A., Gholami H., Golmohamadi A., Barati H., Rajabifar D., Barati S., Sabet M.S., Zamiri A., Haghighi S., Taifefashemi P., Nojomi M. High prevalence of multidrug-resistant strains of *Vibrio cholerae*, in a cholera outbreak in Tehran-Iran, during June-September 2008. *Trop. Doct.* 2010; 40(4):214–6. DOI: 10.1258/td.2010.100015.
 46. Rudra S., Mahajan R., Mathur M., Kathuria K., Talwar V. Cluster of cases of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* O10 in east Delhi. *Indian J. Med. Res.* 1996; 103:71–3.
 47. Saleh T.H., Sabbah M.A., Jassem K.A., Hammad Z.N. Identification of virulence factors in *Vibrio cholerae* isolated from Iraq during the 2007-2009 outbreak. *Can. J. Microbiol.* 2011; 157(12):1024–31. DOI: 10.1139/w11-094.
 48. Sen M., Hajra T.K., Brownmick P., Naskar P., Bag P.K. Evaluation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) glycohydrolase activity among the strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 1(2):46–9.
 49. Schuster B.M., Tzyk A.L., Donner R.A., Striplin M.J., Almagro-Moreno S., Jones S.H., Cooper V.S., Whistler C.A. Ecology and genetic structure of a northern temperate *Vibrio cholerae* population related to toxigenic isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(21):7568–75. DOI: 10.1128/AEM.00378-11.
 50. Sharma C., Thungapathra M., Ghosh A., Mukhopadhyay A.K., Basu A., Mitra R., Basu I., Bhattacharya S.K., Shimada T., Ramamurthy T., Takeda T., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:756–63.
 51. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.
 52. Sun J., Zhou M., Wu Q., Ni Y. Characterization of two novel gene cassettes, dfrA27 and aadA16, in a non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolate from China. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(8):1125–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03060.x.
 53. Theophilo G.N., Rodrigues Ddos P., Leal N.C., Hofer E. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2006; 48(2):65–70. DOI: 10.1590/S0036-46652006000200002.
 54. Thungapathra M., Amita, Sinha K.K., Chaudhuri S.R., Garg P., Ramamurthy T., Nair G.B., Ghosh A. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6)-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(9):2948–55. DOI: 10.1128/AAC.46.9.2948-2955.2002.
 55. Tjaniadi P., Lesmana M., Subekti D., Machpud N., Komalarini S., Santoso W., Simanjuntak C.H., Punjabi N., Campbell J.R., Alexander W.K., Beecham H.J. III, Corwin A.L., Oyofa B.A. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(6):666–70.
 56. Udden S.M., Zahid M.S., Biswas K., Ahmad Q.S., Cravioto A., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(33):11951–6. DOI: 10.1073/pnas.0805560105.
 57. Ulloa F.M.T., Porte L., Braun J.S., Dabanch P.J., Fica C.A., Henríquez A.T., Osorio A.C.G. Acute gastroenteritis caused by a *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain harboring a genetic region homologous to the VpaI-7 pathogenicity island. *Rev. Chilena Infectol.* 2011; 28(5):470–3. DOI: 10.4067/S0716-10182011000600012.
 58. Xu S.H., Li Y.X., Li S.T., Wu Q., Sun F.Q., Huang F., Zeng A.F. Epidemic condition and biological characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* in Haizhu District of Guangzhou. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2010; 44(12):1087–90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2010.12.006.
- ### References
1. Avdeeva E.P., Mazrukho B.L., Voronezhskaya L.G., Tsedova E.G., Monakhova E.V., Mikhas' N.K., Nematov A.S., Inogamova I.A., Obrotkina N.F., Mal'kova G.I., Davydova V.K., Agapov B.L. [Peculiarities of circulation of cholera vibrios nonO1/nonO139 serogroups different in the origin]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2006; 2:19–22.
 2. Arkhangel'skaya I.V., Nepomnyashchaya N.B., Monakhova E.V., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Kruglikov V.D. [Genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 population, circulating in the Rostov Region]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2015; 3:25–7.
 3. Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Fadeeva A.V., Odinokov G.N., Kutryev V.V. [Genetic characteristics of toxigenic *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains from Central Asia]. *Genetika.* 2013; 49(10):1165–73.
 4. Monakhova E.V. [Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (Scientific review)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:60–8.
 5. Mustanov A.N., Nematov A.S., Mirtazaev O.M. [Determination of epidemic significance of cholera vibrios, isolated from humans and ambient environment objects in the territory of the Republic of Uzbekistan]. *Profilakt. Klinich. Meditsina.* 2007; 3(8):147–9.
 6. Onishchenko G.G., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M., Vodop'yanov S.O., Voronezhskaya L.G., Suchkov I.YU., Cherepakina I.Ya., Duvanova O.V., Shishiyau M.V. [Cholera vibrios of nonO1 serogroup, isolated in Uzbekistan in 1987-1990: retrospective VNTR-analysis]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2003; 6:25–9.
 7. Petrenko E.V., Khaitovich A.B., Pidchenko N.N., Il'ichev Yu.A. [Studies of genomic structure of *V. cholerae* nonO1, isolated from patients with acute intestinal infections in Ukraine]. *Svit Meditsini ta Biologii.* 2014; 4(47):52–6.
 8. Selyanskaya N.A., Verkina L.M., Arkhangel'skaya I.V., Trishina A.V., Vodyanitskaya S.Yu. [Monitoring of antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains, isolated from ambient environment objects in the Rostov Region in 2011-2014]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2015; 7:33–6.
 9. Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kutryev V.V. [Analysis of SXT constin of antibiotic-sensitive *Vibrio cholerae* strain of non-O1/non-O139 serogroup]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):102–3.
 10. Basu S., Ghosh R.K. Identification and characterization of phage PS166 lysogens from non-O1, non-O139 strains of *Vibrio cholerae*. *Med. Sci. Monit.* 2009; 15(10):BR281–8.
 11. Bhattacharya M.K., Dutta D., Bhattacharya S.K., Deb A., Mukhopadhyay A.K., Nair G.B., Shimada T., Takeda Y., Chowdhury A., Mahalanabis D. Association of a disease approximating cholera caused by *Vibrio cholerae* of serogroups other than O1 and O139. *Epidemiol. Infect.* 1998; 120(1):1–5. DOI: 10.1017/S0950268897008352.
 12. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.
 13. Bravo F.L., Fernández A., Ramírez M.M., Llop A., Martínez G., Hernández R.L., Cabrera L.E., Morier L., Fraga J., Núñez F.A., Aguila A. Microbiological characterization of non-O1 *Vibrio cholerae* isolated in Cuba. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2007; 59(3):227–33.
 14. Brownmick T.S., Das M., Ruppsch W., Stoeger A., Pietzka A.T., Allerberger F., Rodrigues D.P., Sarkar B.L. Detection of virulence-associated and regulatory protein genes in association with phage typing of human *Vibrio cholerae* from several geographical regions of the world. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58:1160–7. DOI: 10.1099/jmm.0.008466-0.
 15. Carri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.
 16. Ceccarelli D., Spagnoletti M., Hasan N.A., Lansing S., Huq A., Colwell R.R. A new integrative conjugative element detected in Haitian isolates of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Res. Microbiol.* 2013; 164(9):891–3. DOI: 10.1016/j.resmic.2013.08.004.
 17. Chandrasekhar M.R., Krishna B.V., Patil A.B. Changing characteristics of *Vibrio cholerae*: emergence of multidrug resistance and non-O1, non-O139 serogroups. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2008; 39(6):1092–7.
 18. Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri A., Chowdhury G., Bhattacharya M.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Klose K.E., Nandy R.K. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(4):1087–95. DOI: 10.1128/JCM.02026-08.
 19. Chen D.L., Zhang P., Wang D.C., Chen J., Yu B.Q., Cheng X.F., Diao B.W., Zhou H.J., Zhu M., Hu W.F., Zhan S.W., Jing H.Q., Kan B. Molecular analysis on non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2012; 33(12):1265–8. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.015.
 20. Chen Y.T., Tang H.J., Chao C.M., Lai C.C. Clinical manifestations of non-O1 *Vibrio cholerae* infections. *PLoS One.* 2015; 10(1):e0116904. DOI: 10.1371/journal.pone.0116904.
 21. Choi S., Dunams D., Jiang S.C. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(3):1015–22. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04502.x.
 22. Dalsgaard A., Albert M.J., Taylor D.N., Shimada T., Meza R., Serichantalergs O., Echeverria P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(10):2715–22.
 23. Dalsgaard A., Forslund A., Bodhidatta L., Serichantalergs O., Pitarangsi C., Pang L., Shimada T., Echeverria P. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogeneous non-O1, non-O139 O-serotypes. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122(2):217–26. DOI: 10.1017/S0950268899002137.
 24. Diep T.T., Nguyen N.T., Nguyen T.N., An H.K., Nguyen T.Q., Nguyen V.H., Nguyen T.V., Nguyen T.N., Izumiya H., Ohnishi M., Yamashiro T., Nguyen L.T. Isolation of New Delhi metallo-β-lactamase I (NDM-I)-producing *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain carrying ctxA, st, and hly genes in southern Vietnam. *Microbiol. Immunol.* 2015; 59(5):262–7. DOI: 10.1111/1348-0421.12248.
 25. Dutta D., Chowdhury G., Pazhani G.P., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Ranjendran K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya M.K., Mitra U., Takeda Y., Nair G.B., Ramamurthy T. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5):464–7. DOI: 10.3201/eid1903.121156.
 26. Finch M.J., Valdespino J.L., Wells J.G., Perez-Perez G., Arjona F., Sepulveda A., Bessudo D., Blake P.A. Non-O1 *Vibrio cholerae* infections in Cancun, Mexico. *Am. J. Med. Hyg.* 1987; 36(2):393–7.
 27. González Fraga S., Villagra de Trejo A., Pichel M., Figueroa S., Merletti G., Caffer M.I., de Castillo M.C., Binsstein N. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 isolates associated with diarrhea. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009; 41(1):11–9.

28. Halpern M., Senderovich Y., Izhaki I. Waterfowl – the missing link in epidemic and pandemic cholera dissemination? *PLoS Pathog.* 2008; 4(10):e1000173. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000173.
29. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(29):E2010–7. DOI: 10.1073/pnas.1207359109.
30. Hofer E., Quintaes B.R., dos Reis E.M., Rodrigues Ddos P., Seki L.M., Feitosa I.S., Ribeiro L.H., Ferreira M.R. The emergence of multiple antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* isolated from gastroenteritis patients in Ceará, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1999; 32(2):151–6.
31. Isac S.R., Nair G.B., Singh D.V. Purification and characterization of cytotoxin produced by a clinical isolate of *Vibrio cholerae* O54 TV113. *Appl. Biochem. Bacteriol.* 2012; 167(4):809–23. DOI: 10.1007/s12010-012-9718–4.
32. Li F., Du P., Li B., Ke C., Chen A., Chen J., Zhou H., Li J., Morris J.G. Jr, Kan B., Wang D. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 *Vibrio cholerae* aquatic isolates from China. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(16):4987–92. DOI: 10.1128/AEM.01021-14.
33. Li M., Shimada T., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2441-2453.2002.
34. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel).* 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.
35. Luo Y., Ye J., Jin D., Ding G., Zhang Z., Mei L., Octavia S., Lan R. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China. *BMC Microbiol.* 2013; 13:52. DOI: 10.1186/1471-2180-13-52.
36. Marin M.A., Thompson C.C., Freitas F.S., Fonseca E.L., Aboderin A.O., Zailani S.B., Quartey N.K.E., Okeke I.N., Vicente A.C.P. Cholera outbreaks in Nigeria are associated with multidrug resistant atypical El Tor and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(2):e2049. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002049.
37. Matsushita S., Noguchi Y., Yanagawa Y., Igarashi H., Morita K., Wada H., Watanabe N., Shibata M., Kanamori M., Kudoh Y., Shimada T. Sporadic diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 and characteristics of the isolates. *Kansenshogaku Zasshi.* 1997; 71(12):1204–9. DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi.1970.71.1204.
38. Melano R., Petroni A., Garutti A., Saka H.A., Mange L., Pasterán F., Rapoport M., Rossi A., Galas M. New carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(7):2162–8. DOI: 10.1128/AAC.46.7.2162-2168.2002.
39. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
40. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Mitra R., Basu A., Rajendran K., Dutta D., Bhattacharya S.K., Shimada T., Takeda T., Takeda Y., Nair G.B. Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcutta: a 3-year (1993 to 1995) analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(10):2537–43.
41. Octavia S., Salim A., Kurniawan J., Lam C., Leung Q., Ahsan S., Reeves P.R., Nair G.B., Lan R. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE.* 2013; 8(6):e65342. DOI: 10.1371/journal.pone.0065342.
42. Onifade T.J.M., Hutchinson R., Van Zile K., Bodager D., Baker R., Blackmore C. Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, March to April 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16(20):19870.
43. Panda S., Pati K.K., Bhattacharya M.K., Koley H., Pahari S., Nair G.B. Rapid situation & response assessment of diarrhoea outbreak in a coastal district following tropical cyclone AILA in India. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:395–400.
44. Ramamurthy T., Bag P.K., Pal A., Bhattacharya S.K., Bhattacharya M.K., Shimada T., Takeda T., Karasawa T., Kurazono H., Takeda Y., Karasawa T., Kurazono H., Takeda Y., Nair G.B. Virulence patterns of *Vibrio cholerae* non-O1 strains isolated from hospitalised patients with acute diarrhoea in Calcutta, India. *J. Med. Microbiol.* 1993; 39(4):310–7. DOI: 10.1099/00222615-39-4-310.
45. Ranjbar M., Rahmani E., Nooriamiri A., Gholami H., Golmohamadi A., Barati H., Rajabifar D., Barati S., Sabet M.S., Zamiri A., Haghighi S., Taifhashemi P., Nojomi M. High prevalence of multidrug-resistant strains of *Vibrio cholerae*, in a cholera outbreak in Tehran-Iran, during June–September 2008. *Trop. Doct.* 2010; 40(4):214–6. DOI: 10.1258/td.2010.100015.
46. Rudra S., Mahajan R., Mathur M., Kathuria K., Talwar V. Cluster of cases of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* O10 in east Delhi. *Indian J. Med. Res.* 1996; 103:71–3.
47. Saleh T.H., Sabbah M.A., Jassem K.A., Hammad Z.N. Identification of virulence factors in *Vibrio cholerae* isolated from Iraq during the 2007–2009 outbreak. *Can. J. Microbiol.* 2011; 157(12):1024–31. DOI: 10.1139/w11-094.
48. Sen M., Hajra T.K., Browmick P., Naskar P., Bag P.K. Evaluation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) glycohydrolase activity among the strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 1(2):46–9.
49. Schuster B.M., Tyzik A.L., Donner R.A., Striplin M.J., Almagro-Moreno S., Jones S.H., Cooper V.S., Whistler C.A. Ecology and genetic structure of a northern temperate *Vibrio cholerae* population related to toxigenic isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(21):7568–75. DOI: 10.1128/AEM.00378-11.
50. Sharma C., Thungapathra M., Ghosh A., Mukhopadhyay A.K., Basu A., Mitra R., Basu I., Bhattacharya S.K., Shimada T., Ramamurthy T., Takeda T., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:756–63.
51. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.
52. Sun J., Zhou M., Wu Q., Ni Y. Characterization of two novel gene cassettes, *dfrA27* and *aadA16*, in a non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolate from China. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(8):1125–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03060.x.
53. Theophilo G.N., Rodrigues Ddos P., Leal N.C., Hofer E. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2006; 48(2):65–70. DOI: 10.1590/S0036-46652006000200002.
54. Thungapathra M., Amita, Sinha K.K., Chaudhuri S.R., Garg P., Ramamurthy T., Nair G.B., Ghosh A. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(9):2948–55. DOI: 10.1128/AAC.46.9.2948-2955.2002.
55. Tjaniadi P., Lesmana M., Subekti D., Machpud N., Komalarini S., Santoso W., Simanjuntak C.H., Punjabi N., Campbell J.R., Alexander W.K., Beecham H.J. III, Corwin A.L., Oyofo B.A. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(6):666–70.
56. Udden S.M., Zahid M.S., Biswas K., Ahmad Q.S., Cravioto A., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(33):11951–6. DOI: 10.1073/pnas.0805560105.
57. Ulloa F.M.T., Porte L., Braun J.S., Dabanch P.J., Fica C.A., Henriquez A.T., Osorio A.C.G. Acute gastroenteritis caused by a *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain harboring a genetic region homologous to the Vpa1-7 pathogenicity island. *Rev. Chilena Infectol.* 2011; 28(5):470–3. DOI: 10.4067/S0716-10182011000600012.
58. Xu S.H., Li Y.X., Li S.T., Wu Q., Sun F.Q., Huang F., Zeng A.F. Epidemic condition and biological characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* in Haizhu District of Guangzhou. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 2010; 44(12):1087–90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2010.12.006.

Authors:

Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Монахова Е.В., Архангельская И.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 26.08.15.

А.Г.Рязанова, Л.Ю.Аксенова, Н.П.Буравцева, Т.М.Головинская, Е.И.Еременко, О.И.Цыганкова,
Н.Г.Варфоломеева, А.Н.Куличенко

СИБИРСКАЯ ЯЗВА: ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В 2015 г., ПРОГНОЗ НА 2016 г.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Представлены результаты анализа эпидемиологической и эпизоотологической ситуации по сибирской язве в мире в 2015 г. В Российской Федерации зафиксировано три случая заболевания людей кожной формой сибирской язвы. Зарегистрировано два эпизоотических очага с заболеванием трех сельскохозяйственных животных. В 2016 г. в Российской Федерации прогнозируется от одного до двадцати случаев заболевания людей сибирской язвой. Неблагополучная по сибирской язве обстановка сложилась в ряде стран ближнего и дальнего зарубежья. Наибольшие показатели заболеваемости животных и людей отмечены в странах Азии и Африки. Приведены результаты расследования ошибки лабораторной базы Министерства обороны США, повлекшей рассылку неэффективно обеззараженных образцов возбудителя сибирской язвы в лаборатории США и других государств на протяжении последних двенадцати лет.

Ключевые слова: сибирская язва, возбудитель сибирской язвы, вспышка, заболеваемость.

Корреспондирующий автор: Рязанова Алла Геннадьевна, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

A.G.Ryazanova, L.Yu.Aksenova, N.P.Buravtseva, T.M.Golovinskaya, E.I.Eremenko, O.I.Tsygankova,
N.G.Varfolomeeva, A.N.Kulichenko

Anthrax: Epidemiological and Epizootiological Situation in 2015, Prognosis for 2016

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Outlined are the results of assessment of epidemiological and epizootiological situation on anthrax across the globe in 2015. Three human cases of cutaneous anthrax were registered in the Russian Federation. Detected were two epizootic foci with three cases of live-stock animal disease. 1–20 cases of anthrax in humans are forecasted in the Russian Federation in 2016. Adverse as regards anthrax situation is created in a number of near and far abroad counties. The highest morbidity rates among animals and humans are reported from Asian and African countries. Discussed are the results of investigation into the blunder of the US Department of Defense laboratory system, resulted in distribution of ineffectively decontaminated samples of anthrax agent to the US laboratories, as well as of other states within the past twenty years.

Key words: anthrax, anthrax agent, outbreak, morbidity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alla G. Ryazanova, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Kulichenko A.N. Anthrax: Epidemiological and Epizootiological Situation in 2015, Prognosis for 2016. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:24–27. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-24-27

Заболеваемость людей в Российской Федерации. В 2015 г. в Российской Федерации зарегистрировано 3 случая заболевания сибирской язвой людей в одном субъекте Приволжского федерального округа. Это на 4 случая меньше по сравнению с 2014 г.

В мае 2015 г. на летней выгульной площадке в с. Репное Балашовского района Саратовской области был произведен несанкционированный убой заболевшего бычка. Мясо без проведения ветеринарно-санитарной экспертизы было распределено между четырьмя семьями, а шкура животного сдана заготовителю кожевенного сырья. У трех человек, осуществлявших вынужденный убой и разделку туши животного, диагностирована кожная форма сибирской язвы. Диагноз был установлен на основании эпидемиологического анамнеза, клинической картины, выделения культуры возбудителя сибирской язвы из материала от одного больного, положительных результатов ПЦР с клиническим материалом, а также выделения культур из проб мяса и объектов окружающей

среды с места прирезки. Анализы были проведены Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб» и ветеринарной службой Саратовской области. В комплекс противоэпидемических и профилактических мероприятий включено медицинское наблюдение и проведение экстренной антибиотикопрофилактики лицам, контактировавшим с мясом и употреблявшим его в пищу.

Заболеваемость сельскохозяйственных животных в Российской Федерации. По данным Россельхознадзора, в 2015 г. на территории Российской Федерации заболевания сибирской язвой сельскохозяйственных животных зарегистрированы в двух федеральных округах – Центральном и Приволжском. В Белгородской области (Чернянский район) заболевание выявлено в частном секторе у одной головы мелкого рогатого скота (МРС), не вакцинированной против сибирской язвы. В с. Репное Балашовского района Саратовской области, являющимся стационарно неблагополучным по сибирской язве пунктом

(с последним проявлением активности в 1961 г.), сибирская язва зафиксирована у 2 из 37 голов вакцинированного крупного рогатого скота (КРС). Проведен комплекс противоэпизоотических мероприятий по локализации и ликвидации очагов.

В 2015 г. профилактическая вакцинация сельскохозяйственных животных против сибирской язвы осуществлялась во всех субъектах Российской Федерации.

Заболеемость людей в приграничных с Российской Федерацией государствах. В 2015 г. кожная форма сибирской язвы зарегистрирована у 2 жителей Армении, контактировавших с мясом КРС, приобретенным на территории Грузии. В четырех областях Кыргызстана зафиксировано 15 случаев заражения сибирской язвой при контакте с больным КРС в процессе убоя и разделки туш. В трех районах Молдавии в результате вынужденного убоя КРС и МРС сибирской язвой заболели 5 человек. Сообщалось также о заболевании двух человек, проводивших вынужденный убой скота в Каракалпакстане, и 19 госпитализированных после употребления в пищу мяса больных сельскохозяйственных животных в Самаркандской области Узбекистана. В двух провинциях Китая сибирской язвой заболели 29 человек после контакта с заболевшими животными, тушами и продуктами животного происхождения.

Заболеемость сельскохозяйственных животных в приграничных с Российской Федерацией государствах. Случаи заболевания сибирской язвой зарегистрированы в Белоруссии (1 голова КРС), Грузии (6 вспышек в 4 районах – 25 голов КРС), Казахстане (КРС, количество вспышек и вовлеченных животных не указано), Китае (5 вспышек в 4 провинциях – 45 КРС, 10 МРС, 1 мул), Кыргызстане (в 4 областях – КРС), Молдавии (4 вспышки в 4 районах – КРС, МРС), Монголии (24 вспышки на 7 территориях – 18 КРС, 23 МРС, 78 лошадей), Таджикистане (2 вспышки в 2 областях – 2 КРС), Узбекистане (2 вспышки в 2 областях – КРС).

Заболеемость людей в странах дальнего зарубежья. В Болгарии сибирской язвой заболели и скончались 2 человека. Оба случая заболевания пришлось на северо-восточную часть государства. Первый случай заболевания выявлен в июле (Варненская область), инфицирование произошло в процессе вынужденного убоя одной головы КРС в частном подворье и, возможно, употребления мяса в пищу. В ходе эпидемиологического расследования установлено, что хозяин прирезанного животного сдал мясо в нелегальный мясоперерабатывающий цех, откуда оно было доставлено в розничные магазины, рестораны, киоски быстрого питания трех населенных пунктов и курорта Золотые Пески, всего на 23 объекта. Все заведения были закрыты для проведения заключительной дезинфекции. Исследования материала на наличие возбудителя сибирской язвы от 28 человек, употреблявших в пищу блюда, при-

готовленные из инфицированного мяса, показали отрицательные результаты. Второй случай заболевания с летальным исходом зарегистрирован в сентябре (Добричская область). Заражение собственницы скота произошло при несанкционированном убое заболелой овцы, в процессе которого женщина получила резаную рану кисти руки.

Кожная форма выявлена у нескольких фермеров в Аргентине, проводивших разделку туш павшего КРС. В Марокко выявлено 9 случаев заболевания кожной формой, связанных с уходом за больным скотом. В Турции кожная форма сибирской язвы диагностирована у 5 человек, контактировавших с больными животными в процессе убоя и разделки туш.

Два летальных случая зафиксированы в Гвинее после употребления в пищу мяса больного скота. В связи с употреблением в пищу мяса павшего КРС в западной Замбии заболели 18 человек, в Зимбабве – 48. Свыше 80 человек заболели и, как минимум, 8 из них скончались после употребления инфицированного мяса в Индии. Трое жителей Южного Судана скончались на территории Уганды, куда прибыли для получения квалифицированной медицинской помощи, от гастроинтестинальной формы сибирской язвы, развившейся после употребления мяса и молока больных, предположительно, диких животных. В Кении в результате снятия шкуры с павшего КРС 4 человека заболели, двое из них скончались; кроме этого, госпитализировано 83 человека, заболевших в результате употребления в пищу мяса больных животных. В Перу сибирской язвой заболело 54 человека в связи с контактом с павшим скотом и/или употреблением инфицированного мяса.

Заболеемость животных в странах дальнего зарубежья. В 2015 г. сибирская язва сельскохозяйственных животных регистрировалась повсеместно. В Азии вспышки заболевания зафиксированы в Афганистане (178 вспышек на 19 административных территориях – пало/вынужденно забито 622 головы МРС в I полугодии, далее – данные отсутствуют), Бутане (1 вспышка – 5 голов КРС), Израиле (1 вспышка – 1 голова КРС), Индии (множество вспышек в 7 регионах с вовлечением большого количества КРС, МРС, свиней), Иордании (13 вспышек на 1 территории – 13 МРС, 2 собаки), Китае (5 вспышек в 4 провинциях – 45 КРС, 10 МРС, 1 мул), Сирии (4 вспышки – 11 КРС), Турции (21 вспышка в 16 регионах – 45 КРС, 19 МРС).

В Африке эпизоотические очаги выявлены в Буркина-Фасо (4 вспышки на 1 территории – 5 КРС), Гане (3 вспышки в 1 районе – 49 КРС), Гвинее (8 вспышек в 6 регионах – 71 КРС, 45 МРС), Гвинее-Бисау (6 вспышек – 23 КРС), Зимбабве (18 вспышек в 4 округах – 116 КРС), Замбии (3 вспышки в 3 районах западной провинции – КРС), Кении (9 вспышек на 6 территориях – 45 КРС, 5 МРС, несколько собак, которых кормили мясом павшего скота), Мали (2 вспышки на 1 территории – 11 КРС), Марокко (2 вспышки в 2 районах – 2 КРС), Намибии (1 вспышка – 1 КРС),

Республике Нигер (4 вспышки в 1 округе – 25 МРС), Танзании (1 вспышка – 1 КРС), Южном Судане (1 вспышка – 11 КРС), Конго, Сенегале, Центральной Африканской Республике, Чаде (количество вспышек и вовлеченных животных не указано).

В Европе сибирская язва у животных диагностирована в Болгарии (4 вспышки в 3 регионах – 3 МРС, 2 КРС), Великобритании (1 вспышка – 2 КРС), Венгрии (2 вспышки в 2 регионах – 4 МРС), Италии (1 вспышка – 3 МРС), Македонии (1 вспышка – 1 КРС), Словении (2 вспышки на 2 территориях – 8 КРС).

Сибирская язва зарегистрирована в таких странах Южной Америки, как Аргентина (5 вспышек на одной территории – 191 КРС), Парагвай (3 вспышки в 3 округах – 6 КРС), Перу (1 вспышка – 6 КРС, а также МРС), Уругвай (1 вспышка – 1 КРС), Чили (2 вспышки в 2 регионах – 5 КРС), Коста-Рика (количество вспышек и вовлеченных животных не указано).

Заболевания скота выявлены также в государствах Северной Америки: Канаде (вспышки на 2 территориях – 15 КРС), США (4 вспышки в 3 штатах – 4 КРС, 1 лошадь), а также в Австралии (2 вспышки в 2 штатах – 2 КРС).

Случаи заболевания сибирской язвой диких животных отмечались в Кении (300 буйволов, а также носороги, жирафы, бородавочники, газели, несколько видов антилоп), Южной Африканской Республике (285 животных в Национальном парке Крюгера в I полугодии – 240 особей различных видов антилоп, 32 зебры, 8 павианов, 2 слона, 2 буйвола, 1 гиена), Канаде (57 бизонов), Индии (свыше 30 слонов), Ботсване (3 слона).

Лабораторная ошибка. В 2015 г. в США зафиксированы новые факты лабораторной ошибки при обращении со штаммами возбудителя сибирской язвы. Так, лабораторной базой Министерства обороны США (МО США) при полигоне Дагуэй в штате Юта (Life Sciences Division at Dugway Proving Ground, Utah – DPG-LSD) подготовлены и разосланы в ряд лабораторий США и иностранных государств панели образцов, которые, как подразумевалось, содержали обеззараженные штаммы возбудителя сибирской язвы. Практика рассылки образцов в лаборатории, занимающиеся разработкой и апробацией новых современных средств детекции и идентификации биологических угроз в пробах объектов окружающей среды, в том числе сибиреязвенного микроба, является обычной для МО США. Спустя месяц после получения образцов, одна из лабораторий обратилась в Центр по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) с заявлением о наличии жизнеспособных спор *Bacillus anthracis* в полученных пробах. Проверка CDC при поддержке МО США подтвердила факт наличия в образцах низких концентраций жизнеспособных спор возбудителя сибирской язвы.

В период с 2004 по 2015 год DPG-LSD подготовлены 86 партий образцов *B. anthracis*, при повторной проверке 33 из них специалистами CDC было выяв-

лено 17 партий, содержащих жизнеспособные споры сибирской язвы, при этом сертификаты, подтверждающие обеззараженность материала, были выданы специалистами DPG-LSD на каждую из 86 партий.

Дальнейшее расследование выявило контаминацию спорами сибиреязвенного микроба объектов окружающей среды за пределами лабораторного помещения DPG-LSD, в котором проводилась подготовка образцов. Следственная группа также выявила ряд институциональных факторов, которые способствовали инциденту: серьезные нарушения организации и управления лабораторной службы, надзорных функций, неадекватная частота и объем контроля качества лабораторных процедур, недостаточное финансирование, приведшее к сокращению персонала, в результате которого на сотрудников возложены дополнительные обязанности, неполное выполнение которых, а также нечеткое следование стандартным операционным процедурам привело к неэффективному осуществлению критичных процессов. На основании совокупной информации, полученной в ходе расследования случившегося, CDC приостановило для DPG-LSD действие регистрационного свидетельства, дающего право на работу с возбудителем сибирской язвы, а позже и разрешительного свидетельства на работу со всем перечнем опасных ПБА. МО США охарактеризовало случившееся как «масштабный ведомственный провал в обращении военно-медицинских лабораторий США с возбудителями особо опасных инфекций».

В Российской Федерации 2015 год характеризовался невысокой заболеваемостью сибирской язвой людей и сельскохозяйственных животных. Инфицирование людей произошло при контакте с больными животными в процессе несанкционированного вынужденного убоя и разделки туш скота.

Среди приграничных стран, в которых регистрировалась сибирская язва у людей, наибольшее количество случаев пришлось на государства Средней Азии. Лидирующее место по числу заболевших людей в дальнем зарубежье принадлежит Азии и Африке. Заражение происходило преимущественно в результате убоя больных сельскохозяйственных животных, в странах со сложной экономической ситуацией связано также с употреблением в пищу мяса больных животных.

Эпизоотии сибирской язвы среди сельскохозяйственных животных регистрировались в мире повсеместно. В видовой структуре заболевших животных преобладал крупный рогатый скот. Вспышки заболевания среди диких животных отмечены в странах Африки, Азии, Северной Америки. В Болгарии имела место поставка зараженного мяса в торговую сеть и на объекты общественного питания.

Лабораторная ошибка, повлекшая рассылку неэффективно обеззараженных образцов штаммов возбудителя сибирской язвы в лаборатории США и ряда зарубежных стран, в очередной раз показала важность неукоснительного соблюдения регламен-

тированных протоколов инактивации проб штаммов возбудителей опасных инфекционных болезней и тщательной проверки образцов после процедуры обеззараживания на специфическую стерильность перед их анализом с использованием современных методов исследования и, особенно, перед передачей в подразделения или организации низкого уровня биологической безопасности.

Учитывая эпизоотолого-эпидемиологическую обстановку по сибирской язве в Российской Федерации в последнее десятилетие, можно прогнозировать в 2016 г. от 1 до 20 случаев заболевания людей. Эпизоотологическое неблагополучие в странах ближнего и дальнего зарубежья создает потенциальную опасность завоза в Российскую Федерацию больных животных, а также контаминированного

сырья и продуктов животного происхождения.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Authors:

Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Об авторах:

Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Варфоломеева Н.Г., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Поступила 18.03.16.

А.П.Семакова, Н.И.Микшис

АДЬЮВАНТНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОЗДАНИИ СОВРЕМЕННЫХ ВАКЦИН

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов. Российская Федерация

Важнейшей задачей вакцинологии является поиск новых адъювантов, действующих непосредственно на иммунокомпетентные клетки и стимулирующих формирование выраженного адаптивного иммунного ответа. Адъюванты применяются в вакцинах для усиления иммунного ответа уже на протяжении столетия. На различных стадиях испытаний находится немало современных адъювантов, способных не только усиливать поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками (АПК) или доставлять его в зоны локализации иммунокомпетентных клеток, но и выступать в качестве непосредственных иммуноактиваторов. При выборе адъюванта особое внимание уделяется эффективности активации иммунологической памяти, способности к комплексной стимуляции Th1 и Th2 иммунного ответа, обеспечению выраженного иммунного ответа при снижении дозы вакцины и кратности введения, отсутствию токсичности для организма. На сегодняшний день предпочтение отдается модификаторам функций рецепторов врожденного иммунитета и их сигнальных путей.

Ключевые слова: адъюванты, вакцины, врожденный и приобретенный иммунитет.

Корреспондирующий автор: Семакова Анна Петровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru

A.P.Semakova, N.I.Mikshis

Adjuvant Technologies in the Construction of Advanced Vaccines

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Overarching objective of vaccinology is a search of new adjuvants, directly influencing immune-competent cells and stimulating expressed adaptive immune responses. Adjuvants have been used for the enhancement of immune response for over a hundred years. A considerable number of recent adjuvants capable not only to reinforce antigen intake by antigen-presenting cells (APC) or deliver it to the sites of immune-competent cell localization, but also acting as immediate immune activators, are at various stages of trials. When selecting an adjuvant a special attention should be given to the efficacy of immunological memory activation, capacity for complex Th1 and Th2 stimulation, provision for expressed immune response in the context of vaccine dose tapering and lowering of the frequency of administration, and innocuousness for the organism. Nowadays preference is set on the modifiers of functions and signaling pathways of innate immunity receptors.

Key words: adjuvants, vaccines, innate and adaptive immunity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anna P. Semakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Semakova A.P., Mikshis N.I. Adjuvant Technologies in the Construction of Advanced Vaccines. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:28–35. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-28-35

Создание вакцин нового поколения основано на современных представлениях о физиологии бактерий и вирусов, использовании достижений молекулярной биологии, геномики, протеомики, прикладной и теоретической иммунологии. Новые технологии и подходы становятся неотъемлемой частью конструирования вакцин для защиты от различных инфекционных болезней, в том числе особо опасных, борьбы с пандемиями и актами биотерроризма [37].

Конструирование вакцинных препаратов на основе иммуногенных антигенов, синтезируемых рекомбинантными продуцентами, в значительной мере решило проблему остаточной вирулентности и реактогенности. Однако исследования последних десятилетий показали, что продукты геномных технологий обладают недостаточной иммуногенностью, в том числе вследствие отсутствия у них патоген-ассоциированных молекулярных структур микроорганизмов, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета. Стимуляция структур врожденного иммунитета инициирует каскад реакций, запускающих развитие адаптивного иммуните-

та. Следовательно, вакцины на основе рекомбинантных иммуногенных антигенов требуют включения в рецептуру веществ, неспецифически усиливающих иммунный ответ [4]. В современный период важнейшим направлением вакцинологии является поиск и внедрение в практику новых адъювантов, действующих непосредственно на иммунокомпетентные клетки и стимулирующих формирование выраженного адаптивного иммунного ответа.

Разработка адъювантов прошла путь от первых эмпирических экспериментов до целенаправленного конструирования на основе современных представлений о взаимодействиях макро- и микроорганизмов. Слово «адъювант» происходит от латинского глагола «adjuvare», который означает «помогать» или «усиливать». Адъюванты применяются в вакцинах уже на протяжении столетия. Еще в 1916 г. Le Moignic и Pinoy опубликовали данные о способности эмульсии минеральных масел повышать иммунный ответ на антигены. Понятие «иммунологический адъювант» введено в двадцатых годах прошлого века. G.Ramon обратил внимание, что у лошадей на месте инъекции

дифтерийного анатоксина в комбинации с определенными веществами образуется абсцесс, при этом отмечается более выраженная и длительная выработка антител. В 1926 г. A. Glenny *et al.* продемонстрировали адъювантный эффект солей алюминия, комбинируя дифтерийный анатоксин с квасцами. В 1936 г. был разработан полный адъювант Фрейнда, в состав которого входили убитые микобактерии в эмульсии из воды и минерального масла. В 1950 г. A. Johnson *et al.* обнаружили, что липополисахариды из грамотрицательных бактерий или родственные соединения, такие как липид А, обладают иммуностимулирующим эффектом [7]. В настоящее время на стадии испытаний находится немало современных адъювантов, способных не только усиливать поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками (АПК) или доставлять его в зоны локализации иммунокомпетентных клеток, но и выступать в качестве непосредственных иммуноактиваторов.

Все природные и синтетические соединения, обладающие способностью стимулировать иммунный ответ, как правило, классифицируют по механизму действия, или по физико-химическим свойствам [35]. Классификация по механизму действия делит адъюванты на три группы: активные иммуностимуляторы, действующие непосредственно на иммунокомпетентные клетки, прежде всего АПК; носители – иммуногенные продукты, активирующие Т-клетки; адъюванты, обладающие транспортными свойствами, такие как эмульсии или липосомы, которые служат в качестве матрицы для антигенов и доставляют его к иммунокомпетентным клеткам. Наиболее часто используемая классификация по физико-химическим и биологическим свойствам подразделяет адъюванты на минеральные; бактериальные, комбинированные, масляные эмульсии, корпускулярные, синтетические, цитокиновые. Иногда адъюванты в зависимости от пути введения вакцинного препарата, частью которого они являются, подразделяют на мукозальные (через слизистую оболочку) и парентеральные.

Минеральные адъюванты. В группу минеральных адъювантов входят гидроксид алюминия, фосфат алюминия, кальция фосфат и т.д. Соли алюминия многие десятилетия были практически единственным общепринятым адъювантом. Взаимодействуя с антигеном, они функционируют как «депо» иммуногенного вещества, постепенно доставляя его в зоны локализации иммунокомпетентных клеток. Возникающие в области введения адъюванта воспалительные реакции способствуют макрофагальному транспорту антигена к лимфатическим тканям. Адъювантная активность направлена на гуморальный ответ, который развивается по Th2 типу и сопровождается продукцией интерлейкинов (IL), в частности IL-4, IL-5, IL-10, и антител класса G1, E [11]. Механизм сдвига в сторону Th2 фенотипа не связан с функцией дендритных клеток, а является результатом подавления Th1 ответа. Рецепторы врожденного иммунитета, например, толл-подобные рецепторы

(toll-like receptors, TLR) не реагируют на данный адъювант. В свете накапливающихся современных данных механизм действия солей алюминия не может быть объяснен исключительно классической теорией «депо» и, очевидно, будет дополнен. Соли алюминия используют при промышленном производстве большинства вакцин во всем мире. Они входят в состав различных вакцинных препаратов: дифтерийно-коклюшно-столбнячной, дифтерийно-столбнячной, дифтерийно-столбнячно-гепатитной, инактивированной полиомиелитной, пневмококковой конъюгированной, гриппозной вакцин, четырехвалентной вакцины против вируса папилломы человека, вакцин против гепатита А и В, лицензированных сибиреязвенных химических вакцин AVA (anthrax vaccine adsorbed, BioThrax, США) и AVP (anthrax vaccine precipitated, Великобритания), отечественной комбинированной сибиреязвенной вакцины и др. Основные недостатки алюминиевых адъювантов заключаются в отсутствии воздействия на клеточный иммунитет. Несмотря на длительное использование препаратов, ученые продолжают изучать вопросы безопасности соединений алюминия, в частности, взаимодействие между алюминием и ртутью, которая входит в состав некоторых вакцин, и влияние этого сочетания на отдельные органы и ткани организма человека. В последнее время появляется все больше экспериментальных работ, подвергающих сомнению абсолютную безопасность солей алюминия для макроорганизма [39].

Бактериальные адъюванты. В качестве бактериальных адъювантов используются субстанции бактерий и грибов. Установлено, что адъювантной активностью обладают различные компоненты бактериальной клеточной стенки. В первую очередь, это пептидогликаны и липополисахариды. Пептидогликаны получают из клеточных стенок таких бактерий, как *Bordetella pertussis* или *Corynebacterium parvum*. Активным началом является мурамил-дипептид, стимулирующий как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [9]. Адъювантную активность липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий связывают со структурным элементом – липидом А. В слабокислой среде он гидролизует в нетоксичный монофосфорилированный липид (MPL). Получают MPL из ЛПС мутантного штамма *Salmonella minnesota*. Безопасность MPL подтверждена многочисленными клиническими исследованиями. MPL входит в состав экспериментальных вакцин против вируса герпеса, вируса папилломы человека и целого ряда противоопухолевых вакцин. Сообщалось, что еженедельные в течение трех месяцев инъекции MPL линейным мышам с заболеванием, аналогичным человеческой болезни Альцгеймера, приводят к существенному сокращению (на 80 %) амилоидных бляшек в тканях мозга и улучшению когнитивной функции у животных [48]. Предположительно MPL может применяться для замедления прогрессирования болезни Альцгеймера и в качестве превентивной

меры для людей с высоким фактором риска развития болезни [33].

Адьюванты на основе компонентов клеточных стенок бактерий способны взаимодействовать с рецепторами системы врожденного иммунитета, включая TLR. Эти распознающие образ рецепторы (pattern recognition receptors, PRRs) широко распространены в клетках макроорганизма. TLR экспрессированы на клетках первой линии защиты от инфекции – макрофагах, эозинофилах, дендритных и тучных клетках, эпителии слизистых оболочек и эндотелии кожи. Они ассоциированы с молекулярными структурами, контролирующими распознавание и деструкцию внедряющихся патогенов. TLR взаимодействуют с высококонсервативными, присущими патогенным микроорганизмам паттернами (pathogen-associated molecular patterns – PAMP) и эндогенными молекулами опасности. В результате активации TLR происходит широкий спектр биологических реакций – от индукции синтеза противовоспалительных цитокинов и интерферона (обеспечивающие реализацию реакций врожденного иммунитета) до экспрессии костимулирующих молекул, которые являются промоторами Т-клеточной активации и определяют развитие адаптивного иммунного ответа [42]. Адьюванты на основе компонентов клеточных стенок бактерий за счет особых молекулярных структур активируют TLR 4 типа, что является сигналом к запуску усиленной секреции воспалительных цитокинов и хемокинов. Сигнализация TLR индуцирует созревание макрофагов и дендритных клеток, экспрессию костимулирующих молекул CD40, CD80, CD86 и направляет развитие иммунного ответа по Th1 типу.

Комбинированные адьюванты. Экспериментально установлено, что при комбинации адьювантов суммируется их активность и это ведет к усилению стимулирующего действия [46]. Важно, что, комбинируя адьюванты, можно ориентировать Th ответ по требуемому типу. Комбинация гидроокиси алюминия и MPL зарегистрирована как разрешенный для человека адьювант SBA54 (ранее ASO4). Адьювантная система была тестирована в различных вакцинах. Впервые адьювант ASO4 был включен в состав вакцины против гепатита В, разработанной для пациентов с заболеванием почек. Клинические испытания показали, что использование адьювантной системы ASO4 приводит к повышению титров специфических антител при условии уменьшения количества доз, установленного для подобной вакцины с соединениями алюминия [43]. Адьювант ASO4 входит также в состав вакцины против вируса папилломы человека. Данный препарат индуцирует выраженный гуморальный и клеточный иммунный ответ продолжительностью более 3 лет [21]. Вакцина одобрена в США, Европе и некоторых других странах.

Иммуностимулирующим свойством обладает белковый компонент бактерий, обеспечивающий их подвижность, – флагеллин. Он является агонистом TLR 5-го типа. В частности, в доклинических ис-

пытаниях химической вакцины для специфической профилактики чумы показана эффективность использования в качестве адьюванта флагеллина из рекомбинантного штамма *Salmonella*. В эксперименте у макак циномогус, иммунизированных прототипом вакцины, отмечали выраженный антительный ответ, при заражении вирулентным штаммом возбудителя чумы выжило 100 % животных [27].

Масляные адьюванты. Среди масляно-водных или водно-масляных эмульсионных адьювантов наиболее широко известен адьювант Фрейнда. Полный адьювант Фрейнда (ПАФ) состоит на 85 % из минерального масла. В него входят также моноолеат маннита с термоинактивированными *Mycobacterium tuberculosis*. Механизм действия ПАФ основан на формировании резервуара антигена, защищенного от деградации. Бактериальные компоненты адьюванта активируют Т-клеточный ответ [41]. Существенным недостатком ПАФ являются системные и локальные побочные реакции, в связи с этим он не используется в медицинской и ветеринарной практиках. Применение ПАФ в экспериментах на животных ограничено рамками различных нормативных документов.

В качестве альтернативы ПАФ разработан ряд препаратов с похожим механизмом действия, но менее токсичных. Система TiterMax представляет собой водно-масляную эмульсию кополимера CRL-8041 и масла сквалена. В структуру кополимера входят гидрофобный полиоксипропилен и гидрофильный полиоксиэтилен. Кополимеры, в отличие от других поверхностно-активных антигенов, менее токсичны из-за эластичности структуры, малой гидрофобной активности, слабости межмолекулярных взаимодействий и небольшого количества заряженных групп. Биологическая особенность препарата заключается в концентрации значительно большего количества антигена по сравнению с растворимой формой. Адьювант, воздействуя на комплемент, активизирует иммунореактивные клетки, способствует усиленной экспрессии молекул комплекса гистосовместимости II класса на макрофагах, усиливая презентацию антигена Е-клеткам [24]. Адьювантная система Ribi представлена различными продуктами. В ее составе содержатся минимальные количества масла и поверхностно-активный Tween 80 [14]. В качестве иммуномодуляторов введены поверхностные структуры микроорганизмов – экстракты бактериальной стенки микобактерий, грамотрицательных бактерий (MPL), комплекс высокомолекулярных гликолипидов, экстрагированных из сапрофитов *M. phlei*, компонент эндотоксина грамотрицательных бактерий. Ключевым элементом адьювантной активности системы Ribi является MPL. Адьювант MF59, производимый компанией Novartis, представляет собой масляно-водную микроэмульсию. Он включает сквален и поверхностно-активные вещества Tween 80 и Span 85 [16]. В основе адьювантного действия лежит привлечение в зону инъекции макрофагов и

дендритных клеток. Данная композиция входит в состав инактивированной противогриппозной вакцины FLAUD, которая производится с 1997 г. корпорацией Chiron. Препарат утвержден учреждениями здравоохранения в нескольких европейских странах [45], включен в состав экспериментальных вакцин против ВИЧ-инфекции, вирусов герпеса и гриппа с предполагаемым пандемическим потенциалом. Масляный адъювант Syntex Adjuvant Formulation (SAF) избирательно стимулирует гуморальный иммунный ответ и образование IgG у лабораторных мышей. Лучший эффект достигается при взаимодействии с белками, обладающими гидрофобным эффектом. В эту же группу входят монтаниды – масляные адъюванты, у которых различные поверхностно-активные вещества комбинируются с неметаболизированным или метаболизированным минеральным маслом. Разновидности монтанидов различаются соотношением масляной и водной фаз в масляно-водных или водно-масляно-водных эмульсиях.

Корпускулярные адъюванты. В особую группу выделяют корпускулярные адъюванты. Установлено, что некоторые природные частицы помогают формировать депо антигенов, тем самым усиливая иммунный ответ на них. В частности, инкапсулировать и транспортировать антигены способны липосомы – двухслойные структуры, содержащие холестерол и фосфолипид [36]. Присоединенные к оболочке иммуногенные антигены стимулируют продукцию цитотоксичных Т-лимфоцитов. Активность липосом повышается при сочетании их с растворимыми иммуномодуляторами. В качестве адъювантов используются также наночастицы и иммуностимулирующие комплексы.

Разработка адъювантов на основе частиц фитовирусов является перспективным направлением в области новых биотехнологий в медицине. Использование природных биodeградируемых белковых фитовирусных структур дает преимущество в эффективности иммунного ответа и в технологии производства (в сравнении с минеральными и масляными адъювантами). Фитовирусы являются доступным, дешевым и удобным объектом для разработки новых биотехнологий. Из-за отсутствия общих патогенов у растений и человека такие частицы биологически безопасны, кроме того они биodeградируемы, высокостабильны, высокоиммуногенны и не имеют аналогов и прототипов в природе и технике [30]. Растительное происхождение имеет гликозид сапонин, его экстрагируют из коры деревьев. Неочищенный водный экстракт коры растения *Guillaja saponaria* токсичен, а получаемый из него иммуностимулирующий комплекс Guil A и очищенный препарат GS-21 усиливают иммуногенность протеиновых, гликопротеиновых и полисахаридных антигенов, стимулируют секрецию IL-1 и IL-6, влияющих на клеточный и гуморальный иммунный ответ [20]. Адъювант GS-21 прошел клинические испытания в составе вакцин против малярии, гепатита, гриппа, иммунодефицитных состояний и

некоторых видов новообразований. Исследуются комбинированные адъюванты, содержащие сапониновые эмульсии и MPL. Они входят в состав экспериментальных вакцин против малярии и туберкулеза [18, 40]. Разработан иммуностимулирующий комплекс (ISCOMS), представляющий собой сферические структуры, как правило, 40 нм в диаметре, которые самопроизвольно образуются при смешивании в определенном соотношении холестерина, фосфолипидов и сапонинов.

Синтетические адъюванты. Адъювантной активностью обладает также бактериальная ДНК с высоким содержанием CpG мотивов. CpG-ОДН (цитозин-гуанин олигодезоксинуклеотиды) можно синтезировать по известным нуклеотидным последовательностям. Последовательности CpG – олигонуклеотиды, несущие тиофосфорильные модификации, взаимодействуют с TLR 9-го типа и индуцируют иммунный ответ, переключая Th2 на Th1. Активируя систему врожденного иммунитета, CpG-ОДН существенным образом повышают уровень иммунного ответа даже на низкоиммуногенные антигены [2]. Считается, что ДНК с неметилированными мотивами может быть лучшим клеточным адъювантом, воздействующим на клеточные рецепторы. Достоинством CpG-ОДН является отсутствие выраженной токсичности [10, 28]. На этом основании применение CpG-ОДН в качестве адъюванта одобрено Глобальным консультативным комитетом по безопасности вакцин ВОЗ. Комбинация CpG с различными носителями: наночастицами, микросферами, липосомами и т.п. способствует еще большей активации антиген-специфического ответа.

Для объяснения иммуностимулирующей активности CpG была выдвинута теория «сигнала опасности», согласно которой бактериальная ДНК, попав в организм, воспринимается иммунной системой как патогенный агент, способный вызывать инфекционный процесс. Реакция организма на ДНК, обогащенную неметилированными CpG мотивами, в первую очередь, заключается в стремительной и мощной активации различных неспецифических механизмов иммунологической защиты, представляющих собой первую «линию обороны» против инфекционных возбудителей, паразитов и трансформированных клеток. Непосредственно или как ко-стимулирующий сигнал, CpG-ОДН активируют фактически все клетки иммунной системы [31]. Поглощаясь клетками иммунной системы, CpG-ОДН специфически взаимодействует с TLR 9-го типа, присутствующих в цитоплазматических эндцитозных везикулах, что приводит к стремительной генерации реактивных форм кислорода и активации NO-синтазы. Дальше TLR-опосредованная активация иммунокомпетентных клеток происходит через сигнальный каскад, вовлекающий MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) и такие сигнальные молекулы, как IL-1, IRAK (receptor-activated kinase) и TRAF6 (tumour-necrosis factor receptor-associated factor 6).

Кульминацией в этом сигнальном каскаде является активация нескольких транскрипционных факторов, включая nuclear factor- κ B и activating protein 1 [50].

Синтетические CpG входят в состав экспериментальных вакцин, допущенных к испытаниям на людях. В частности, в настоящее время на стадии клинических испытаний находится препарат AV-7909, представляющий собой химическую сибиреязвенную вакцину AVA с добавлением CpG 7909 (другое название CpG 2006) [34,38]. Иммуностимулирующие свойства CpG-ОДН принимаются во внимание и при конструировании современных рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы [6, 8]. Сообщалось, что интраназальное профилактическое введение линейным мышам CpG (без антигенов) за 1 день до экспериментального моделирования бубонной чумы (подкожное заражение вирулентным штаммом возбудителя чумы) обеспечивает существенную защиту от развития патологических процессов в макроорганизме [25]. Показано, что добавление CpG 7909 в коммерческие вакцины против гепатита В (Engerix-B) и гриппа (Fluarix) усиливает иммунный ответ и, следовательно, позволяет уменьшить дозировку препаратов [22]. Эффективность CpG в качестве адъюванта или средства монотерапии исследована в клинических испытаниях препаратов при раке легкого, Т-клеточной лимфоме, карциноме почек, гепатите С, пыльцевой аллергии и т.д. [17, 29, 32]. CpG-ОДН рассматриваются как оптимальная платформа для комбинированных адъювантов. Сочетание CpG-ОДН и MF59 потенцирует иммунный ответ на антиген p55 вируса иммунодефицита человека [12].

Соединение полиэтилена и азота – полиэтиленмин (ПЭИ), активно используется биологами в генной терапии. К вирусам, предназначенным для избирательного проникновения в пораженные клетки, добавляют полиэтиленмины, при этом иммунная реакция организма многократно усиливается. В частности, этот эффект был использован при разработке вакцины против ВИЧ. Исследования проводили на мышах, иммунизированных вакциной без адъюванта, с добавлением эффективного адъюванта стрептавидина, с добавлением ПЭИ. В результате у мышей, получавших вакцину с ПЭИ, количество антител оказалось соответственно в 100 и 6 раз больше, чем в группах животных, иммунизированных вакциной без адъюванта и с добавлением стрептавидина. Эффективности ПЭИ оценивалась также в составе вакцин против вирусов герпеса и гриппа. В этих случаях однократная иммунизация обеспечивала 100 % защиту от смертельных доз вирусов. Такой результат не возможно было достичь при использовании других адъювантов [49].

Полиоксидоний – производное пиперазина (N-окисленного полиэтилена) является эффективным иммуномодулятором с комбинацией фармакологических свойств. Уникальные свойства полиоксидония заключаются в регулировании его действия в зависимости от состояния иммунной системы. Эффект

полиоксидония заключается во влиянии на функциональную активность фагоцитов периферической крови человека. В этой связи препарат эффективно применяется для профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций [5]. В России производится сезонная вакцина против гриппа, в состав которой вместо полиоксидония включен адъювант совидон – сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина. Вещество обладает иммуномодулирующими, детоксицирующими, антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами. В соответствии с наименованием нового компонента вакцина получила название «Совигрипп» [1].

Цитокиновые адъюванты. В особую группу выделены цитокины. Они могут быть природными и рекомбинантными. Интерферон первого поколения получали из крови доноров. В связи с дороговизной и низкой рентабельностью производства подобных препаратов были разработаны генно-инженерные технологии. Современные препараты (виферон, ингарон, интераль и т.д.) содержат рекомбинантный альфа-или гамма-интерферон. Предлагалось использование интерферона в схемах профилактики и лечения особо опасных болезней, таких как сибирская язва [47] и птичий грипп [23]. Интерлейкин 12 (IL-12) относится к провоспалительным цитокинам. *In vivo* продуцентами IL-12 являются моноциты, макрофаги, активированные лимфоциты дендритные клетки, нейтрофилы. IL-12 служит посредником между макрофагами и лимфоцитами, врожденным и приобретенным иммунитетом. Считается, что IL-12 является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного иммунного ответа и инициации эффективной противoinфекционной защиты против вирусов, бактерий, грибов и простейших. Рекомбинантный IL-12 используется в качестве адъюванта в противоопухолевых вакцинах [15]. В опытах на животных исследуют адъювантную активность как отдельных цитокинов (IL-2, IL-12, INF- γ , GM-CSF), так и их сочетания. Рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин) усиливает иммунный ответ на патогенные микроорганизмы и опухолевые клетки. Применяется в комплексной терапии для иммунокоррекции в хирургии, терапии внутренних и инфекционных болезней, неврологии, онкологии. Предполагают, что в основе комбинации цитокинов лежит синергический эффект [18]. Тем не менее существует мнение, что использование агонистов TLR, индуцирующих синтез определенных цитокинов, позволит получить более стандартный адъювантный эффект, чем применение непосредственно цитокинов [13].

Согласно теории врожденного иммунитета модификаторы функций TLR и их сигнальных путей являются новым поколением иммунобиологических препаратов для иммунопрофилактики практически всех видов патологии человека – инфекций, аллергии, аутоиммунных болезней и онкологии [3]. В частности, в адъювантных технологиях предпочтение отдается агонистам TLR [26, 44]. У человека семейство

TLR представлено 13 индивидуальными рецепторами, к настоящему времени хорошо изучены 11 из них. Часть этих рецепторов прямо взаимодействует с PAMP микроорганизмов, а остальные участвуют в формировании рецепторных комплексов и обеспечивают высокоаффинное взаимодействие TLR с PAMP [42]. Например, вирусная двухцепочечная РНК является агонистом TLR 3-го типа. Экспрессию TLR 4-го типа вызывают плазматические мембраны человеческих макрофагов и дендритные клетки, другие типы клеток млекопитающих, а также липополисахарид бактериального происхождения – MPL, широкий спектр синтетических производных. Функцию агонистов TLR 4-го типа во многих адъювантах выполняют входящие в их состав убитые бактерии, иммунологически активные компоненты бактерий или компоненты клеточных мембран. Бактериальный флагеллин является агонистом TLR 5-го типа. Одноцепочечная РНК повышает экспрессию TLR 7 и 8-го типов, CpG-ОДН и ISS иммуностимулирующие последовательности TLR 9 типа. Немаловажно, что адъюванты, являющиеся агонистами TLR 3, 4, 5, 7, 8 и 9-го типов, широко изучались в клинической практике.

Таким образом, при разработке вакцин нового поколения большое внимание уделяется выбору адъюванта. Принимается во внимание эффективность активации иммунологической памяти, способность к комплексной стимуляции Th1 и Th2 иммунного ответа, избирательному транспорту иммуногенных антигенов в соответствующие клетки и ткани, обеспечению выраженного иммунного ответа при снижении дозы вакцины и кратности введения. Обязательным условием является отсутствие токсичности для организма, способности вызывать аллергические и аутоиммунные осложнения. В ряде случаев адъювантам принадлежит ключевая роль в оптимизации иммунного ответа, например, при усилении иммуногенности слабых антигенов, активации иммунного ответа у лиц с редуцированным или ослабленным иммунитетом. Эффект адъювантов многократно возрастает при соответствии их функций свойствам иммуногена или при комбинировании дополняющих друг друга препаратов. Предпочтение отдается модификатором функций рецепторов врожденного иммунитета и их сигнальных путей. В создании адъювантов нового поколения активно используются достижения биологических и медицинских наук.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18–60 лет. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2014; 2(75):72–8.
2. Половинкина В.С., Марков Е.Ю. Структура и иммуноадъювантные свойства CpG-ДНК. *Мед. иммунол.* 2008; 6:469–76.
3. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 4:93–100.
4. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. *Иммунология*. 2009; 6:324–35.
5. Харламова Ф.С., Учайкин В.Ф., Кузьменко Л.В., Чирун Н.В., Легков Т.П., Фельдфикс Л.В. Опыт применения иммуномодулятора полиоксидоний для лечения ОРИ у детей. *Эффективная фармакотерапия*. 2013; 13:12–21.
6. Ali R., Naqvi R., Kumar S., Bhat A., Rao D. Multiple antigen peptide containing B and T cell epitopes of F1 antigen of *Yersinia pestis* showed enhanced Th1 immune response in murine model. *Scand. J. Immunol.* 2013; 77(5):361–71. DOI: 10.1111/sji.12042.
7. Alving C., Peachman K., Rao M., Reed S. Adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24(3):310–15. DOI: 10.1016/j.coi.2012.03.008.
8. Amemiya K., Meyers J., Rogers T., Fast R., Bassett A., Worsham P., Powell B., Norris S., Krieg A., Adamovics J. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine*. 2009; 27:2220–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016.
9. Athié-Morales V., O'Connor GM, Gardiner CM. Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 2008; 180(6):4082–89. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4082.
10. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*. 2011; 10(4):499–511. DOI: 10.1586/erv.10.174.
11. Brewer J. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* 2006; 102(1):10–15. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.08.002.
12. Burke B., Gómez-Román V., Lian Y., Sun Y., Kan E., Ulmer J., Srivastava I., Barnett S. Neutralizing antibody responses to subtype B and C adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits. *Virology*. 2009; 387(1):147–156. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.005.
13. Chabalgoity J., Baz A., Rial A., Grille S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(1–2):195–207. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.016.
14. Chaitra M., Nayak R., Shaila M. Modulation of immune responses in mice to recombinant antigens from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by the Ribi adjuvant. *Vaccine*. 2007; 25(41):7168–76. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.07.026.
15. Cutrera J., King G., Jones P., Kicenuik K., Gumpel E., Xia X., Li S. Safety and efficacy of tumor-targeted interleukin 12 gene therapy in treated and non-treated, metastatic lesions. *Curr. Gene Ther.* 2015; 15(1):44–54. DOI: 10.2174/1566523214666141127093654.
16. Del Giudice G., Fragaпane E., Bugarini R., Hora M., Henriksson T., Palla E., O'hagan D., Donnelly J., Rappuoli R., Podda A. Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13(9):1010–1013. DOI: 10.1128/CVI.00191-06.
17. Dorn A., Kippenberger S. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10(1):10–20.
18. Fraser C., Diener K., Brawn M., Hayball J. Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants. *Expert Rev. Vaccines*. 2007; 6:559–58. DOI: 10.1586/14760584.6.4.559.
19. Galli G., Hancock K., Hoschler K., DeVos J., Praus M., Bardelli M., Malzone C., Castellino F., Gentile C., McNally T., Del Giudice G., Banzhoff A., Brauer V., Montomoli E., Zamboni M., Katz J., Nicholson K., Stephenson I. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted pre-pandemic vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106:7962–7. DOI: 10.1073/pnas.0903181106.
20. Gao S., Basu S., Yang Z., Deb A., Hu M. Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents. *Curr. Drug Targets*. 2012; 13(14):1885–99. DOI: 10.2174/138945012804545498.
21. Giannini S., Hanon E., Moris P., Van Mechelen M., Morel S., Dessy F., Fourneau M., Colau B., Suzich J., Losonsky G., Martin M., Dubin G., Wettendorff M. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006; 24(33–34):5937–49. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.005.
22. Gupta K., Cooper C. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R. D.* 2008; 9(3):37–145. DOI: 10.2165/00126839-200809030-00001.
23. Haasbach E., Droebner K., Vogel A., Planz O. Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(6):515–25. DOI: 10.1089/jir.2010.0071.
24. Harandi A., Medagliani D., Shattock R., Working Group convened by EUROPRISE. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010; 28(12):2363–66. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.12.084.
25. Hickey A., Lin J., Kummer L., Szaba F., Duso D., Tighe M., Parent A., Smiley S. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect Immun.*

- 2013; 81(6):2123–32. DOI: 10.1128/IAI.00316-13.
26. Hong-Geller E., Chaudhary A., Lauer S. Targeting toll-like receptor signaling pathways for design of novel immune therapeutics. *Curr. Drugs Discov. Technol.* 2008; 5:29–38.
27. Honko A., Sriranganathan N., Lees C., Mizel S. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(2):1113–20. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.
28. Iho S., Maeyama J., Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(3):755–60. DOI: 10.1080/21645515.2014.1004033.
29. Jurk M., Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs* 2007; 21(6):387–401.
30. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(2):400–7. DOI: 10.1099/vir.0.036293-0.
31. Klinman D., Klaschik S., Sato T., Tross D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61:248–55. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.012.
32. Krieg A. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:1184–1194. DOI: 10.1172/JCI31414.
33. Michaud J., Hallé M., Lampron A., Thériault P., Préfontaine P., Filali M., Tribout-Jover P., Lantaigne A., Jodoin R., Cluff C., Brichard V., Palmanier R., Pilonet A., Larocque D., Rivest S. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110(5):1941–6. DOI: 10.1073/pnas.1215165110.
34. Minang J., Inglefield J., Harris A., Lathey J., Allea D., Sweeney D., Hopkins R., Lacy M., Bernton E. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with Anthrax Vaccine Adsorbed Plus CpG 7909 (AV7909). *Vaccine* 2014; 32(50):6847–54. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096.
35. Mohan T., Verma P., Rao D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J. Med. Res.* 2013; 138(5):779–95.
36. Perrie Y., Kastner E., Kaur R., Wilkinson A., Ingham A. A case-study investigating the physicochemical characteristics that dictate the function of a liposomal adjuvant. *Hum. Vaccin Immunother.* 2013; 9(6):1374–81. DOI: 10.4161/hv.24694.
37. Rueckert C., Guzmán C. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog.* 2012; 8(11):e1003001. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003001.
38. Rynkiewicz D., Rathkopf M., Sim I., A. Waytes T., Hopkins R.J., Giri L., DeMuriac D., Ransom J., Quinn J., Nabors G., Nielsen C. Marked enhancement of the immune response to BioThrax® (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CpG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine* 2011; 29:6313–20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.047.
39. Shaw C., Petrik M. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J. Inorg. Biochem.* 2009; 103(11):1555–562. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019.
40. Stewart V., McGrath S., Walsh D., Davis S., Hess A., Ware L., Kester K., Cummings J., Burge J., Voss G., Delchambre M., Garçon N., Tang D., Cohen J., Heppner D. Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine* 2006; 24(42-43):6483–92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.033.
41. Stills H. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005; 46(3):280–93. DOI: 10.1093/ilar.46.3.280.
42. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 109: 14121–10. DOI: 10.1002/0471142735.im1412s77.
43. Tong N., Beran J., Kee S., Miguel J., Sánchez C., Bayas J., Vilella A., de Juanes J., Arrazola P., Calbo-Torrecillas F., de Novales E., Hamtiaux V., Lievens M., Stoffel M. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2005; 68(5):2298–2303. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00689.x.
44. Tse K., Horher A. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; 66:77–80. DOI: 10.1136/ard.2007.078998.
45. Vesikari T., Groth N., Karvonen A., Borkowski A., Pellegrini M. MF59-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD) in children: safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. *Vaccine* 2009; 27:6291–95. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.004.
46. Wack A., Baudner B., Hilbert A., Manini I., Nuti S., Tavarini S., Scheffezik H., Uguzzoli M., Singh M., Kazzaz J., Montomoli E., Del Giudice G., Rappuoli R., O'Hagan D. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2008; 26(4):552–61. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.11.054.
47. Walberg K., Baron S., Poast J., Schwartz B., Izotova L., Pestka S., Peterson J. Interferon protects mice against inhalation anthrax. *J. Interferon Cytokine Res.* 2008; 28(10):597–601. DOI: 10.1089/jir.2007.0143.
48. Wang D. Monophosphoryl lipid A is an lipopolysaccharide-derived Toll-like receptor 4 agonist which may improve Alzheimer's disease pathology. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013; 13(12): 1639–41. DOI: 10.1517/14712598.2013.838556.
49. Wegmann F., Gartlan K., Harandi A., Brinckmann S., Coccia M., Hillson W., Kok W., Cole S., Ho L., Lambe T., Puthia M., Svanborg C., Scherer E., Krashias G., Williams A., Blattman J., Greenberg P., Flavell R., Moghaddam A., Sheppard N., Sattentau Q. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(9):883–8. DOI: 10.1038/nbt.2344.
50. Zhu Q., Egelston C., Vivekanandhan A., Uematsu S., Akira S., Klinman D., Belyakov I., Berzofsky J. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105(42): 16260–5. DOI: 10.1073/pnas.0805325105.

References

1. Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Fel'dblyum I.V., Rudenko L.G. [Results of studies on safety and immunogenicity of domestic subunit adjuvant vaccine – “Sovigrip” in volunteers aged 18–60]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2014; 2(75):72–8.
2. Polovinkina V.S., Markov E.Yu. [Structure and immune-adjuvant properties of CpG-DNA]. *Med. Immunol.* 2008; 6:469–76.
3. Semenov B.F., Zverev V.V. [Concept of fast immunologic protection from pathogens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 4:93–100.
4. Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. [Forecasting of preventive vaccination development in the first decades of the XXI century]. *Immunologiya* 2009; 6:324–35.
5. Kharlamova F.S., Uchaikin V.F., Kuz'menko L.V., Chirun N.V., Legkov T.P., Fed'fiks L.V. [Experience in utilization of immune-modulator – polyoxidonium – for treatment of acute respiratory infections in children]. *Effektivnaya Farmakoterapiya* 2013; 13:12–21.
6. Ali R., Naqvi R., Kumar S., Bhat A., Rao D. Multiple antigen peptide containing B and T cell epitopes of F1 antigen of *Yersinia pestis* showed enhanced Th1 immune response in murine model. *Scand. J. Immunol.* 2013; 77(5):361–71. DOI: 10.1111/sji.12042.
7. Alving C., Peachman K., Rao M., Reed S. Adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 2012; 24(3):310–15. DOI: 10.1016/j.coi.2012.03.008.
8. Amemiya K., Meyers J., Rogers T., Fast R., Bassett A., Worsham P., Powell B., Norris S., Krieg A., Adamovics J. CpG oligodeoxynucleotides augment the murine immune response to the *Yersinia pestis* F1-V vaccine in bubonic and pneumonic models of plague. *Vaccine* 2009; 27:2220–9. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.016.
9. Athié-Morales V., O'Connor GM, Gardiner CM. Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 2008; 180(6):4082–89. DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4082.
10. Bode C., Zhao G., Steinhagen F., Kinjo T., Klinman D. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines* 2011; 10(4):499–511. DOI: 10.1586/erv.10.174.
11. Brewer J. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol. Lett.* 2006; 102(1):10–15. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.08.002.
12. Burke B., Gómez-Román V., Lian Y., Sun Y., Kan E., Ulmer J., Srivastava I., Barnett S. Neutralizing antibody responses to subtype B and C adjuvanted HIV envelope protein vaccination in rabbits. *Virology* 2009; 387(1):147–156. DOI: 10.1016/j.virol.2009.02.005.
13. Chabalgoity J., Baz A., Rial A., Grille S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(1–2):195–207. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.016.
14. Chaitra M., Nayak R., Shaila M. Modulation of immune responses in mice to recombinant antigens from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by the Ribi adjuvant. *Vaccine* 2007; 25(41):7168–76. DOI:10.1016/j.vaccine.2007.07.026.
15. Cutrera J., King G., Jones P., Kicenuik K., Gumpel E., Xia X., Li S. Safety and efficacy of tumor-targeted interleukin 12 gene therapy in treated and non-treated, metastatic lesions. *Curr. Gene Ther.* 2015; 15(1):44–54. DOI: 10.2174/1566523214666141127093654.
16. Del Giudice G., Fraga-pañe E., Bugarini R., Hora M., Henriksson T., Palla E., O'hagan D., Donnelly J., Rappuoli R., Podda A. Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13(9): 1010–1013. DOI: 10.1128/CVI.00191-06.
17. Dorn A., Kippenberger S. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2008; 10(1):10–20.
18. Fraser C., Diener K., Brawn M., Hayball J. Improving vaccines by incorporating immunological adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* 2007; 6:559–58. DOI: 10.1586/14760584.6.4.559.
19. Galli G., Hancock K., Hoschler K., DeVos J., Praus M., Bardelli M., Malzone C., Castellino F., Gentile C., McNally T., Del Giudice G., Banzhoff A., Brauer V., Montomoli E., Zamboni M., Katz J., Nicholson K., Stephenson I. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-living human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted pre-pandemic vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106:7962–7. DOI: 10.1073/pnas.0903181106.
20. Gao S., Basu S., Yang Z., Deb A., Hu M. Bioavailability challenges associated with development of saponins as therapeutic and chemopreventive agents. *Curr. Drug Targets* 2012; 13(14):1885–99. DOI: 10.2174/138945012804545498.
21. Giannini S., Hanon E., Moris P., Van Mechelen M., Morel S., Dessy

- F., Fourneau M., Colau B., Suzich J., Losonksy G., Martin M., Dubin G., Wettendorff M. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006; 24(33–34):5937–49. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.005.
22. Gupta K., Cooper C. A review of the role of CpG oligodeoxynucleotides as toll-like receptor 9 agonists in prophylactic and therapeutic vaccine development in infectious diseases. *Drugs R. D.* 2008; 9(3):37–145. DOI: 10.2165/00126839-200809030-00001.
23. Haasbach E., Droebner K., Vogel A., Planz O. Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses *in vitro* and *in vivo*. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(6):515–25. DOI: 10.1089/jir.2010.0071.
24. Harandi A., Medaglini D., Shattock R.; Working Group convened by EUROPRISE. Vaccine adjuvants: a priority for vaccine research. *Vaccine*. 2010; 28(12):2363–66. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.12.084.
25. Hickey A., Lin J., Kummer L., Szaba F., Duso D., Tighe M., Parent A., Smiley S. Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect Immun.* 2013; 81(6):2123–32. DOI: 10.1128/IAI.00316-13.
26. Hong-Geller E., Chaudhary A., Lauer S. Targeting toll-like receptor signaling pathways for design of novel immune therapeutics. *Curr. Drugs Discov. Technol.* 2008; 5:29–38.
27. Honko A., Sriranganathan N., Lees C., Mizel S. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 2006; 74(2):1113–20. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1113-1120.2006.
28. Iho S., Maeyama J., Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 11(3):755–60. DOI: 10.1080/21645515.2014.1004033.
29. Jurk M., Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs*. 2007; 21(6):387–401.
30. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(2):400–7. DOI: 10.1099/vir.0.036293-0.
31. Klinman D., Klaschik S., Sato T., Tross D. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61:248–55. DOI: 10.1016/j.addr.2008.12.012.
32. Krieg A. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:1184–1194. DOI: 10.1172/JCI31414.
33. Michaud J., Hallé M., Lampron A., Thériault P., Préfontaine P., Filali M., Tribout-Jover P., Lantaigne A., Jodoin R., Cluff C., Brichard V., Palmanter R., Pilorget A., Larocque D., Rivest S. Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(5):1941–6. DOI: 10.1073/pnas.1215165110.
34. Minang J., Inglefield J., Harris A., Lathey J., Alleva D., Sweeney D., Hopkins R., Lacy M., Bernton E. Enhanced early innate and T cell-mediated responses in subjects immunized with Anthrax Vaccine Adsorbed Plus CpG 7909 (AV7909). *Vaccine*. 2014; 32(50):6847–54. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.01.096.
35. Mohan T., Verma P., Rao D. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J. Med. Res.* 2013; 138(5):779–95.
36. Perrie Y., Kastner E., Kaur R., Wilkinson A., Ingham A. A case-study investigating the physicochemical characteristics that dictate the function of a liposomal adjuvant. *Hum. Vaccin Immunother.* 2013; 9(6):1374–81. DOI: 10.4161/hv.24694.
37. Rueckert C., Guzmán C. Vaccines: from empirical development to rational design. *PLoS Pathog.* 2012; 8(11):e1003001. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003001.
38. Rynkiewicz D., Rathkopf M., Sim I., A. Waytes T., Hopkins R.J., Giri L., DeMuriac D., Ransom J., Quinn J., Nabors G., Nielsen C. Marked enhancement of the immune response to BioThrax® (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CpG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine*. 2011; 29:6313–20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.047.
39. Shaw C., Petrik M. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J. Inorg. Biochem.* 2009; 103(11):1555–562. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2009.05.019.
40. Stewart V., McGrath S., Walsh D., Davis S., Hess A., Ware L., Kester K., Cummings J., Burge J., Voss G., Delchambre M., Garçon N., Tang D., Cohen J., Heppner D. Pre-clinical evaluation of new adjuvant formulations to improve the immunogenicity of the malaria vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine*. 2006; 24(42–43):6483–92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.033.
41. Stills H. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005; 46(3):280–93. DOI: 10.1093/ilar.46.3.280.
42. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.* 2015; 109:14121–10. DOI: 10.1002/0471142735.im1412s77.
43. Tong N., Beran J., Kee S., Miguel J., Sánchez C., Bayas J., Vilella A., de Juanes J., Arrazola P., Calbo-Torrecillas F., de Novales E., Hamtiaux V., Lievens M., Stoffel M. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2005; 68(5):2298–303. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00689.x.
44. Tse K., Horher A. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; 66:77–80. DOI: 10.1136/ard.2007.078998.
45. Vesikari T., Groth N., Karvonen A., Borkowski A., Pellegrini M. MF59-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD) in children: safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. *Vaccine*. 2009; 27:6291–95. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.02.004.
46. Wack A., Baudner B., Hilbert A., Manini I., Nuti S., Tavarini S., Scheffczyk H., Ugozzoli M., Singh M., Kazzaz J., Montomoli E., Del Giudice G., Rappuoli R., O'Hagan D. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2008; 26(4):552–61. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.11.054.
47. Walberg K., Baron S., Poast J., Schwartz B., Izotova L., Pestka S., Peterson J. Interferon protects mice against inhalation anthrax. *J. Interferon Cytokine Res.* 2008; 28(10):597–601. DOI: 10.1089/jir.2007.0143.
48. Wang D. Monophosphoryl lipid A is an lipopolysaccharide-derived Toll-like receptor 4 agonist which may improve Alzheimer's disease pathology. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013; 13(12): 1639–41. DOI: 10.1517/14712598.2013.838556.
49. Wegmann F., Gartlan K., Harandi A., Brinckmann S., Coccia M., Hillson W., Kok W., Cole S., Ho L., Lambe T., Puthia M., Svanborg C., Scherer E., Krashias G., Williams A., Blattman J., Greenberg P., Flavell R., Moghaddam A., Sheppard N., Sattentau Q. Polyethyleneimine is a potent mucosal adjuvant for viral glycoprotein antigens. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(9):883–8. DOI: 10.1038/nbt.2344.
50. Zhu Q., Egelston C., Vivekanandhan A., Uematsu S., Akira S., Klinman D., Belyakov I., Berzofsky J. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: implications for vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(42): 16260–5. DOI: 10.1073/pnas.0805325105.

Authors:

Semakova A.P., Mikshis N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Семакова А.П., Микшиш Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 28.04.15.

Н.П.Буравцева¹, В.М.Мезенцев¹, А.Г.Рязанова¹, С.Н.Антюганов², Е.И.Еременко¹, Т.М.Головинская¹,
О.И.Цыганкова¹, Н.Г.Варфоломеева¹, Л.Ю.Аксёнова¹

ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ПУНКТОВ В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ И СКФО

¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;

²Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора МСЧ УФСБ России по Ставропольскому краю, Ставрополь, Российская Федерация

Цель исследований. Изучение эпизоотолого-эпидемиологической характеристики стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), расположенных на территории Северо-Кавказского федерального округа (СКФО). **Материалы и методы.** Для изучения заболеваемости людей и животных сибирской язвой использовали статистические данные официальной регистрации заболеваемости в Российской Федерации и материалы Управлений Роспотребнадзора и Управлений ветеринарии Ставропольского края и республик СКФО. Электронные кадастры для геокодирования СНП составляли с программным обеспечением ESRI (ArcGIS10.x) и топографической основой в виде электронных карт М 1:200000. **Результаты и выводы.** Проведенные исследования по изучению сроков формирования СНП и их активности за 1960–2014 гг. показали, что большинство СНП относятся к категории старых и неманифестных пунктов. Наибольший пик активности проявления сибирской язвы приходится на период 1960–1979 гг., в последующем сибирская язва регистрировалась от 1 до 3 лет в отдельных районах.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты, электронные кадастры, эпизоотолого-эпидемиологическая характеристика.

Корреспондирующий автор: Буравцева Нина Пантелеймоновна, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

N.P.Buravtseva¹, V.M.Mezentsev¹, A.G.Ryazanova¹, S.N.Antyuganov², E.I.Eremenko¹, T.M.Golovinskaya¹,
O.I.Tsygankova¹, N.G.Varfolomeeva¹, L.Yu.Aksenova¹

Epizootiological-Epidemiological Characteristics of the Stationary Hazardous as regards Anthrax Areas in the Stavropol Territory and North Caucasian Federal District

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ²Center of State Sanitary-Epidemiological Surveillance, RF Federal Security Service Directorate in the Stavropol Territory, Stavropol, Russian Federation

Objective of the study is to analyze epizootiological-epidemiological characteristics of the stationary hazardous as regards anthrax areas (SHA), situated in the territory of the North Caucasian Federal District (NCFD). **Materials and methods.** Official statistical data on morbidity rates in the Russian Federation and the records of the Rospotrebnadzor Administrations and Veterinary Administrations in the Stavropol Territory and the Republics of NCFD have been deployed for evaluation of anthrax incidence rates among humans and animals. Electronic cadastre for geo-encoding of SHA has been developed using software product ESRI (ArcGIS10.x) and topographical framework in the form of electronic maps M 1:200000. **Results and conclusions.** The studies conducted for the assessment of SHAs formation timelines and their activity during 1960–2014 have revealed that most of the SHAs fall under the category of the old-aged and non-manifesting ones. The highest peak of anthrax activity came in the period of 1960–1979. Further on, anthrax was registered within 1–3 years in scattered regions.

Key words: anthrax, stationary hazardous as regards anthrax areas, electronic cadastres, epizootiological-epidemiological characteristics.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nina P. Buravtseva e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Buravtseva N.P., Mezentsev V.M., Ryazanova A.G., Antyuganov S.N., Eremenko E.I., Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Aksenova L.Yu. Epizootiological-Epidemiological Characteristics of the Stationary Hazardous as regards Anthrax Areas in the Stavropol Territory and North Caucasian Federal District. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:36–39. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-36-39

Регион Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) всегда отличался высокой заболеваемостью зоонозными инфекциями, среди которых сибирская язва занимает одно из ведущих мест. Неблагополучными по сибирской язве являются 7 административных субъектов СКФО, в том числе Ставропольский край и 6 республик – Дагестан, Северная Осетия-Алания, Кабардино-Балкарская, Карачаево-Черкесская, Чечня и Ингушетия [1, 2, 6,

7]. Основные функции эпизоотолого-эпидемиологического надзора за сибирской язвой – это выявление, учет, паспортизация и постоянное слежение за санитарно-ветеринарным состоянием и проявлениями эпизоотической и эпидемической активности стационарно неблагополучных пунктов (СНП) [4]. Имеющийся на сегодняшний день объем информации требует соответствующей обработки, что невозможно без применения специальных методов исследова-

дования и регистрации. К числу таких методов относятся географические информационные системы (ГИС), которые нашли свое применение при разработке электронных кадастров СНП [1, 5].

Цель исследований – дать эпизоотологическую и эпидемиологическую характеристику СНП, расположенных на территории СКФО.

Материалы и методы

В качестве материалов для изучения динамики заболеваемости людей и животных сибирской язвой на изучаемых территориях за период 1960–2014 гг. были использованы статистические данные официальной регистрации заболеваемости сибирской язвы в Российской Федерации и материалы Управлений Роспотребнадзора и Управлений ветеринарии Ставропольского края и республик СКФО по вопросам сибирской язвы у людей и сельскохозяйственных животных.

При составлении электронных кадастров для геокодирования СНП на местности использовали программное обеспечение ESRI (ArcGIS10.x). Топографической основой служили электронные карты М 1:200000, включающие базовые слои: административные границы изучаемого региона, субъектов СКФО, районов, рельеф территории, гидрография, населенные пункты и СНП.

Результаты и обсуждение

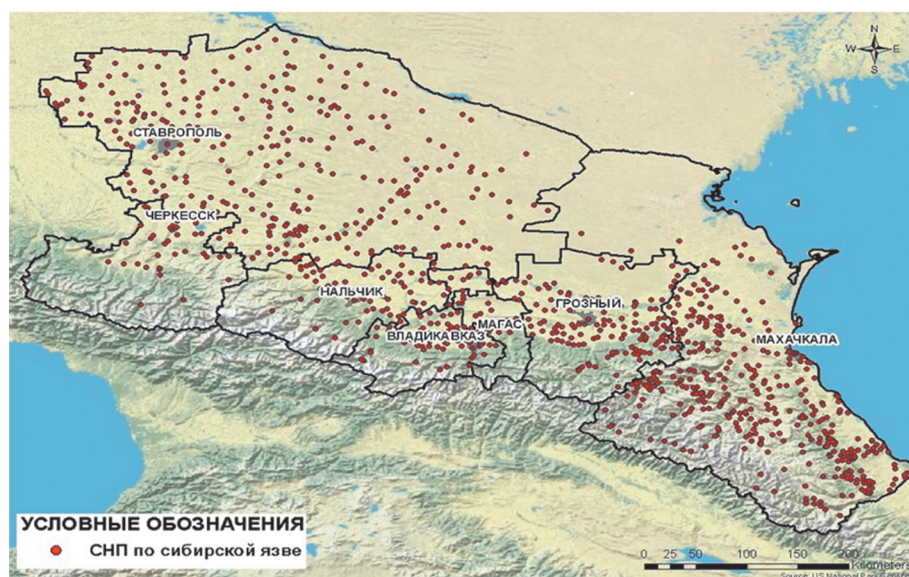
В начале проводимых исследований была составлена геоинформационная база данных в ArcGIS10, куда вошла вся информация по тому или иному объекту: административный субъект, район, населенный пункт, категория хозяйства, год регистрации сибирской язвы, количество больных людей, количество павших животных по видам (КРС, МРС, свиньи, лошади), географические координаты населенных пунктов или хозяйств. На рисунке представлены места

проявления сибирской язвы на территории СКФО в виде точек, каждая из которых соответствует СНП. Все это явилось основой для создания электронных кадастров СНП по каждому субъекту СКФО.

На карте приведены все СНП, независимо от времени их возникновения. Всего в Ставропольском крае (СК) и республиках СКФО насчитывается 1151 СНП. В большинстве случаев СНП были сформированы до 1960 г. – 697 пунктов, что составляет 60,6 %. В последующие годы появление новых пунктов сокращалось. Так, с 1960 по 1969 год сформировано 236 СНП (20,5 %), с 1970 по 1979 год – 120 пунктов (10,4 %), с 1980 по 1999 год – 85 (7,4 %), в последнем периоде (2000–2014 гг.) – всего 13 пунктов (1,1 %), 9 из них находятся в Республике Дагестан (РД) (табл. 1).

Обобщение сведений о СНП в СКФО позволило в соответствии с классификацией Б.Л.Черкасского [3] все пункты разделить на категории. Большинство СНП были отнесены к категории старых и неманифестных пунктов (76,0 %), известных с прошлых времен как неблагополучные и проявлявших свою активность более 40 лет тому назад. Манифестных рецидивировавших СНП в последние 30 лет оказалось на всей территории СКФО 276. Из них рецидивировали после 1990 г. 83 пункта (7,2 %), после 2000 г. – 25 (2,2 %). Зарегистрировано 9 новых пунктов на всей территории, при этом они зачастую формировались на территориях, ранее благополучных по сибирской язве.

Для характеристики эпизоотологической и эпидемиологической обстановки в СНП немаловажным фактом являются сведения о количестве лет проявления активности сибирской язвы и количестве проявлений (кратности) инфекции в том или ином районе СКФО. Эти данные представлены в табл. 2. Наибольшая активность сибиреязвенной инфекции наблюдалась в первом десятилетии. Сибирская язва была зарегистрирована почти во всех районах СКФО и в течение всего 10-летнего срока наблюдения. В большинстве пунктов в этот период инфекция ре-



Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты на территории СКФО

Таблица 1

Общее количество СНП в СКФО и их формирование по периодам в течение 1960–2014 гг.

Субъекты СКФО	Общее кол-во СНП	Кол-во СНП до 1960	Периоды					Кол-во СНП 1960–2014 гг.
			1960–1969	1970–1979	1980–1989	1990–1999	2000–2014	
СК	352	254	62	20	9	6	1	98
КЧР	49	9	27	8	2	3	0	40
КБР	82	54	11	12	4	1	0	28
РСО-А	88	45	20	12	8	1	2	43
ЧР	135	59	46	19	8	2	1	76
РИ	25	7	15	1	1	1	0	18
РД	420	269	55	48	25	14	9	151
<i>Всего</i>	1151	697	236	120	57	28	13	454
%	100	60,6	20,5	10,4	5,0	2,4	1,1	39,4

гистрировалась неоднократно и таких проявлений в СКФО насчитывалось 812. По количеству проявлений СК занимает первое место, затем Чеченская республика (ЧР), Республика Дагестан и Республика Северная Осетия-Алания (РСО-А). В дальнейшие годы активность сибирской язвы во всех субъектах начала снижаться, а в таких республиках, как Республика Ингушетия (РИ), Карачаево-Черкесская республика (КЧР), Кабардино-Балкарская республика (КБР), сибирская язва с 2000 г. не регистрировалась. В последнем 14-летнем периоде к наиболее неблагоприятной территории по сибирской язве можно отнести Республику Дагестан (20 случаев), в то время как в Ставропольском крае – 7, а в Чеченской республике и Республике Северная Осетия-Алания – по 6 случаев. Районы Ставропольского края и республик СКФО по количеству лет активности в течение 55-летнего периода отличались между собой. Так, в Ставропольском крае в Шпаковском районе сибирская язва регистрировалась 20 лет, Труновском – 18, Изобильненском, Ипатовском – по 15 лет, Курском – 14. В Карачаево-Черкесской республике можно выделить Малокарачаевский район (12 лет), в Кабардино-Балкарской республике – Терский (14 лет), Баксанский (15 лет), Прохладненский (16 лет) районы, в Республике Северная Осетия-Алания – Алагирский и Дигорский (по 18 лет), Ардонский

и Ирафский (по 20 лет), Правобережный (23 года), Пригородный (30 лет). В Чеченской республике до 1980 г. сибирская язва регистрировалась ежегодно. Особенно активными оказались такие районы, как Надтеречный (29 лет), Грозненский (25 лет), Урус-Мартановский (24 года), Курчалоевский и Назрановский (по 22 года). В Чеченской республике активность не прекратилась и в последнем периоде – 2003, 2005, 2006, 2007 и 2010 гг.

Районы Республики Дагестан по количеству активных лет в СНП можно разделить на 3 группы. К первой группе относятся районы, в которых сибирская язва регистрировалась от 2 до 5 лет в течение всего анализируемого периода. Таких районов оказалось большинство – 24. Вторую группу представляют районы с проявлением активности от 6 до 10 лет – 7. Районов с высокой степенью активности (от 11 до 20 лет) оказалось 6. На этом фоне выделяются районы Сергокалинский (17 лет), Буйнакский (18 лет) и Хасавюртовский (20 лет). В РД сибирская язва в последнем периоде (2000–2014 гг.) регистрировалась в течение 8 лет (2000, 2001, 2002, 2004, 2005, 2006, 2010, 2012 гг.).

Таким образом, была разработана геоинформационная база данных в среде ArcGIS10, которая явилась основой для создания электронных кадастров СНП для каждого субъекта СКФО. Проведенные ис-

Таблица 2

Сводные данные по проявлению активности сибирской язвы в районах СКФО за период 1960–2014 гг.

Субъекты СКФО	Всего районов	1960–1969			1970–1979			1980–1989			1990–1999			2000–2014		
		Р	Л	П	Р	Л	П	Р	Л	П	Р	Л	П	Р	Л	П
СК	26	25	10	232	19	10	107	14	10	35	12	6	20	5	6	7
КЧР	10	8	10	47	5	7	14	3	3	3	7	6	11	0	0	0
КБР	11	9	10	68	10	8	36	5	9	17	3	5	6	0	0	0
РСО-А	8	8	10	110	8	10	84	8	10	67	5	6	13	3	4	6
ЧР	14	14	10	197	12	10	116	13	10	60	9	7	20	6	5	6
РИ	3	3	10	44	3	7	12	2	7	18	1	1	1	0	0	0
РД	39	31	10	114	29	10	128	19	10	57	16	10	27	15	6	20
<i>Итого</i>	111	98	10	812	86	7–10	497	64	3–10	257	53	1–10	98	29	0–6	39

Примечание: Р – количество районов, в которых регистрировалась сибирская язва; Л – количество лет регистрации сибирской язвы; П – количество проявлений сибирской язвы

следования по изучению сроков формирования СНП и их активности на протяжении 55-летнего периода (1960–2014 гг.) показали, что большинство СНП относятся к категории старых и неманифестных пунктов. Манифестных и рецидивирующих СНП в последние 30 лет оказалось на всей территории СКФО 276, из них рецидивировали после 2000 г. 25 пунктов, новых пунктов зарегистрировано всего 9. Наибольший пик активности проявления сибирской язвы в СНП приходится на первые два десятилетия (1960–1979 гг.), в последующем сибирская язва регистрировалась от 1 до 3 лет в отдельных районах СКФО.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антигуанов А.Н., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Мезенцев В.М., Аксёнова Л.Ю., Лысогора Е.В., Джаилиди Г.А. Сибирская язва в Ставропольском крае. *Мед. вестник*. 2012; 4(28):67–70.
2. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Аксёнова Л.Ю., Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Головинская Т.М., Воропаев В.В., Плужникова О.В., Куличенко А.Н. Обзор ситуации по сибирской язве в 2013 г., прогноз на 2014 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:27–8.
3. Черкасский Б.Л. Закономерности территориального распространения и проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. *Эпидемиол. и инф. бол.* 1999; 2:48–52.
4. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ОАО Интерсэн; 2002. 384 с.
5. Черкасский Б.Л., Форстман Д.В., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А., Фаизов Т.Х. Опыт использования ГИС-технологий для изучения закономерностей пространственно-временного распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2005; 6:19–23.
6. Феньев В.М. Сибирская язва в Дагестане. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1969; 12:118–21.
7. Ерёменко Е.И., Ярошук В.А., Банных В.А., Неляпин Н.М., Буравцева Н.П., Брюханов А.Ф., Мезенцев В.М., Тихенко

Н.И., Савельев В.Н., Грижебовский Г.М., Лашченко Е.В. Эпизоотологическая и эпидемиологическая характеристика сибирской язвы в Чеченской республике. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 3:186–90.

References

1. Antyuganov A.N., Buravtseva N.P., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Mezentsev V.M., Akseanova L.Yu., Lysogora E.V., Dzhalidi G.A. [Anthrax in the Stavropol Territory]. *Med. Vestnik*. 2012; 4(28):67–70.
2. Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Akseanova L.U., Tsygankova O.I., Koteneva E.A., Golovinskaya T.M., Voropaev V.V., Pluzhnikova O.V., Kulichenko A.N. [The review of anthrax situation in 2013, the forecast for 2014]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:27–8.
3. Cherkassky B.L. [Regularities of spatial distribution and manifestations of activity of the stationary hazardous as regards anthrax areas]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 1999; 2:48–52.
4. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax]. M.: Intersens Ltd.; 2002. 384 p.
5. Cherkassky B.L., Fortsman D.V., Loktionova M.N., Shabeykin A.A., Faizov T.Kh. [Experience in utilization of GIS-technologies for evaluation of regularities of spatial-temporal distribution of stationary hazardous as regards anthrax areas]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2005; 6:19–23.
6. Fen'ev V.M. [Anthrax in Dagestan]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1969; 12:118–21.
7. Eremenko E.I., Yaroshchuk V.A., Bannykh V.A., Nelyapin N.M., Buravtseva N.P., Bryukhanov A.F., Mezentsev V.M., Tikhchenko N.I., Savel'ev V.N., Grizhebovsky G.M., Lashchenko E.V. [Epizootiological and epidemiological characteristics of anthrax in the Chechen Republic]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3:186–90.

Authors:

Buravtseva N.P., Mezentsev V.M., Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I., Varfolomeeva N.G., Akseanova L.Yu. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Antyuganov S.N. Center of State Sanitary-Epidemiological Surveillance, RF Federal Security Service Directorate in the Stavropol Territory. Stavropol, Russian Federation.

Об авторах:

Буравцева Н.П., Мезенцев В.М., Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Цыганкова О.И., Варфоломеева Н.Г., Аксёнова Л.Ю. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Антигуанов С.Н. Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора МСЧ УФСБ России по Ставропольскому краю. Ставрополь.

Поступила 19.05.15.

А.В.Иванова¹, В.А.Сафронов¹, Е.Г.Степанов², П.А.Мочалкин³, Н.В.Попов¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ТЕРРИТОРИЙ ВЫСОКОГО РИСКА ЗАРАЖЕНИЯ ГЛПС В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН С ПРИМЕНЕНИЕМ ГИС-ТЕХНОЛОГИИ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, Уфа, Российская Федерация; ³ГБУЗ «Республиканский центр дезинфекции» МЗ Республики Башкортостан, Уфа, Российская Федерация

Цель. Дифференциация территории Республики Башкортостан по риску заражения ГЛПС. **Материалы и методы.** В работе использованы материалы по заболеваемости населения ГЛПС в Республике Башкортостан с 1980 по 2014 год Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан и Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан, а также персонифицированные данные по заболеваемости ГЛПС в республике за период 2009–2011 гг. Основным методом исследования был эпидемиологический анализ с использованием ГИС-технологий. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что эпидемические проявления ГЛПС в 56,7 % случаев приурочены к лесостепной зоне, 24,3 % – к пойменным биотомам и 16,1 % – к лесной зоне. Отмечен высокий уровень заражения в возрасте от 20 до 50 лет. Причем, заболеваемость среди мужчин составляет 79 %, среди женщин – 21 %. Дети до 14 лет и лица старше 60 лет болеют значительно реже. Установлено, что пораженные ГЛПС населенные пункты расположены в среднем в 2,5 раза ближе к лесным массивам и в 1,6 раза к поймам рек, чем населенные пункты, в которых случаев заболевания ГЛПС не зарегистрировано. Обоснована перспективность применения ГИС-технологий, в первую очередь геокодирования, для эпидемиологического районирования энзоотичных по ГЛПС территорий, выявления участков высокого риска заражения и проведения адресных профилактических мероприятий.

Ключевые слова: энзоотичная по ГЛПС территория Республики Башкортостан, риск заражения ГЛПС, геокодирование, ландшафтная приуроченность, эпидемиологическое районирование, профилактические (противоэпидемические) мероприятия.

Корреспондирующий автор: Иванова Александра Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Ivanova¹, V.A.Safronov¹, E.G.Stepanov², P.A.Mochalkin³, N.V.Popov¹

Detection of Territories of High Risk HFRS Exposure in the Republic of Bashkortostan, Applying GIS-Technologies

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; ²Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russian Federation; ³Republican Center for Disinfection at the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Russian Federation

Objective of the investigation was to differentiate the territory of the Republic of Bashkortostan according to the levels of risk of exposure to HFRS. **Materials and methods.** Utilized were the records on HFRS morbidity among the population of the Republic of Bashkortostan over the period of 1980–2014, collected in the Rospotrebnadzor Administration and the Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Bashkortostan, as well as personalized data on HFRS incidence in the Republic over the period of 2009–2011. Key research method was GIS-technology based analysis. **Results and discussion.** It is established that 56.7 % of HFRS epidemic manifestations are in the forest-steppe zone, 24.3 % – in flood-plain biotopes, and 16.1 % – in forest area. Recorded is a high level of infection among the people aged 20–50. What is more, morbidity rates for men come up to 79 %, for women – 21 %. Children under 14 and individuals over 60 suffer much more rarely. Determined is the fact that HFRS-affected residential areas are situated 2.5 times closer to forest zones and 1.6 times – to flood plains, than those in which HFRS cases are not registered. Substantiated is the prospective of GIS application, first and foremost geo-coding, for epidemiological zoning of enzootic as regards HFRS territories, detection of areas where high risk of exposure exists, and performance of targeted preventive measures.

Key words: enzootic as regards HFRS territory of the Republic of Bashkortostan, risk of exposure to HFRS, geo-coding, landscape confinement (association), epidemiological zoning, preventive (anti-epidemic) measures.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksandra V. Ivanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Ivanova A.V., Safronov V.A., Stepanov E.G., Mochalkin P.A., Popov N.V. Detection of Territories of High Risk HFRS Exposure in the Republic of Bashkortostan, Applying GIS-Technologies. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:40–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-40-44

В последнее десятилетие на территории Республики Башкортостан сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка по ГЛПС [6, 8]. Для достижения эффекта снижения уровня заболеваемости ГЛПС ежегодно проводят большой объем санитарно-профилактических мероприятий, в первую очередь, на участках сезонного обострения

эпидемической обстановки и в урбозонах крупных населенных пунктов [2, 13]. Однако в годы крупных подъемов численности рыжей полевки, равно как и других фоновых мышевидных грызунов, уровень заболеваемости ГЛПС неизменно резко возрастает [12]. В этих условиях ГИС-технологии являются значительным резервом повышения эффективности

противоэпидемического контроля на всей эндемичной по ГЛПС территории Республики Башкортостан [10].

В настоящей работе апробированы приемы пространственного соединения в ГИС персонифицированных данных о больных (мест регистрации заражения) на основе электронных административных и ландшафтных карт Республики Башкортостан.

Материалы и методы

В работе использованы материалы Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан и Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан по заболеваемости населения ГЛПС в Республике Башкортостан с 1980 по 2013 год. Основным методом исследования был эпидемиологический анализ с использованием ГИС-технологий. Для выявления территории риска использовали электронные ландшафтные карты Республики Башкортостан и персонифицированные данные о больном ГЛПС (населенный пункт с указанием его географических координат) за период 2009–2011 гг. Визуализация результатов осуществлялась при помощи создания карт плотности в картографической проекции Меркатора с помощью географической информационной системы ArcGIS 10.X в составе ArcMap, ArcCatalog. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением общепринятых методов вариационной статистики с элементами системного анализа [9], а также аналитической платформы «Deductor Studio» 5.2.

Результаты и обсуждение

Заболеваемость ГЛПС на территории Республики Башкортостан регистрируется с 1955 г. [1]. С начала 80-х годов прошлого столетия здесь произошло значительное обострение эпидемиологической обстановки [3]. При этом масштабность эпидемических проявлений ГЛПС неизменно определялась наличием вспышечной заболеваемости. В 1980–2000 гг. резкие обострения эпидемиологической обстановки

наблюдалось в 1985 и 1997 гг. Хотя здесь в многолетней динамике эпидемических проявлений ГЛПС и реализуется 2–3-летняя цикличность (рис. 1), в последние 10 лет наиболее высокий уровень заболеваемости отмечен в 2009 г. – 80,3 на 100 тыс. населения (3257 случаев).

В период 2010–2013 гг. на эндемичной по ГЛПС территории Республики Башкортостан отмечена тенденция снижения численности фоновых видов грызунов, в первую очередь, рыжей полевки [2]. Уровень заболеваемости ГЛПС также повсеместно снизился до 14,9 на 100 тыс. населения в 2013 г.

В 2014 г. произошел новый подъем заболеваемости ГЛПС – до 48,3 на 100 тыс. населения. Уровень заболеваемости возрос в 3,2 раза; общее число случаев заражения составило 1962 чел.

Среди факторов риска, определяющих условия реализации крупных подъемов заболеваемости, определяющую роль играют показатели численности и степень доминирования основного резервуара ГЛПС – рыжей полевки, колебания климата, солнечная активность [4, 12]. Причем, несмотря на относительно малую частоту (раз в 10–12 лет) и кратковременность (сезон или год) реализации крупных эпидемических вспышек, вплоть до настоящего времени не удается обеспечить эффективный контроль заболеваемости ГЛПС в годы резкого обострения эпизоотической обстановки. Очевидно, что первопричиной наблюдаемого низкого уровня контроля роста заболеваемости в такие экстремальные годы, служит малая изученность факторов риска в периоды низкой и высокой эпидемической активности очагов ГЛПС. Решение этой проблемы предполагает создание надежных долгосрочных эпизоотологических прогнозов, обеспечивающих реальную возможность упреждающего проведения профилактических (противоэпидемических) мероприятий на участках с высоким риском заражения на всех фазах многолетней динамики эпидемической активности очагов ГЛПС [11].

С целью определения основных контингентов риска заражения в 2009–2011 гг. выполнен анализ данных по заболеваемости различных возрастных

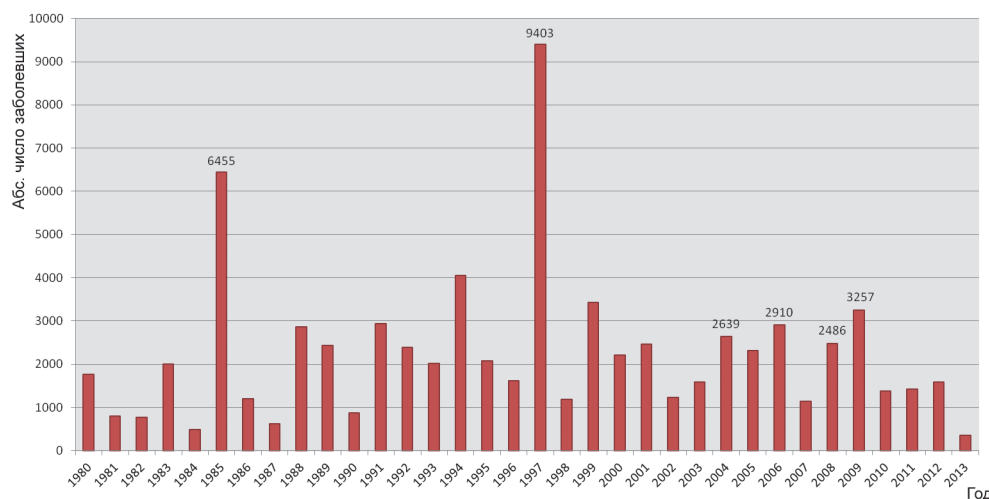


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости ГЛПС в Республике Башкортостан

Распределение заболеваемости ГЛПС по полу и возрасту в Республике Башкортостан в период 2009–2011 гг.

Возраст, лет	Пол					
	женский		мужской		Итого	
	Абс. число	Удельный вес, %	Абс. число	Удельный вес, %	Абс. число	Удельный вес, %
До 15	39	3,05	86	1,84	125	2,10
От 15 до 20	74	5,78	346	7,42	420	7,07
От 21 до 30	302	23,59	1535	32,93	1837	30,92
От 31 до 40	271	21,17	1052	22,57	1323	22,27
От 41 до 50	252	19,69	853	18,30	1105	18,60
От 51 до 60	220	17,19	566	12,14	786	13,23
Более 60	122	9,53	224	4,80	346	5,82
<i>Итого</i>	1280	100,00	4662	100,00	5942	100,00

групп населения (таблица).

По результатам проведенного анализа можно заключить, что в 2009–2011 гг. имело место заражение, в основном, активного, трудоспособного населения в возрасте от 20 до 50 лет, при этом мужчины заражались чаще, чем женщины. Заболеваемость среди мужчин составляет 79 %, женщин – 21 %. Заражения детей до 14 лет и лиц старше 60 лет отмечали значительно реже. Мужчины чаще заражались в возрасте от 20 до 30 лет, причем в возрастной категории от 30 до 50 лет сохраняются относительно постоянные высокие показатели заболеваемости. У женщин отмечено более равномерное распределение частоты случаев заболевания ГЛПС в возрастных группах от 20 до 50 лет. Таким образом, группой повышенного риска являются мужчины в возрасте от 20 до 30 лет. Также отмечено, что выявленные возрастные особенности заболеваемости ГЛПС определяются, во многом, интенсивностью контактов с природно-очаговыми комплексами, в том числе связанных с профессиональной деятельностью [7]. При этом заражения наиболее часто происходят на дачных участках, в зонах рекреации и в других антропогенных ландшафтах в ближайших окрестностях населенных пунктов.

Для определения сезонности заболевания ГЛПС в 2009–2011 гг. был использован метод персонифицированного распределения больных по месяцам в соответствии с указанными в учетных документах данными заболеваний.

Из результатов анализа следует, что в 2009–2011 гг. сезонная динамика имела вид одноволновой кривой с пиком заболеваемости в августе. Подъем заболеваемости отмечается с апреля, а наибольшее количество случаев регистрируется в июле и августе. При этом как в Уфе, так и в административных районах республики максимальное количество больных регистрируется в относительно одинаковый промежуток времени – с июля по август.

С целью выявления территорий риска выполнен ГИС-анализ персонифицированных данных больных ГЛПС на территории Республики Башкортостан за период 2009–2011 гг. Так, как границы административных районов не совпадают с границами ландшафтных районов, была построена карта плотности мест

заражения ГЛПС. Было учтено точное число населения, проживающего в каждом населенном пункте; площадь населенного пункта, обозначена их приуроченность к конкретной ландшафтно-географической зоне. При этом были выявлены не только очаги эпидемических проявлений ГЛПС в границах административных районов Республики Башкортостан, но и выполнена их привязка к конкретным населенным пунктам. С этой целью были созданы соответствующие карты плотности распределения случаев заражения в картографической проекции Меркатора. В качестве одного из основных факторов риска использовали показатель удаленности (расстояние в км) пораженных ГЛПС населенных пунктов до лесных массивов и водоемов. Этот показатель позволяет объективно оценить риск заражения ГЛПС в различных ландшафтных районах Республики Башкортостан, и он статистически достоверен ($r = +0,82$). Именно с этим фактором, в первую очередь, связана отмечаемая пространственная неоднородность распределения участков высокого риска заражения в различных ландшафтных районах Республики Башкортостан. В частности, установлено, что наиболее высокая частота заражений отмечена в лесостепной зоне, на долю которой, пришлось 56,7 %, в пойменных биотопах – 24,3 % случаев заражения. В лесной зоне частота случаев заражения не превышает 16,1 %.

В результате на административной карте Республики Башкортостан отмечен каждый случай заболевания ГЛПС с 2009 по 2011 год с обозначением конкретного места заражения (населенный пункт), и определено среднее расстояние от него до ближайшего лесного массива или водоема. Всего в Республике Башкортостан в границах 54 административных районов насчитывается 4731 населенный пункт, каждый из которых был оценен по комплексу показателей. В итоге, получили средний показатель риска заражения ГЛПС на территории административного района. При этом установлено, что населенные пункты, в которых постоянно регистрируют случаи заражения ГЛПС, расположены в среднем в 2,5 раза ближе к лесным массивам и в 1,6 раза к воде, чем населенные пункты, в которых заболеваемость ГЛПС не зарегистрирована. В связи с тем, что в анализе ис-

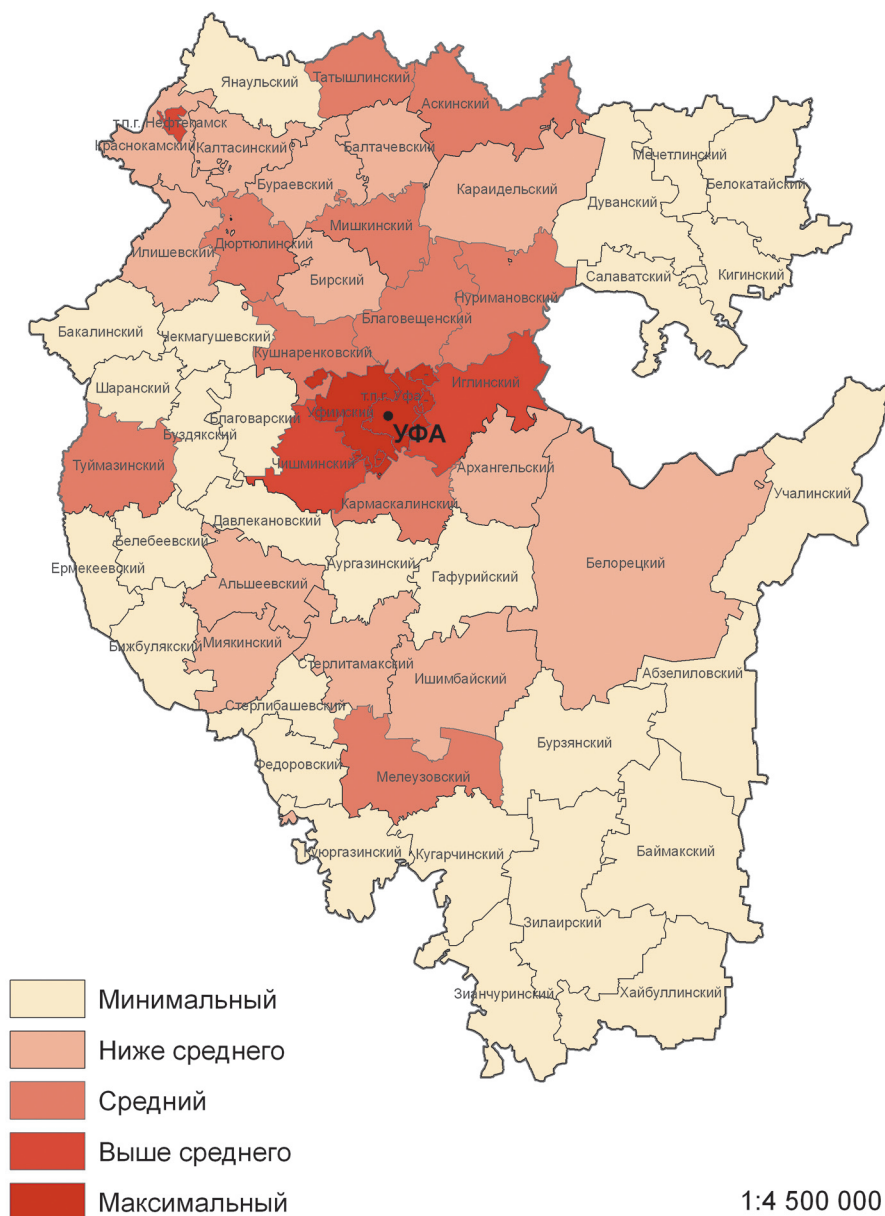


Рис. 2. Эпидемиологическое районирование Республики Башкортостан по величине эпидемиологического риска заражения ГЛПС

пользованы данные о месте регистрации больных, а не месте инфицирования, имело место системное завышение частоты эпидемических проявлений ГЛПС в крупных населенных пунктах. В этом плане весьма показательно, что в Уфе ежегодно регистрируют до 50 % всех случаев заражений ГЛПС на территории Республики Башкортостан. Однако фактическое число заражений непосредственно в Уфе значительно меньше. Полученные результаты позволили провести качественную оценку риска заражения ГЛПС в границах административных территорий Республики Башкортостан (рис. 2).

В заключение отметим, что в результате выполненной дифференциации эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан по степени риска заражения открывается перспектива дальнейшего снижения уровня заболеваемости и повышения эффективности неспецифической профилактики. Полученные результаты служат научным обоснованием приоритетности финансирования профи-

лактических мероприятий в границах административных территорий, характеризующихся высокой степенью потенциальной эпидемической опасности. Полученные результаты ГИС-анализа также объективно свидетельствуют о перспективности внедрения в практику эпидемиологического надзора за ГЛПС геокодирования. При этом для получения более точных характеристик пространственной структуры природных очагов ГЛПС необходимо проводить и ГИС-анализ данных эпизоотологического обследования.

Дальнейшее применение ГИС-технологий для целей эпидемиологического мониторинга эндемичных по ГЛПС территорий Республики Башкортостан позволит создать единую картографическую основу, объединяющую результаты многолетних полевых и лабораторных исследований и материалов эпидемиологических ретроспективных реконструкций. Необходимо также усовершенствовать нормативную базу, регламентирующую методы дифференциации

очаговых территорий по степени потенциальной эпидемической опасности, краткосрочного и долгосрочного прогнозирования эпидемиологической обстановки, выбора сроков и определения объемов профилактических мероприятий в сезонном и многолетнем аспектах.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Магазов Р.Ш., редактор. История изучения и современное состояние проблемы ГЛПС в Республике Башкортостан. Уфа: Гилем; 2006. 555 с.
2. Минин Г.Д., Коробов Л.И., Валеев В.Т., Рожкова Е.В. Организация неспецифической профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на эндемичной территории Республики Башкортостан. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2013; 2:50–3.
3. Минин Г.Д., Коробов Л.И., Степаненко А.Г. Эпидемиология и эпизоотология хантавирусной инфекции ГЛПС в Башкортостане. В кн.: Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом: актуальные проблемы эпидемиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики. Уфа: Гилем; 2006. С. 16–36.
4. Мочалкин А.П., Аминов Д.Г., Баязитов У.Ш. Статистическая оценка связей между солнечной активностью, эпидемическим, эпизоотическим процессами при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в природном очаге. *Дез. дело.* 2004; 4:63–6.
5. Мочалкин П.А., Рябов С.В., Мочалкин А.П., Шутова М.И., Матросов А.Н., Тарасов М.А. Неспецифическая профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Республике Башкирия. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 2(100):30–7.
6. Мочалкин П.А., Мочалкин А.П., Степанов Е.Г., Фарвазов Л.А., Попов Н.В. Оценка потенциальной эпидемической опасности сопряженных очагов ГЛПС в г. Уфе. *Пест-менеджмент.* 2014; 1:11–5.
7. Мясников Ю.А., редактор. Эпидемиологические типы заболеваемости ГЛПС в Башкирской АССР. Уфа; 1971. 620 с.
8. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б. Эпидемиологический надзор и профилактика геморрагической лихорадки с почечным синдромом в РФ. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2013; 4:23–32.
9. Плохинский Н.А. Биометрия. М.; 1970. 367 с.
10. Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Актуальные вопросы геоинформационного обеспечения мониторинга и прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы и других зоонозных инфекций на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):28–30.
11. Попов Н.В., Топорков В.П., Сафронов В.А., Кузнецов А.А., Рябов С.В., Санджиев Д.Н. Современные направления снижения уровня заболеваемости природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол. Актуальные вопр.* 2013; 5:15–7.
12. Рябов С.В., Попов Н.В., Мочалкин П.А., Мочалкин А.П. К вопросу о прогнозировании заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. *Дез. дело.* 2012; 1:35–41.
13. Такаев Р.М., Кучимова Н.А., Мавлютов О.М. Профилактика инфекционных заболеваний в Республике Башкортостан. *Дез. дело.* 2009; 3:37–9.

References

1. Magazov R.Sh., editor. [History of Investigation and Current State of HFRS Issue in the Republic of Bashkortostan]. Ufa: Gilem; 2006. 555 p.
2. Minin G.D., Korobov L.I., Valeev V.T., Rozhkova E.V. [Management of non-specific prophylaxis of hemorrhagic fever with renal syndrome in the endemic territory of the Republic of Bashkortostan]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2013; 2:50–3.
3. Minin G.D., Korobov L.I., Stepanenko A.G. [Epidemiology and epizootology of hantavirus infection, HFRS, in Bashkortostan]. In: [Hemorrhagic Fever with renal Syndrome: Topical Issues of Epidemiology, Pathogenesis, Diagnostics, Treatment, and Prophylaxis]. Ufa: Gilem; 2006. P. 16–36.
4. Mochalkin A.P., Aminov D.G., Bayazitov U.Sh. [Statistical analysis of a link between solar activity, epidemic and epizootic processes in case of hemorrhagic fever with renal syndrome in the natural focus]. *Dez. Delo.* 2004; 4:63–6.
5. Mochalkin P.A., Ryabov S.V., Mochalkin A.P., Shutova M.I., Matrosov A.N., Tarasov M.A. [Nonspecific prophylaxis of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Republic of Bashkortostan]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 2(104):35–42.
6. Mochalkin P.A., Mochalkin A.P., Stepanov E.G., Farvazov L.A., Popov N.V. [Assessment of the potential epidemic hazard of associated HFRS foci in Ufa]. *Pest-Management.* 2014; 1:11–5.
7. Miasnikov Yu.A., editor. [Epidemiological Types of HFRS Morbidity in Bashkir Autonomous Soviet Socialist Republic]. Ufa; 1971. 620 p.
8. Onishchenko G.G., Ezhlova E.B. [Epidemiological monitoring and prophylaxis of hemorrhagic fever with renal syndrome in RF]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2013; 4:23–32.
9. Plokhinsky N.A. [Biometry]. M.; 1970. 367 p.
10. Popov N.V., Kouklev E.V., Kutyrev V.V. [Actual issues of geo-informational support to provide for monitoring and prognostication of epizootic activity in natural foci of plague and other zoonotic infections in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):28–30.
11. Popov N.V., Toporkov V.P., Safronov V.A., Kuznetsov A.A., Ryabov S.V., Sandzhev D.N. [Current downward trends in the morbidity rates of natural-focal infections in the territory of the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol. Aktual. Vopr.* 2013; 5:15–7.
12. Ryabov S.V., Popov N.V., Mochalkin P.A., Mochalkin A.P. [Forecasting of morbidity rates of hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Dez. Delo.* 2012; 1:35–41.
13. Takaev R.M., Kuchimova N.A., Mavlyutov O.M. [Prophylaxis of infectious diseases in the Republic of Bashkortostan]. *Dez. Delo.* 2009; 3:37–9.

Authors:

Ivanova A.V., Safronov V.A., Popov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Stepanov E.G. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Bashkortostan. 58, R.Zorge St., Ufa, Russian Federation. E-mail: Stepanov_EG@02.rospotrebnadzor.ru.
 Mochalkin P.A. Republican Center for Disinfection at the Ministry of Health of the Republic of Bashkortostan. 127/1, Mingazhaeva St., Ufa, Russian Federation. E-mail: dezufa@dez-ufa.ru.

Об авторах:

Иванова А.В., Сафронов В.А., Попов Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru
 Степанов Е.Г. Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан. Российская Федерация, Уфа, ул. Р.Зорге, 58. E-mail: Stepanov_EG@02.rospotrebnadzor.ru
 Мочалкин П.А. Республиканский центр дезинфекции МЗ Республики Башкортостан. Российская Федерация, Уфа, ул. Мингажаева, 127/1. E-mail: dezufa@dez-ufa.ru.

Поступила 04.02.15.

И.Г.Карнаухов, И.Н.Шарова, Е.С.Казакова, К.М.Морозов, С.А.Щербаклова, В.В.Кутырев

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ МОБИЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ НА БАЗЕ АВТОШАССИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В статье показана историческая ретроспектива создания мобильных лабораторий на базе автошасси для диагностики инфекционных болезней в Российской Федерации, а также представлена информация о подобных лабораториях зарубежного производства. С позиций системного подхода и системно-функционального анализа проанализирован опыт, имеющийся у Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» в области создания мобильных лабораторий для осуществления индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней I–IV групп патогенности. Определены, научно обоснованы и подробно рассмотрены десять основных принципов, лежащих в основе разработки и создания мобильных лабораторий для осуществления лабораторной диагностики инфекционных болезней.

Ключевые слова: мобильная лаборатория, индикация и идентификация ПБА, СПЭБ, биологическая безопасность.

Корреспондирующий автор: Карнаухов Игорь Геннадьевич, e-mail: rusrap@microbe.ru.

I.G.Karnaukhov, I.N.Sharova, E.S.Kazakova, K.M.Morozov, S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

Basic Principles of Construction of Mobile Truck-Mounted Laboratories for Indication and Identification of Infectious Disease Agents

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The paper covers historical retrospective of mobile truck-mounted laboratory construction, used for diagnostics of infectious diseases in the Russian Federation, as well as information on analogous laboratories of foreign manufacture. From the standpoint of systemic approach and systemic-functional analysis, investigated has been experience of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" in developing mobile complexes for indication and identification of infectious disease agents, I–IV pathogenicity groups. Outlined, scientifically substantiated and considered in depth are ten basic principles, underlying design and construction of mobile laboratories for laboratory diagnostics of infectious diseases.

Key words: mobile laboratory, indication and identification of PBA, SAET, biological safety.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Igor G. Karnaukhov, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Citation: Karnaukhov I.G., Sharova I.N., Kazakova E.S., Morozov K.M., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Basic Principles of Construction of Mobile Truck-Mounted Laboratories for Indication and Identification of Infectious Disease Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:45–49. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-45-49

Использование мобильных лабораторий в различных сферах деятельности человека чрезвычайно актуально на сегодняшний день. Многие ведомства Российской Федерации (МЧС, Министерство обороны, Министерство здравоохранения и др.) применяют в своей работе мобильные лаборатории на базе автошасси. В России целый ряд компаний занимается переоборудованием транспортных средств и созданием мобильных лабораторий, далеко не полный перечень которых включает экологические, метрологические лаборатории, лаборатории радиационного контроля, химико-радиометрические, электротехнические лаборатории, лаборатории контроля качества нефтепродуктов, лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы, строительные лаборатории, медико-биологические лаборатории спорта, лаборатории энергоаудита, лаборатории связи, дорожные лаборатории, лаборатории неразрушающего контроля и технической диагностики, лаборатории для ликвидации аварийных ситуаций, представляющих химическую и радиационную опасность; мобильные медицинские комплексы, передвижные телемедицинские

комплексы, мобильные пункты управления и узлы связи. Мобильные лаборатории могут создаваться на базе различных автомашин как отечественного, так и импортного производства, наиболее используемые – КАМАЗ, Газель, Фольксваген, ПАЗ, Форд, Фиат.

Отдельным вопросом является создание и эксплуатация мобильных лабораторий на базе автошасси, предназначенных для индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней I–IV групп патогенности.

Имеется информация о производстве таких лабораторий зарубежными компаниями. Например, итальянская фирма «CRISTANINI S.p.A» производит автономные лаборатории различного профиля на базе контейнеров, которые могут транспортироваться железнодорожным, воздушным, морским, автомобильным транспортом. Лаборатории имеют автономное энергообеспечение, высокий уровень биологической защиты, обеспечиваемый наличием фильтровентиляционных систем.

Мобильные лаборатории различного предназначения производит американская компания «Germfree»

(USA). Выбор платформ для постройки лабораторий очень широк. К их числу относятся трейлеры, грузовики и транспортные контейнеры. Платформы для мобильных лабораторий соответствуют III уровню биологической безопасности и оснащены оптимизированными системами первичной и вторичной изоляции для расширения функциональности лабораторий, эффективности использования пространства и повышения маневренности. Лаборатории оснащены автономными системами энергоснабжения, фильтровентиляционными системами с HEPA-фильтрами.

Мобильные лаборатории на базе автошасси для лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней разрабатывались и в России. В 1973 г. в СССР начато производство автолаборатории АЛ-3. Лаборатория размещалась в специальном кузове, установленном на шасси автомобиля ГАЗ-66. Кузов разделен на два отделения: лабораторное и стерилизационно-заготовительное (подготовительное). Отделения оснащены лабораторными столами, термостатом, автоклавом, вытяжным и сушильным шкафами, укладочными ящиками. Лаборатория предназначалась для проведения микробиологических, санитарно-гигиенических и химикотоксикологических исследований. Обслуживающий персонал – 3–5 человек. Такими лабораториями оснастили ряд противочумных учреждений и санитарно-эпидемиологических станций. Эти лаборатории не соответствуют требованиям действующих в настоящее время санитарно-эпидемиологических правил, регламентирующих безопасность работы с возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности.

Мобильные лаборатории для проведения противоэпидемических мероприятий, в том числе индикации ПБА в объектах окружающей среды, проведения дезинфекционных мероприятий, имеются на оснащении вооруженных сил Российской Федерации. В то же время, в гражданской сфере после лабораторий АЛ-3 и АЛ-4 до 2006 г. ничего нового не было разработано и мобильные лаборатории на базе автошасси для лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней до последнего времени практически не использовались.

В 2006 г. в РосНИПЧИ «Микроб» разработана и создана совместно с ЗАО «Радиян» (Саратов) мобильная лаборатория эпидемиологической разведки и индикации на базе автомашины «Газель». Разработка защищена патентом на полезную модель [4]. Лаборатория имеет все необходимые регистрационные и разрешительные документы, позволяющие осуществлять работу с возбудителями инфекционных болезней I–IV групп патогенности. С учетом опыта данной разработки дано научное обоснование применения мобильных лабораторий для противоэпидемического обеспечения населения в условиях ЧС санитарно-эпидемиологического характера [1].

В 2007–2008 гг. в РосНИПЧИ «Микроб» впервые в мировой практике был научно обоснован, разработан и совместно с ООО «Автоспектр НН» (Нижний

Новгород) создан комплекс мобильных лабораторий на базе автошасси [5]. Научная новизна инновационных разработок защищена 5 патентами Российской Федерации (№№ 65434, 65833, 65437, 65435, 65436).

Структурно-функциональные и технические особенности лабораторий мобильного комплекса были рассмотрены ранее [6].

Используя накопленный опыт разработки и создания мобильных лабораторий для диагностики инфекционных болезней, представляется целесообразным определить основные принципы, лежащие в основе создания такого рода лабораторий. Для реализации этой задачи мы рассмотрели мобильную лабораторию на базе автошасси с позиций системного подхода и системно-функционального анализа. Известно, что при создании любой системы необходимо прежде всего обосновать перечень функций и принципов, которые должны быть положены в основу создаваемого объекта, поскольку именно они определяют структуру системы. Исходя из этого, первый принцип можно определить как соответствие структуры мобильной лаборатории (типа и количества единиц базового автошасси, набора лабораторного оборудования и систем жизнеобеспечения) тем функциям, которые она должна выполнять.

Функции мобильной лаборатории эпидразведки и индикации ограничивались в основном проведением эпидемиологической разведки и индикацией возбудителей бактериальных и вирусных инфекций как в населенных пунктах, так и в полевых условиях. Для реализации этих функций вполне достаточно одного базового автошасси, его габаритность могла варьировать. В то же время функции мобильного комплекса СПЭБ включали весь спектр исследований, необходимых для оценки санитарно-гигиенической обстановки в зоне ЧС. Это и индикация ПБА в различных объектах, и проведение исследований классическим бактериологическим методом, и использование биологического метода, и проведение санитарно-микробиологических исследований, и обеззараживание биологических отходов. Обеспечение в полной мере реализации всех перечисленных функций стало возможным только при задействовании пяти лабораторных модулей на базе автошасси различного профиля. При этом перечень лабораторного оборудования каждого модуля полностью соответствует его функции.

Набор систем жизнеобеспечения как мобильной лаборатории эпидразведки и индикации, так и лабораторий мобильного комплекса СПЭБ определялся, во-первых, необходимостью обеспечения работы в полностью автономных условиях, во-вторых, важностью создания комфортных, оптимальных условий для работы персонала. Перечень этих систем включал: системы энергообеспечения, вентиляции, отопления и кондиционирования, водоснабжения, обеспечения связи и передачи информации.

В свою очередь, принцип автономности можно рассматривать как один из основных принципов создания мобильных лабораторий. Ведь назначение

мобильных лабораторий – приблизить лабораторную диагностику к месту возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера. Если это место находится вне инфраструктуры населенного пункта, то возникает необходимость обеспечения работы в автономных условиях. Поэтому без реализации принципа автономности (второй принцип) мобильная лаборатория будет неполноценной и не будет соответствовать своему предназначению.

Третьим важным принципом при создании мобильных лабораторий является принцип мобильности. Понятно, что его реализация определяется уже самим использованием автошасси. В то же время содержание данного принципа значительно шире. Дело в том, что мобильные лаборатории могут доставляться в нужное место не только своим ходом по автомагистралям, но и другими видами транспорта, включая железнодорожный, морской, авиационный. Так, например, концепция СПЭБ предполагает перемещение модулей мобильного комплекса СПЭБ на расстояние свыше 2000 км авиационным транспортом. Поскольку наиболее распространенным на сегодняшний день в России видом транспортного самолета является Ил-76, а высота его транспортного отсека составляет 3 м 40 см, то возникло требование по ограничению максимальной высоты автолабораторий в пределах 3 м 30 см. Кроме того, поскольку предполагалась возможность использования СПЭБ практически в любых условиях, в том числе в условиях бездорожья, базовые автошасси для автолабораторий СПЭБ должны были быть повышенной проходимости.

Таким образом, в ходе реализации принципа мобильности следует учитывать (если это необходимо) возможность доставки мобильных лабораторий другими видами транспорта и возможные условия эксплуатации с учетом дорожного покрытия.

В качестве четвертого принципа создания мобильных лабораторий можно назвать принцип соответствия требованиям Технического регламента о безопасности колесных транспортных средств и требованиям Правил дорожного движения (ПДД). В соответствии с ПДД и требованиями Приложения № 4 к техническому регламенту о безопасности колесных транспортных средств «Габаритные и весовые ограничения, действующие в отношении транспортных средств» (в ред. постановления Правительства РФ от 10.09.2010 г. № 706) ширина автолаборатории не может превышать 2500 мм, длина сцепки «лаборатория на базе тягача – лаборатория на базе прицепа» не может быть больше 20 м. Высота мобильной лаборатории (для транспортного средства категорий М3, N3, O) не должна превышать 4 м.

В качестве пятого принципа можно выделить принцип высокой технологичности. Реализация данного принципа как при создании лаборатории эпидразведки и индикации, так и при создании МК СПЭБ выразилась в использовании самого современного на текущий момент высокотехнологичного лабораторно-

го оборудования и современных технических средств при разработке систем жизнеобеспечения.

Приобретаемое оборудование по своим метрологическим и техническим характеристикам должно в обязательном порядке удовлетворять требованиям, предъявляемым к оборудованию аккредитованных лабораторий, а также позволять проводить испытания продукции с производительностью и себестоимостью, обеспечивающими выполнение задач, решаемых мобильной лабораторией. Производительность оборудования должна позволять проводить испытания в соответствии с производственной мощностью автолаборатории, само оборудование соответствовать требованиям безопасности и не наносить вреда окружающей среде. Съемное аналитическое оборудование обеспечивает возможность использования самых современных диагностических технологий и ускоренных методов лабораторного исследования.

Один из важнейших принципов создания мобильных лабораторий – это принцип биологической безопасности. Его реализация является наиболее сложной в техническом отношении. Именно соблюдение этого принципа (шестого) отличает автолаборатории, предназначенные для диагностики возбудителей инфекционных болезней, от автолабораторий любого другого профиля. Поэтому уровень биологической безопасности для каждой конкретной автолаборатории должен быть определен заранее. В соответствии с требованиями ВОЗ, уровень биобезопасности для конкретных работ устанавливается по заключению специалистов на основе оценки рисков [7]. При этом принимается в расчет используемый микроорганизм (патогенные агенты), доступные средства, а также оборудование, используемое в практической работе, и процедуры, необходимые для безопасного проведения работы в лаборатории. Поэтому для установления уровня биологической безопасности в мобильной лаборатории должны быть совершенно четко определены ее задачи, используемое лабораторное оборудование и перечень возбудителей инфекционных болезней, с которыми могут проводиться работы.

В случае МК СПЭБ на основе экспертных оценок установлен уровень биологической безопасности BSL-2 – для бактериологической и санитарно-гигиенической лабораторий, BSL-3 – для лабораторий индикации и особо опасных инфекций. В соответствии с критериями ВОЗ и требованиями российских нормативных документов по обеспечению биологической безопасности при работе с ПБА, при работе в автолабораториях необходимый уровень защиты персонала и окружающей среды реализуется за счет наличия ряда инженерно-технических средств:

- боксов микробиологической безопасности 3 класса защиты (в лабораториях индикации и особо опасных инфекций);

- боксов микробиологической безопасности 2 класса защиты в лаборатории индикации, бактериологической и санитарно-гигиенической лабораториях;

- шкафа с вентилируемыми клетками для содержания лабораторных животных, оборудованными фильтрами тонкой очистки (в лаборатории особо опасных инфекций);

- санпропускников с душем и взаимоблокировкой дверей во всех лабораториях;

- систем создания пониженного давления в рабочих помещениях лабораторий индикации и особо опасных инфекций с наличием визуальной и звуковой сигнализации на случай повышения давления выше критического;

- фильтровентиляционных систем, оборудованных фильтрами тонкой очистки (HEPA-фильтрами) 14 класса защиты во всех лабораториях;

- бактерицидных облучателей рециркуляторного типа и передвижных бактерицидных облучателей открытого типа во всех лабораториях;

- автоклава для деконтаминации биологических отходов в блоке поддержки бактериологических исследований;

- систем, позволяющих осуществлять сбор и химическую дезинфекцию сточных вод во всех лабораториях;

- оборудования для проведения дезинфекционной обработки;

- фильтрующих и изолирующих средств индивидуальной защиты органов дыхания и кожных покровов персонала;

- технических средств передачи информации (радиосвязи между автолабораториями и между каждой лабораторией и штабным модулем, системы спутниковой связи);

- системы контроля управления доступом (СКУД).

Необходимо отметить, что лаборатории мобильного комплекса полностью отвечают требованиям СП 1.3.3118-13 и СП 1.3.2322-08 и в установленном порядке прошли аккредитацию на соответствие общим требованиям, установленным в международном стандарте ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» в системе Росаккредитации (ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006).

В качестве седьмого принципа создания мобильных лабораторий можно выделить принцип компактности и эргономичности, предусматривающий эффективное использование пространства в рабочем помещении лаборатории. Необходимость реализации данного принципа обусловлена тем, что габариты мобильных лабораторий ограничены требованиями ряда нормативных документов.

Например, лаборатории МК СПЭБ спроектированы таким образом, чтобы обеспечить рациональное размещение рабочих мест в помещениях комплекса, компактное расположение приборов и оборудования, максимальное использование свободного пространства в лабораториях. Для обеспечения реализации этого принципа большое значение имеют габаритные характеристики используемых при-

боров и оборудования.

Несомненно, важна реализация принципа комфортности (восьмой принцип), предусматривающего создание для человека, как основного элемента системы, максимума удобств для работы и реализации своих возможностей. В случае мобильной лаборатории комфортность определяется оптимальными условиями обитаемости для персонала: температурой в рабочем помещении в пределах 21–23 °С, соответствием санитарно-гигиенических характеристик рабочих мест (уровень освещенности и шума, показатель кратности воздухообмена) требованиям нормативных документов (СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03; СанПиН 2.2.4.548-96; СНИП 41-01-2003; СН 2.2.4/2.1.8.562-96).

Девятый принцип – принцип экономической целесообразности (экономичности), предусматривающий минимизацию финансовых затрат на создание и дальнейшее обслуживание автолаборатории, достижение оптимального соотношения показателя стоимость/качество при безусловном достижении тех целей, которые ставились при проектировании лаборатории. При создании МК СПЭБ прорабатывались такие вопросы, как цена автолаборатории, возможность гарантийного и послегарантийного обслуживания и его стоимость. Стоимость мобильных лабораторий МК СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» в ценах 2009 г. составила от 6,5 до 10,5 млн руб. за 1 модуль. Стоимость автолаборатории зарубежного производства (США, Италия) с аналогичными характеристиками колеблется на сегодняшний день в пределах 1 млн евро. Гарантийное и послегарантийное обслуживание мобильных лабораторий на базе автошасси российского производства и созданных отечественными производителями намного проще и дешевле.

Кроме того, при покупке оборудования необходимо учитывать наличие собственного квалифицированного обслуживающего персонала или сервисных служб и опыт взаимодействия с ними (оперативность, квалификация специалистов сервиса, объем гарантийного обслуживания и его стоимость). Необходимо продумать, кем будет аттестовываться и поверяться закупаемое оборудование, учитывая, что для некоторых типов средств измерения и испытательного оборудования процедура поверки или аттестации может потребовать исключение поверяемого оборудования из рабочего цикла лаборатории на срок проведения метрологических процедур.

С точки зрения экономичности также очень важным является вопрос эксплуатации аналитического высокотехнологичного оборудования мобильных лабораторий в режиме повседневной деятельности. Аналитическое оборудование должно быть съемным, а его эксплуатация и техническое обслуживание в период, когда мобильная лаборатория не используется, должны осуществляться в стационарных лабораториях учреждения. Это чрезвычайно важно как с экономической точки зрения, поскольку позволяет избежать простоя дорогостоящего оборудования, так

и с точки зрения подготовки кадров, так как в стационарной лаборатории специалисты работают на том же лабораторном оборудовании, что и в мобильной лаборатории. Этот принцип полностью реализуется в работе СПЭБ.

Необходимо остановиться и на принципе обеспечения пожарной безопасности (десятый принцип) работы в мобильных лабораториях (ФЗ № 123-ФЗ от 22 июля 2008 г.; ФЗ № 117-ФЗ от 10 июля 2012 г.; Постановление Правительства РФ № 390 от 25 апреля 2012 г.). В этих целях на стадии проектирования мобильной лаборатории обязательно предусматриваются аварийные выходы (двери, окна) из рабочих помещений лаборатории на случай пожара. Также предусматривается установка аварийной сигнализации и укомплектование рабочих помещений автолаборатории огнетушителями.

Таким образом, с учетом имеющегося опыта, можно выделить 10 основных принципов разработки и создания мобильных лабораторий для осуществления лабораторной диагностики инфекционных болезней: соответствие структуры мобильной лаборатории тем функциям, которые она должна выполнять; автономность; мобильность; соответствие требованиям Технического регламента о безопасности колесных транспортных средств и требованиям Правил дорожного движения; высокая технологичность; биологическая безопасность; компактность и эргономичность; комфортность для персонала; экономическая целесообразность; пожарная безопасность.

Все вышеперечисленные принципы учтены при создании еще одной оригинальной разработки, проведенной в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)». Научно обоснована и создана проектная документация на мобильную лабораторию индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций. Научная новизна данной разработки защищена патентами Российской Федерации [2, 3, 8].

Также в полной мере все упомянутые принципы реализуются в ходе исполнения в 2015–2016 гг. распоряжения Правительства Российской Федерации № 1965-р от 07.10.2014 г., касающегося оказания Российской Федерацией материально-технической и методической поддержки реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории государств-участников СНГ, в том числе поставки мобильных лабораторий для осуществления индикации возбудителей особо опасных и других природно-очаговых инфекций на базе автошасси.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г. Применение мобильных лабораторий для противоэпидемического обеспечения населения в условиях ЧС. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 1(93):27–9.
2. Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Шарова И.Н., Щербakov Д.А., Щербakova C.A., Казакова Е.С. Мобильная лаборатория для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций. Патент РФ № 112112, опубл. 10.01.12. Бюл. № 1.
3. Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Щербakov C.A., Щербakov Д.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Мобильная лаборатория для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций. Патент РФ № 98369, опубл. 20.10.10. Бюл. № 29.
4. Кутырев В.В., Топорков А.В., Куличенко А.Н., Карнаухов И.Г., Щербakov C.A., Осина Н.А., Шарова И.Н., Шадрухин А.В., Шадрухин А.А. Мобильная лаборатория эпидразведки и индикации. Патент РФ № 61209, опубл. 27.02.07. Бюл. № 6.
5. Кутырев В.В., Топорков А.В., Топорков В.П., Карнаухов И.Г. Мобильный противоэпидемический комплекс. Патент РФ № 66723, опубл. 27.09.07. Бюл. № 27.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Щербakov Д.А., Казакова Е.С., Щербakov C.A. Обеспечение модернизации специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) на современном этапе. *Пробл. особо опасных инф.* 2003; 3(101):10–8.
7. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. ВОЗ, Женева; 2004. 190 с.
8. Шарова И.Н., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С., Щербakov Д.А., Пчелинцева М.В., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Глазков А.Н., Щербakov C.A., Топорков А.В., Кутырев В.В. Разработка мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга природно-очаговых и других опасных инфекционных болезней. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 4(102):45–9.

References

1. Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G. [The use of mobile laboratories for anti-epidemic protection of the population in emergency situations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 1(93):27–9.
2. Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Sharova I.N., Shcherbakov D.A., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S. [Mobile laboratory for epizootiological monitoring of particularly dangerous and other natural-focal infections]. RF Patent No 112112, 10.01.12.
3. Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Shcherbakov S.A., Shcherbakov D.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. [Mobile laboratory for epizootiological monitoring of particularly dangerous and other natural-focal infections]. RF Patent No 198369, 20.10.10.
4. Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Kulichenko A.N., Karnaukhov I.G., Shcherbakova S.A., Osina N.A., Sharova I.N., Shadruxhin A.V., Shadruxhin A.A. [Mobile laboratory of epidemiological reconnaissance and indication]. RF Patent No 161209, 27.02.07.
5. Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Karnaukhov I.G. [Mobile anti-epidemic complex]. RF Patent No 66723, 27.09.07.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Shcherbakov D.A., Kazakova E.S., Shcherbakova S.A. [Provision of modernization of the specialized anti-epidemic teams (SAETs) at the present stage]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2003; 3(101):10–8.
7. [Laboratory Biosafety Manual]. WHO, Geneva; 2004. 190 p.
8. Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Shcherbakov D.A., Pchelintseva M.V., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Glazkov A.N., Shcherbakova S.A., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Development of mobile indication laboratory for carrying out the epizootiological monitoring of natural-focal and other dangerous infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 4(102):45–9.

Authors:

Karnaukhov I.G., Sharova I.N., Kazakova E.S., Morozov K.M., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Карнаухов И.Г., Шарова И.Н., Казакова Е.С., Морозов К.М., Щербakova C.A., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 09.07.15.

В.Б.Кириллов, С.Л.Кириллова, С.В.Борисевич

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПОСЛЕДСТВИЙ СМОДЕЛИРОВАННОЙ ВСПЫШКИ ГРИППА А(Н7N9) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» МО РФ, Сергиев Посад, Российская Федерация

Цель работы – оценить экономический ущерб вследствие появления вируса гриппа А(Н7N9) на территории Российской Федерации. **Материалы и методы.** Экономический ущерб от летальных случаев заболевания рассчитывали с использованием индекса DALY, учитывающего количество недожитых лет полноценной жизни в зависимости от возраста заболевших и соответствующую величину недополученного валового внутреннего продукта. **Результаты и выводы.** Поскольку в настоящее время в Китае фиксируют небольшое количество случаев болезни, следует ожидать единичные случаи заболевания среди лиц, прибывающих в Российскую Федерацию из этой страны. Экономический ущерб рассчитывали для вспышки, при которой в результате инфицирования вирусом гриппа А(Н7N9) заболеют два человека. Предполагали, что возраст одного из заболевших превышает 50 лет, и для него болезнь завершится летальным исходом. Затраты на лечение двух человек могут составить от 10,9 до 21,8 тыс. руб., а экономический ущерб от недополученного ВВП – до 3900 тыс. руб.

Ключевые слова: грипп А(Н7N9), экономический ущерб, прогнозирование, индекс DALY.

Корреспондирующий автор: Кириллов В.Б., e-mail: 48cnii@mail.ru.

V.B.Kirillov, S.L.Kirillova, S.V.Borisevich

Forecasting of the After-Effects of A(H7N9) Modelled Outbreak in the Territory of the Russian Federation

The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Objective of the study is to evaluate economic losses in the consequence of A(H7N9) virus emergence in the territory of the Russian Federation. **Materials and methods.** Economic damage from induced fatalities has been predicted using DALY index, taking into account the life loss, depending upon the age of the infected persons and associated amount of short-received gross domestic product (GDP). **Results and conclusions.** Since nowadays there are reported cases of the disease in China, one should expect individual cases of flu among those, arriving in the Russian Federation from this country. Economic loss is forecasted for the outbreak involving infection of two individuals with A(H7N9) virus; the age of the first patient is over 50, and the outcome of his disease will be lethal. Treatment expenses for two patients may come up to 10.9-21.8 thousand rubles, and economic impact from short-received GDP – up to 3900 thousand rubles.

Key words: A(H7N9) flu, economic loss, forecasting, DALY index.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: V.B.Kirillov, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V. Forecasting of the After-Effects of A(H7N9) Modelled Outbreak in the Territory of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:50–52. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-50-52

Вирус гриппа А(Н7N9) впервые выделен от человека в Китае в марте 2013 г. [12]. К середине января 2015 г. органами здравоохранения зафиксировано 460 случаев болезни во многих провинциях континентального Китая (рисунок) [6].

С большой вероятностью можно утверждать, что источником одного из генов вируса гриппа А(Н7N9) является вирус подтипа Н7, циркулировавший ранее среди диких уток в районе дельты реки Янцзы. Утки, которых относят к одному из основных переносчиков вируса, могли передать его домашней птице. Следует отметить, что симптомы заболевания, в результате инфицирования человека вирусом гриппа А(Н7N9), весьма сходны с другим опасным для людей вирусом гриппа – А(Н5N1) [3].

В настоящее время специалистами Китая установлено, что одним из разносчиков вируса гриппа А(Н7N9) являются воробьи в силу большого сходства генетической структуры вирусов, изолированных от людей и воробьев [14]. Существенный рост количе-

ства заболевших с января 2014 г. обусловлен бессимптомным распространением вируса гриппа А(Н7N9) среди его естественных хозяев, в частности, среди домашних птиц [14]. Передачи от человека к человеку не выявлено [11]. У большинства пациентов с этой инфекцией развивалась тяжелая пневмония. Доля летальных исходов составила около 30 % [12, 13].

Наибольшее количество лабораторно подтвержденных случаев с тяжелыми проявлениями инфекции и летальными исходами зарегистрировано среди пациентов старше 50 лет, что не противоречит гипотезе о том, что заболевание у людей среднего возраста протекало в легкой форме и не было идентифицировано лабораторно [8, 12].

Симптомы болезни при инфицировании вирусом гриппа А(Н7N9) проявлялись в среднем в два раза дольше (41,7 сут), чем аналогичные симптомы в результате инфицирования возбудителем гриппа А(Н5N1) (18,7 сут). Среди пациентов младше 50 лет летальных исходов не наблюдалось, средний возраст



Провинции Китая, в которых зафиксированы случаи заболевания людей, вызванные вирусом гриппа А(Н7N9)

погибших составил около 70 лет [7, 9].

Хотя эпидемия в Китае резко пошла на спад после закрытия в апреле 2013 г. рынков по продаже живой домашней птицы, новые случаи заболевания у людей повторно появились в октябре 2013 г. и фиксировались в течение всего 2014 г. [6].

На 19 января 2015 г. в Китае зарегистрировано 484 случая заболевания людей гриппом А(Н7N9) в провинциях: Чжэцзян – 145 случаев, Гуандун – 124, Цзянсу – 63, Шанхае – 43, Фуцзянь – 28, Хунань – 24, Аньхой – 17, Цзянси – 9, Синьцзян – 9, Шаньдун – 6, Пекин – 5, Хэнань – 4, Гуанси – 3, Цзилинь – 2, Гуйчжоу – 1 и Хэбэй – 1 [6].

Учитывая биологические особенности вируса гриппа А(Н7N9) и возможные мутации, специалисты не исключают пандемическое распространение болезни, в том числе на территории РФ [15].

Поставки из Китая на территорию Российской Федерации (РФ) яиц домашней птицы запрещены с 2004 г., однако их незаконный ввоз из Китая на территорию Дальнего Востока продолжается. Так, контрабандная продукция (1733 утиных яйца) изъята сотрудниками ФСБ России и Россельхознадзора на крупной оптово-розничной торговой базе Уссурийска [4]. Поэтому необходимо принимать меры по усилению контроля за птицей на предприятиях по ее выращиванию, а также активизировать работы по изучению свойств данного вируса.

В сентябре 2014 г. зафиксирован занос из Китая на территорию Алтайского края вируса гриппа А(Н5N1) и Якутию – А(Н5N8) [1, 10]. Нельзя исключить занос вируса гриппа А(Н7N9) на территорию РФ перелетными птицами и инфицированными людьми.

Учитывая актуальность проблемы, целесообразно оценить социально-экономический ущерб вследствие

появления вируса гриппа А(Н7N9) на территории РФ.

Материалы и методы

Наиболее вероятен занос вируса гриппа А(Н7N9) на территорию РФ человеком, находящимся в инкубационном периоде. Поскольку до настоящего времени передача вируса гриппа А(Н7N9) от человека человеку не выявлена, следует ожидать единичных случаев болезни. Не исключен контрабандный завоз яиц домашней птицы, инфицированных вирусом гриппа А(Н7N9).

Экономический ущерб от летальных случаев болезни рассчитывали с использованием индекса DALY, учитывающего количество недожитых лет полноценной жизни в зависимости от возраста заболевших и соответствующую величину недополученного валового внутреннего продукта (ВВП) [2].

Экономический ущерб от одного случая болезни, вызванного инфицированием вирусом гриппа А(Н7N9) без учета потерь ВВП от летальных исходов, приравнивали к величине экономического ущерба от гриппа в расчете на один средневзвешенный случай в РФ, рассчитанного по методике ФГБУ «Центрального НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора и периодически публикуемого в печати [5]. В 2013 г. эта величина составила 10,9 тыс. руб.

Принято допущение, что средняя летальность составит 30 %, а летальные исходы будут только среди лиц старше 50 лет. Доля этой возрастной категории в 2013 г. составляла 33,8 % населения РФ. Предполагали, что возрастное распределение в группе заболевших аналогично возрастному распределению населения РФ. ВВП на душу населения в РФ в 2012 г. составил 437,1 тыс. руб.

Результаты и обсуждение

Экономический ущерб рассчитывали для вспышки, при которой в результате инфицирования гриппом A(H7N9) заболеют два человека. Затраты на лечение одного больного приравнивали 10,9 тыс. руб. Предполагали, что возраст одного из заболевших превышает 50 лет, и для него болезнь завершится летальным исходом. С учетом принятых допущений затраты на лечение двух человек составят 21,8 тыс. руб. Количество недожитых лет полноценной жизни и экономический ущерб от недополученного ВВП в результате гибели одного из заболевших, прогнозируемые с использованием индекса DALY, составят 9 чел. лет и 4000 тыс. руб. соответственно.

Таким образом, на основании анализа данных литературы нами сделан вывод, что в настоящее время на территории РФ возможны вспышки болезни, вызванной вирусом гриппа A(H7N9), в результате которых могут заболеть 1–2 человека. Затраты на лечение могут составить от 10,9 до 21,8 тыс. руб., а экономический ущерб от недополученного ВВП – до 3900 тыс. руб.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В Алтайском крае зафиксирована вспышка высокопатогенного гриппа птиц. <http://emeat.ru/new.php?id=78067> (дата обращения 15.10.2014 г.)
2. Кириллов В.Б., Кириллова С.Л., Борисевич С.В., Лукин Е.П., Грабарев П.А. Прогнозирование социально-экономического ущерба от вспышек инфекционных болезней на примере Крымской геморрагической лихорадки. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:17–20.
3. Китайские ученые достигли прорыва в исследованиях вирусов птичьего гриппа AH7N9 и H5N1. <http://russian.cri.cn/1281/2013/05/06/1s467193.htm> (дата обращения 06.05.2013 г.)
4. Партию яиц из Китая сожгли в Приморье из-за подозрения на птичий грипп. <http://dv.kp.ru/online/news/1650881/> (дата обращения 05.02.2014 г.)
5. Экономический ущерб от инфекционных болезней в Российской Федерации. <http://old.rosпотреbnadzor.ru/activity/immunoprof/> (дата обращения 01.12.2011 г.)
6. China: CHP notified of human case of avian influenza A(H7N9) in Heyuan. [cited 20 Jan 2015]. Available from: <http://www.flu.org.cn/en/news-18068.html>
7. Cowling B.J., Jin L., Lau E.H.Y., Liao Q., Wu P., Jiang H., Tsang T.K., Zheng J., Fang V.J., Chang Z., Ni M.Y., Zhang Q., Ip D.K.M., Yu J., Li Y., Wang L., Tu W., Meng L., Wu J.T., Luo H., Li Q., Shu Y., Li Z., Feng Z., Yang W., Wang Y., Leung G.M., Yu H. Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases. *Lancet* 2013; 382(9887):129–37. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61171-X.
8. Feng L., Wu J.T., Liu X., Yang P., Tsang T.K., Jiang H., Wu P., Yang J., Fang V.J., Qin Y., Lau E.H., Li M., Zheng J., Peng Z., Xie Y., Wang Q., Li Z., Leung G.M., Gao G.F., Yu H., Cowling B.J. Clinical severity of human infections with avian influenza A(H7N9) virus, China, 2013/14. *Euro Surveill.* 2014; 19(49):pii=20984. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.49.20984.
9. Guo L., Zhang X., Ren L., Yu X., Chen L., Zhou H., Gao X., Teng Z., Li J., Hu J., Wu C., Xiao X., Zhu Y., Wang Q., Pang X., Jin Q., Wu F., Wang J. Human Antibody Responses to Avian Influenza A(H7N9) Virus, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(2):192–200. DOI: 10.3201/eid2002.131094.
10. Highly pathogenic avian influenza, Russia. [cited 10 Jan 2015]. Available from: http://www.oie.int/wahis/2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=16826.
11. Ren L., Yu X., Zhao B., Wu F., Jin Q., Zhang X., Wang J. Infection with Possible Precursor of Avian Influenza A(H7N9) Virus in a Child, China, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(8):1362–5. DOI: 10.3201/eid2008.140325.

12. Wang L., Cowling B.J., Wu P., Yu J., Li F., Zeng L., Wu J.T., Li Z., Leung G.M., Yu H. Human Exposure to Live Poultry and Psychological and Behavioral Responses to Influenza A(H7N9), China. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(8):1296–305. DOI: 10.3201/eid2008.131821.
13. Wu P., Fang V.J., Liao Q., Ng D.M.W., Wu J.T., Leung G.M., Fielding R., Cowling B.J. Responses to Threat of Influenza A(H7N9) and Support for Live Poultry Markets, Hong Kong, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(5):882–6. DOI: 10.3201/eid2005.131859.
14. Zhao B., Zhang X., Zhu W., Teng Z., Yu X., Gao Y., Wu D., Pei E., Yuan Z., Yang L., Wang D., Shu Y., Wu F. Novel Avian Influenza A(H7N9) Virus in Tree Sparrow, Shanghai, China, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(5):850–3. DOI: 10.3201/eid2005.131707.
15. Zhou J., Wang D., Gao R., Zhao B., Song J., Qi X., Zhang Y., Shi Y., Yang L., Zhu W., Bai T., Qin K., Lan Y., Zou S., Guo J., Dong J., Dong L., Zhang Y., Wei H., Li X., Lu J., Liu L., Zhao X., Li X., Huang W., Wen L., Bo H., Xin L., Chen Y., Xu C., Pei Y., Yang Y., Zhang X., Wang S., Feng Z., Han J., Yang W., Gao G., Wu G., Li D., Wang Y., Shu Y. Biological features of novel avian influenza A(H7N9) virus. *Nature*. 2013; 499(7459):500–3. DOI: 10.1038/nature12379.

References

1. [Outbreak of the highly pathogenic avian flu is reported in the Altai Region]. (Cited: 15 Oct 2014). Available from: <http://emeat.ru/new.php?id=78067>.
2. Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V., Lukin E.P., Grabarev P.A. [Forecasting of the socio-economic damage resulting from outbreaks of infectious diseases, by the example of Crimean hemorrhagic fever]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:17–20.
3. [Chinese researchers achieve progress in studies of avian flu viruses AH7N9 and H5N1]. (Cited 06 May 2013) Available from: <http://russian.cri.cn/1281/2013/05/06/1s467193.htm>.
4. [A supply of chicken eggs from China, suspected of avian flu infection, was destroyed by fire in Primorye]. (Cited 05 Feb 2014) Available from: <http://dv.kp.ru/online/news/1650881/>.
5. [Economic damage, imposed by infectious diseases in the Russian Federation]. (Cited 01 Dec 2011) Available from: <http://old.rosпотреbnadzor.ru/activity/immunoprof/>.
6. China: CHP notified of human case of avian influenza A(H7N9) in Heyuan. [cited 20 Jan 2015]. Available from: <http://www.flu.org.cn/en/news-18068.html>.
7. Cowling B.J., Jin L., Lau E.H.Y., Liao Q., Wu P., Jiang H., Tsang T.K., Zheng J., Fang V.J., Chang Z., Ni M.Y., Zhang Q., Ip D.K.M., Yu J., Li Y., Wang L., Tu W., Meng L., Wu J.T., Luo H., Li Q., Shu Y., Li Z., Feng Z., Yang W., Wang Y., Leung G.M., Yu H. Comparative epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) and H5N1 viruses in China: a population-based study of laboratory-confirmed cases. *Lancet* 2013; 382(9887):129–37. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61171-X.
8. Feng L., Wu J.T., Liu X., Yang P., Tsang T.K., Jiang H., Wu P., Yang J., Fang V.J., Qin Y., Lau E.H., Li M., Zheng J., Peng Z., Xie Y., Wang Q., Li Z., Leung G.M., Gao G.F., Yu H., Cowling B.J. Clinical severity of human infections with avian influenza A(H7N9) virus, China, 2013/14. *Euro Surveill.* 2014; 19(49):pii=20984. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.49.20984.
9. Guo L., Zhang X., Ren L., Yu X., Chen L., Zhou H., Gao X., Teng Z., Li J., Hu J., Wu C., Xiao X., Zhu Y., Wang Q., Pang X., Jin Q., Wu F., Wang J. Human Antibody Responses to Avian Influenza A(H7N9) Virus, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(2):192–200. DOI: 10.3201/eid2002.131094.
10. Highly pathogenic avian influenza, Russia. [cited 10 Jan 2015]. Available from: http://www.oie.int/wahis/2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=16826.
11. Ren L., Yu X., Zhao B., Wu F., Jin Q., Zhang X., Wang J. Infection with Possible Precursor of Avian Influenza A(H7N9) Virus in a Child, China, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(8):1362–5. DOI: 10.3201/eid2008.140325.
12. Wang L., Cowling B.J., Wu P., Yu J., Li F., Zeng L., Wu J.T., Li Z., Leung G.M., Yu H. Human Exposure to Live Poultry and Psychological and Behavioral Responses to Influenza A(H7N9), China. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(8):1296–305. DOI: 10.3201/eid2008.131821.
13. Wu P., Fang V.J., Liao Q., Ng D.M.W., Wu J.T., Leung G.M., Fielding R., Cowling B.J. Responses to Threat of Influenza A(H7N9) and Support for Live Poultry Markets, Hong Kong, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(5):882–6. DOI: 10.3201/eid2005.131859.
14. Zhao B., Zhang X., Zhu W., Teng Z., Yu X., Gao Y., Wu D., Pei E., Yuan Z., Yang L., Wang D., Shu Y., Wu F. Novel Avian Influenza A(H7N9) Virus in Tree Sparrow, Shanghai, China, 2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(5):850–3. DOI: 10.3201/eid2005.131707.
15. Zhou J., Wang D., Gao R., Zhao B., Song J., Qi X., Zhang Y., Shi Y., Yang L., Zhu W., Bai T., Qin K., Lan Y., Zou S., Guo J., Dong J., Dong L., Zhang Y., Wei H., Li X., Lu J., Liu L., Zhao X., Li X., Huang W., Wen L., Bo H., Xin L., Chen Y., Xu C., Pei Y., Yang Y., Zhang X., Wang S., Feng Z., Han J., Yang W., Gao G., Wu G., Li D., Wang Y., Shu Y. Biological features of novel avian influenza A(H7N9) virus. *Nature*. 2013; 499(7459):500–3. DOI: 10.1038/nature12379.

Authors:

Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Об авторах:

Кириллов В.Б., Кириллова С.Л., Борисевич С.В. Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Поступила 21.07.15.

Т.В.Князева¹, М.А.Патяшина², В.Б.Зиятдинов³, М.В.Хакимзянова³, Л.Ф.Садреева³, А.А.Гайнуллин³,
Г.Ш.Саифуллина³, Ю.Н.Янтыкова³, Д.Р.Губаева³, А.Н.Матросов¹, А.А.Кузнецов¹, Н.В.Попов¹

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Российская Федерация;
³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», Казань, Российская Федерация

Цель – оценка современного состояния эпизоотической активности природных очагов зоонозов как основа для разработки мер профилактики заболеваний природно-очаговыми болезнями при проведении массовых мероприятий. **Материалы и методы.** Использовали отчеты ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», данные Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан за 2009–2014 гг., литературные источники. **Результаты и выводы.** Наиболее актуальными природно-очаговыми инфекционными болезнями являются геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, иксодовый клещевой боррелиоз, клещевой вирусный энцефалит. Редко регистрируются иерсиниозы, лептоспирозы и лихорадка Западного Нила. Заболеваемость туляремией не отмечалась 20 лет. Период 2009–2013 гг. характеризовался снижением численности носителей и переносчиков, а также эпизоотической активности природных очагов, достигшим минимальных показателей в 2013 г. Наметившийся с 2014 г. рост численности носителей, а затем и переносчиков, может привести к подъему заболеваемости природно-очаговыми болезнями. На территории республики выделены участки территориальной совмещенности природных очагов болезней различной этиологии с высоким риском заражения населения. Перед проведением массовых мероприятий требуется усиление эпизоотологического надзора в природных очагах болезней, результаты которого ложатся в основу разработки комплекса профилактических мероприятий.

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, носители, переносчики, профилактика заболеваний.

Корреспондирующий автор: Князева Татьяна Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

T.V.Knyazeva¹, M.A.Patyashina², V.B.Ziatdinov³, M.V.Khakhimzyanova³, L.F.Sadreeva³, A.A.Gainullin³,
G.Sh.Saifullina³, Yu.N.Yantykova³, D.R.Gubaeva³, A.N.Matrosov¹, A.A.Kuznetsov¹, N.V.Popov¹

Current State of Natural Foci of Dangerous Infectious Diseases in the Territory of the Russian Federation

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; ²Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation; ³Rospotrebnadzor Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation

Objective of the study is to evaluate the current state of epizootic activity of natural zoonotic foci, as the basis for the development of prophylactic measures aimed at prevention of natural-focal infections during mass events. **Materials and methods.** Utilized have been reports from the Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, the data provided by Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan over the period of 2009–2014, and literature references. **Results and conclusions.** The most pressing natural-focal infectious diseases are hemorrhagic fever with renal syndrome, tick-borne borreliosis, and tick-borne viral encephalitis. Yersiniosis, leptospirosis, and West Nile fever are rarely registered. Tularemia infections have not been reported within the past 20 years. The period of 2009–2013 is characterized by the decrease in the numbers of carriers and vectors of the diseases, as well as epizootic activity of natural foci, which came up to minimum values in 2013. Emerged since 2014 increment in the abundance rates of the carriers and later the vectors can lead to the increase in the incidence of natural-focal diseases. In the territory of the Republic, allocated are the spatial combination areas of natural foci of the diseases of various etiology with high risk of population exposure. Previous to conduction of mass events it is necessary to enhance the epizootiological surveillance in the natural foci, the results of which lay premises for the development of complex prophylactic activities.

Key words: natural-focal infections, carriers, vectors, disease prevention.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Tatiana V. Knyazeva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Knyazeva T.V., Patyashina M.A., Ziatdinov V.B., Khakhimzyanova M.V., Sadreeva L.F., Gainullin A.A., Saifullina G.Sh., Yantykova Yu.N., Gubaeva D.R., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V. Current State of Natural Foci of Dangerous Infectious Diseases in the Territory of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:53–58. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-53-58

Заболеваемость инфекционными болезнями с природной очаговостью является актуальной для значительной части регионов Российской Федерации. Природные особенности территорий, характер антропогенного воздействия на них во многом определяют структуру эколого-фаунистических комплексов животных – носителей и переносчиков возбу-

лей зоонозов. Республика Татарстан расположена на Восточно-Европейской равнине в пределах Приволжской и Бугульминско-Белебеевской возвышенностей на границе лесной зоны и лесостепи [2, 3]. В зоогеографическом отношении территория подразделяется на три зоны. Предволжье представлено разнотравными степями и широколиственными лесами

на низкогорьях, лесное Заволжье (Предкамье) – луговыми степями и смешанными лесами Волго-Камского междуречья, лесостепное Заволжье (Закамье) – разнотравными степями и широколиственными водораздельными лесами. Площадь лесов под воздействием хозяйственной деятельности человека сократилась и в настоящее время занимает около 17 % территории. Республика богата водными ресурсами: общая протяженность рек составляет 19600 км, площадь водоемов – 3,5 тыс. кв. км (5,2 % территории). Климат умеренно-континентальный: годовая сумма температур – 2000–2250 °, количество осадков – 400–500 мм в год (в вегетационный период от 190 до 265 мм). В последние десятилетия наблюдается потепление климата. Природные условия региона являются благоприятными для циркуляции возбудителей известных инфекционных болезней, а также появления здесь новых нозологий. Комплексный эпизоотологический мониторинг опасных инфекционных болезней различной этиологии выступает одним из важных разделов эпидемиологического надзора на контролируемых территориях.

Целью данного исследования явилась оценка современного состояния активности природных очагов опасных инфекционных болезней на территории Республики Татарстан, необходимая для составления и обоснования прогнозов заболеваемости населения, планирования и проведения профилактики зоонозов.

Материалы и методы

В работе использованы данные эпизоотологических наблюдений в природных очагах инфекционных болезней, осуществляемых специалистами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», материалы Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан за 2009–2014 гг., литературные источники. В качестве основных задач ставились: ретроспективный анализ эпизоотологических и эпидемиологических данных; изучение глубины изменений природных условий и антропогенного воздействия, определяющих структуру животных комплексов носителей и переносчиков инфекционных болезней; дифференциация территории Республики Татарстан по уровню эпидемической опасности; повышение эффективности профилактики зоонозов.

За указанные годы выставлено более 33 тыс. ловушко-ночей, отловлено 3913 мелких млекопитающих. В природных биотопах собрано на флаг 2744 экз. иксодовых клещей. Сборы клещей с людей, обратившихся в лечебные учреждения, составили 25 тыс. экз. В природных и антропогенных биотопах отловлено 1126 экз. комаров. В целях выявления роли животных в циркуляции возбудителей различных зоонозов в лаборатории исследовано 1742 экз. мелких млекопитающих, 3316 экз. иксодовых клещей, 624 экз. комаров, 787 проб объектов внешней среды (вода, погадки, экскременты).

Результаты и обсуждение

В Республике Татарстан за 10 лет (2005–2014 гг.) заболеваемость природно-очаговыми болезнями – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), лептоспироз, иерсиниоз, бешенство, лихорадка Западного Нила (ЛЗН), дирофиляриоз – составила около 6 тыс. случаев. Ежегодный уровень общей заболеваемости опасными природно-очаговыми болезнями определяет ГЛПС, доля которой достигает 95 %. Иксодовый клещевой боррелиоз стабильно регистрируется с 2008 г. Максимальная заболеваемость за рассматриваемый период не превышала 63 случаев в год (2010 г.). Другие природно-очаговые болезни отмечаются в виде единичных случаев либо ежегодно, как КВЭ с 2008 г., либо периодически, как ЛЗН – в 2011–2012 гг., иерсиниоз – в 2005–2006 и 2013 гг., лептоспироз – в 2005, 2008 и 2010 гг., бешенство – в 2005 г. С 2011 г. выявляется дирофиляриоз. Туляремия на территории региона не регистрируется 20 лет. Среднегодовой показатель заболеваемости природно-очаговыми болезнями составляет 557 случаев (14,4 на 100 тыс. населения). За указанные годы превышение этого показателя в 2 раза наблюдалось в 2009 и 2014 гг., снижение заболеваемости до уровня в 2,5–3 раза меньше среднегодового значения отмечалось в 2005, 2007, 2013 гг.

По материалам эпизоотологического мониторинга (2009–2014 гг.) сообщество мелких млекопитающих – носителей возбудителей в природных очагах зоонозных инфекций составляли: рыжая полевка (*Citellionomys glareolus*) – средний индекс доминирования 66,7 %, малая лесная мышь (*Apodemus uralensis*) – 17,0, полевая мышь (*Apodemus agrarius*) – 3,7, желтогорлая мышь (*Apodemus flavicollis*) – 4,4, обыкновенная полевка (*Microtus arvalis*) – 4,3, бурозубки (*Sorex*) – 2,9. Отлавливались также домовая мышь (*Mus musculus*) и полевка-экономка (*Microtus oeconomus*). Виды характеризуются неравномерным пространственным распределением по типам биотопов и более высокой численностью в оптимальных местах обитания. Основу населения (около 95 %) в лесостепных станциях составляют рыжая полевка (66 %), малая лесная мышь (20 %), желтогорлая мышь (6 %) и бурозубки (3 %); в луго-полевых станциях – полевая мышь (49 %), обыкновенная полевка (43 %), рыжая полевка (3 %); в околородных – рыжая полевка (35 %), малая лесная мышь (20 %), полевая мышь (15 %) и бурозубки (14 %).

Энзоотичной по ГЛПС является вся территория Республики Татарстан. Природный очаг ГЛПС здесь, как и на всей европейской части страны, поддерживает рыжая полевка, встречающаяся повсеместно. В эпизоотический процесс вовлекаются и другие виды грызунов. По данным лабораторного исследования, за 2009–2014 гг. общая зараженность хантавирусом животных шести видов составила 8,1 % (исследова-

Таблица 1

Численность и результаты исследования мелких млекопитающих на хантавирусы на территории Республики Татарстан (2009–2014 гг.)

Сезон	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Средний многолетний показатель
Процент попадания мелких млекопитающих							
Весна	14,1	7,8	8,3	3,5	4,5	5,5	7,3
Осень	22,0	15,4	15,2	14,3	9,6	21,7	16,4
Процент положительных проб на ГЛПС							
Весна	13,5	4,7	5,7	8,9	2,1	6,3	6,9
Осень	10,3	9,9	14,8	7,9	5,6	8,2	9,5

но 1742 особи). Среди инфицированных грызунов преобладала рыжая полевка – 89,5 %; обыкновенная полевка – 3,5, малая лесная мышь – 2,8; полевка-экономка – 2,1; желтогорлая мышь – 1,4 и полевая мышь – 0,7.

Состояние популяций рыжей полевки – численность, характер пространственного распределения, зараженность вирусом ГЛПС выступает одним из факторов, определяющих уровень заболеваемости населения. За период наблюдений численность грызунов характеризуется невысокими показателями. Ее постепенный спад последовал после 2008 г. В этот год численность составляла весной 33,6, осенью – 30,0 % попадания в орудия лова. Снижение обусловлено постоянным воздействием в течение ряда лет на популяции носителей неблагоприятных абиотических и биотических условий: плохая кормовая база в летне-осенний период перед уходом мелких млекопитающих в зимовку (2009, 2010, 2011 гг.), неблагоприятные условия перезимовки, связанные с глубоким промерзанием почвы (2010, 2012, 2013 гг.), поздняя весна с возвратом холодов (2010, 2011 гг.), резкий подъем уровня паводковых вод (2012, 2013 гг.). Повышенная интенсивность размножения в поздне-весенний и летний периоды приводила лишь к некоторому увеличению численности зверьков к осени. В 2013 г. численность грызунов снизилась до минимальных показателей (табл. 1). Снижение численности в значительной степени произошло за счет рыжей полевки, в результате чего ее доля в отловах уменьшилась в 2 раза, составляя 26 % весной и 39 % осенью. На этом фоне инфицированность грызунов возбудителем ГЛПС в 2013 г. имела самые низкие показатели – 2,1 % весной, 5,6 – осенью при средних многолетних значениях 6,9 и 9,5 % соответственно. Такое состояние популяций носителей ГЛПС, в частности рыжей полевки, привело в 2013 г. к снижению заболеваемости населения, оказавшейся самой низкой за 10-летний период (интенсивный показатель 5,2). Следует отметить, что поддержанию численности грызунов на низком уровне в 2013 г. способствовало увеличение почти на 30 % объема дератизации в природных и антропогенных биотопах в местах высокого риска заражения населения и участников Универсиады-2013 в Казани [5]. В 2014 г. в связи с

благоприятными погодными условиями, хорошей кормовой базой произошло повышение интенсивности размножения грызунов. Так, у рыжей полевки и малой лесной мыши в размножении приняли участие все половозрелые самки, что привело к заметному росту численности популяций. При этом рыжая полевка в отловах составляла 92 %. Показатель инфицированности грызунов хантавирусом к осени уже приблизился к многолетней норме (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что в 2009 и 2014 гг. на фоне высокой численности и инфицированности хантавирусом мелких млекопитающих отмечались максимальные показатели заболеваемости ГЛПС за анализируемый период (30,64 и 32,94 на 100 тыс. населения соответственно), многолетние значения были превышены в 2 раза.

При повсеместном распространении ГЛПС на территории Татарстана следует отметить, что наиболее активные ее проявления привязаны к лесистым зонам Предкамья и Закамья, где в широколиственных лесах, как оптимальных местах обитания лесных видов грызунов, их численность является относительно стабильной [1]. По имеющимся материалам за период наблюдения показатель заболеваемости в Предволжье составил 6,03 на 100 тыс. населения; в Предкамье – 10,45 (с учетом Казани); в Закамье – 22,08 (с учетом Н. Челнов). При этом показатель заболеваемости в этих крупных городах мало различался – 8,39 и 10,03 на 100 тыс. населения соответственно.

В качестве компонентов биоценотической структуры природных очагов клещевых инфекций значатся иксодовые клещи – *Ixodes ricinus* (L), *I. persulcatus* (Schulze), *Dermacentor reticulatus* (Fabr.) – как хранители и переносчики возбудителей, а также млекопитающие – прокормители различных стадий развития этих членистоногих. Исторически сложившиеся ареалы иксодид под влиянием природных условий и антропогенных преобразований к настоящему времени претерпели значительные изменения. В 40-х годах XX столетия (по литературным данным) самостоятельные ареалы занимали *I. ricinus* и *I. persulcatus*. Первый – в Предволжье и южной части лесного Заволжья, второй занимал центральную и северо-восточную часть лесного Заволжья. Лесостепное Заволжье представляло совмещенные ареалы *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. Ареал клеща *D. reticulatus* за последующие 30 лет продвинулся на северо-восток республики – в ее лесную Заволжскую часть, в места распространения *I. persulcatus*. Находки *D. reticulatus* в границах ареала *I. ricinus* были очень редкими. В настоящее время ситуация меняется. Взаимное проникновение видов клещей в ареалы друг друга привело к тому, что каждый из 3 видов встречается во всех трех зонах республики, но их территориальное размещение неравномерное. Так, в лесостепном Заволжье плотность *I. ricinus* выше на юге и вдоль речной долины Камы. Клещи *D. reticulatus* и *I. persulcatus* в пределах ареала *I. ricinus* в Предволжье

встречаются редко (Тетюшский р-н). При схожести биологии представителей рода *Ixodes* их существование на одной территории обеспечивается предпочтением различных биотопов и, в некоторой степени, различием в сезонной динамике паразитирования имаго. У клещей *D. reticulatus* и *I. ricinus* сроки паразитирования имаго совпадают, но они несколько различаются у преимагинальных фаз. Больше всего несходство динамики паразитирования всех фаз развития наблюдается у *D. reticulatus* и *I. persulcatus*. Наряду с другими факторами это, видимо, сказывается на численности членистоногих в различных местах их совместного обитания. В последние годы отмечается рост обилия популяции *D. reticulatus*, одна из причин которого связана с хозяйственной деятельностью человека – расширением площадей увлажненных луговых и кустарниковых биотопов, пригодных для обитания данного вида. Если до 2010 г. прослеживалось доминирование на территории лесного Заволжья *I. ricinus*, лесостепного Заволжья – *I. persulcatus*, то в 2014 г. на всей территории преобладал вид *D. reticulatus*, составляя около 95 % в сборах.

В многолетнем аспекте наблюдается тенденция снижения общей численности клещей. Так, средний показатель обилия клещей на 1 флаго-километр (экз./фл.-км), вычисленный за пятилетние интервалы, составил за 1996–1999 гг. – 43,9, 2000–2004 гг. – 23,9, 2006–2009 гг. – 12,6, 2010–2014 гг. – 9,2. За период наблюдений минимальная численность клещей пришлось на 2013 г. (табл. 2). Помимо абиотических условий на состояние популяций клещей несомненное влияние оказала численность мелких млекопитающих-прокормителей, которая также снижалась. В то же время, как показывают наблюдения, с 2010 г. растет активность клещей, постоянно увеличивается число людей, пострадавших от нападения членистоногих – от 3300 в 2010 г. до 7200 в 2014 г. Исключение составил 2013 г., когда было отмечено 3200 нападений. В ряду общей закономерности следует учитывать увеличение продолжительности сезона паразитирования членистоногих в осенний период из-за теплой погоды и, в связи с этим же, увеличение продолжительности контакта человека с природой, а также рост численности *D. reticulatus*. Необходимо отметить, что в 2013 г. на снижение эпизоотического потенциала переносчиков (численность, возможность контакта с населением) несомненное влияние

оказали объемные акарицидные обработки лесных зон. На этом фоне существенно снизились показатели инфицированности клещей возбудителями клещевого энцефалита и боррелиоза (табл. 2).

Энзоотичной по ИКБ является вся территории Республики Татарстан. По результатам лабораторного исследования инфицированность иксодовых клещей боррелиями равнялась в среднем 16 %. Среди них *I. persulcatus* составляли 58 %, *I. ricinus* – 27 %, *D. reticulatus* – 15 %. Положительные находки за наблюдаемый период выявлены в лесном (5 районов и Казань) и в лесостепном (9 районов) Заволжье. На отдельных участках очаговой по ИКБ территории отмечается высокая зараженность иксодовых клещей, значительно превышающая фоновую, что создает повышенную угрозу заболеваемости населения. В 2012 г. при средней зараженности клещей 6,3 % в Тюлячинском районе она составляла 19,3 %, Нижнекамском – 24,0 %, в Казани – 10,8 %. На территории зеленой зоны Казани даже при низкой активности очагов клещевого боррелиоза (2013–2014 гг.) сохраняется циркуляция возбудителя в переносчиках.

Очаговыми по КВЭ в республике признаны 26 административных районов – 5 в лесном Заволжье и все районы лесостепного Заволжья, представляющие территории оптимального размещения клещей *I. persulcatus* и *D. reticulatus*. Доля зараженных иксодовых клещей возбудителем КВЭ низкая – в среднем 1,7 %. По данным за 2011–2014 гг. (исследовано 2096 экз.) из 9 положительных результатов 4 были от *I. persulcatus* (2011 г.) и 5 – от *D. reticulatus* (2013 г.). Заболеваемость населения колеблется от 1 до 4 случаев в год с учетом завозных (2010–2013 гг.). Показатель заболеваемости в 2014 г. составил 0,04 (3 случая).

Лихорадка Западного Нила на территории Татарстана отмечалась дважды – 4 случая в 2011 г. и 3 в 2012 г. Контроль, проводимый за инфицированностью переносчиков и возможных носителей вируса Западного Нила, не зарегистрировал циркуляцию возбудителя в природных биотопах. Вместе с тем считается, что биотические и абиотические условия для укоренения ЛЗН на территории Татарстана существуют [4]. Лимитирующим фактором при этой инфекции выступают температурные условия, влияющие на численность переносчиков и размножение возбудителя в их организме.

В природных биотопах постоянно проводится обследование на туляремию. Энзоотичная по этой инфекции территория (19 административных районов) была дифференцирована на 3 типа очагов: лесной, луго-полевой и пойменно-болотный. Долгое отсутствие проявлений этой инфекции, прежде всего, связано с хозяйственной деятельностью человека, повлиявшей на условия жизнедеятельности основного носителя – водяной полевки (*Arvicola terrestris*): создание водохранилищ и последовавшие резкие колебания уровня воды в них, и сказавшейся на функционировании очагов пойменно-болотного типа. В настоящее время эпизоотологическую опасность

Таблица 2

Численность и показатели инфицированности иксодовых клещей возбудителями КВЭ и ИКБ на территории Республики Татарстан (2009–2014 гг.)

Показатели	2009	2010	2011	2012	2013	2014	Средний многолетний
Численность экз. на 1 фл.-км	11,5	10,1	12,1	7,3	6,8	9,8	9,6
Инфицированность ИКБ, %	17,1	32,7	38,0	6,3	1,3	1,9	16,0
Инфицированность КВЭ, %	6,5	0,9	2,0	отр.	0,6	отр.	1,7



Территориальная приуроченность природных очагов опасных инфекционных болезней различной этиологии в Республике Татарстан:

1 – очаги ГЛПС, ИКБ; 2 – очаги ГЛПС, ИКБ, КВЭ; 3 – очаги ГЛПС, ИКБ, туляремии; 4 – очаги ГЛПС, ИКБ, КВЭ, туляремии

могут представлять пойменные долины множества рек, где в качестве компонентов биоценотической структуры при туляремии выступают обыкновенная полевка и клещ *D. reticulatus*. Не исключается поддержание очаговости туляремии рыжей полевкой и другими лесными грызунами, а также клещами родов *Dermacentor* и *Ixodes*. За рассматриваемый период антитела к возбудителю туляремии выявлены в 2014 г. у одной рыжей полевки, добытой в Высокогорском районе (луго-полевой тип), титр 1:20. Также получены положительные пробы при исследовании погадок хищных птиц (511 проб) в материале из Тетюшского (луго-полевой тип) и Чистопольского (пойменно-болотный) районов (2 в 2009 г., 3 в 2011 г.). Исследование 2110 экз. иксодовых клещей и 115 проб объектов внешней среды было отрицательным. В некоторых случаях наблюдается территориальное совмещение очагов туляремии и участков обнаружения лептоспироза. При ежегодном мониторинге положительный на лептоспироз результат был получен в 2014 г. в материале из органов обыкновенной полевки (Тетюшский район). На данный момент неблагополучными по лептоспирозу значатся три района Предволжья и один – лесного Заволжья.

На протяжении многих лет для Республики Татарстан одной из проблем является бешенство. Заболевания животных регистрируются на всей территории. Несмотря на то, что в 2014 г. по сравнению

с предшествующими годами число выявленных случаев бешенства оказалось минимальным – 76 (за счет снижения случаев среди сельскохозяйственных животных), число инфицированных диких животных, являющихся источником заражения, возросло до 72 %. Напряженность эпизоотологической обстановки в следующем сезоне сохранится.

Таким образом, наибольшую эпидемиологическую опасность для населения республики представляют сформировавшиеся на всей территории природные очаги ГЛПС, а также очаги ИКБ. Циркуляция возбудителей этих болезней в природных биотопах постоянно подтверждается данными лабораторного исследования носителей и переносчиков. Эпизоотологическое значение отдельных территорий еще более возрастает за счет других природно-очаговых инфекций, мозаично распространенных в регионе. Так, территория 26 районов является одновременно энзоотичной по ГЛПС, ИКБ и КВЭ. На территории 19 районов, помимо ГЛПС и ИКБ, были дифференцированы очаги туляремии. К территории 11 административных районов приурочены очаги всех четырех рассматриваемых заболеваний (рисунок).

В Республике Татарстан внимание в плане наиболее вероятного контакта с природой участников и гостей организуемых массовых мероприятий, прежде всего, заслуживает территория Казани и прилегающих административных районов

(Зеленодольский, Высокогорский, Лаишевский), а также Спасский район с центром «Болгар», которая является эпидемичной по ряду нозологий (рисунок) и активно посещается туристами. Так, на указанной территории практически ежегодно, за исключением Спасского района, регистрировалась заболеваемость ГЛПС. Среднегодовые показатели заболеваемости составили 8–10 на 100 тыс. населения, в Спасском районе – 3.

В преддверии проведения массовых мероприятий требуется усиление эпизоотологического надзора в природных очагах болезней, особенно в районах предполагаемой организации мероприятий и передвижения участников, разработка с учетом данных мониторинга рекомендаций по осуществлению комплекса неспецифической профилактики заболеваний зоонозами на участках высокого риска заражения.

Обоснованный прогноз эпизоотической активности природных очагов инфекционных болезней и предложенные меры неспецифической профилактики были успешно применены для обеспечения эпизоотологического благополучия населения, участников и гостей Универсиады-2013 в Казани и Чемпионата мира по водным видам спорта. Этот опыт следует использовать для профилактики природно-очаговых заболеваний при организации и проведении массовых мероприятий, каким в ближайшее время будет Чемпионат мира по футболу.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов А.Ф. Особенности многолетней динамики населения мелких млекопитающих лесных биотопов Верхнеуслонского района Республики Татарстан. Наземные экосистемы. *Известия Самарского научного центра РАН*. 2014; 16(5-1):510–13.
2. Кучерявенко Д.З. Эколого-экономическое районирование территории Республики Татарстан. Казань; 2006. 125 с.
3. Ермолаев О.П., Игонин М.Е., Бубнов А.Ю., Павлова С.В. Ландшафты Республики Татарстан. Региональный ландшафтно-экологический анализ. Казань: Слово; 2007. 411 с.
4. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Сафронов В.А.,

Карнауков И.Г., Попов Н.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Совершенствование профилактических мероприятий при подготовке и проведении Универсиады-2013 в Казани на основе комплексной оценки эпидемиологического риска по природно-очаговым инфекционным болезням. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:42–7.

5. Чекашов В.Н., Пяташина М.А., Яковлев С.А., Красовская Т.Ю., Шилов М.М., Захаров К.С., Шарова И.Н., Попов Н.В., Зиятдинов В.Б., Садреева Л.Ф., Гайнуллин А.А., Сайфуллина Г.Ш. Организация и проведение эпизоотологического обследования в условиях массовых мероприятий (на примере XXVII Всемирной летней универсиады 2013 г. в Казани). *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:37–40.

References

1. Bepalov A.F. [Peculiarities of long-term dynamics of small rodent population, habitat in the forest biotopes of Verkhneuslonsky Region of Tatarstan. Terrestrial ecosystems]. *Journal of the RAS Samara Scientific Center (Izvestiya Samarskogo Nauch. Tsentra)*. 2014; 16(5-1):510–13.
2. Kucheryavenko D.Z. [Ecological-Economic Zoning of the Territory of Tatarstan]. Kазan; 2006. 125 p.
3. Ermolaev O.P., Igonin M.E., Bubnov A.Yu., Pavlova S.V. [Landscapes of the Republic of Tatarstan. Regional Landscape-Ecological Analysis]. Kазan: "Slovo"; 2007. 411 p.
4. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Safronov V.A., Karnaukhov I.G., Popov N.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. [Improvement of the preventive measures for managing universiade-2013 held in Kазan, based on comprehensive evaluation of epidemiological risks as regards natural-focal infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:42–7.
5. Chekashov V.N., Pityashina M.A., Yakovlev S.A., Krasovskaya T.Yu., Shilov M.M., Zakharov K.S., Sharova I.N., Popov N.V., Ziatdinov V.B., Sadreeva L.F., Gainullin A.A., Saifullina G.Sh. [Management of epidemiological investigation in the context of mass event (by the example of the XXVII Worldwide Summer Universiade in Kазan, 2013)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:37–40.

Authors:

Knyazeva T.V., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Pityashina M.A. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan. 30, B. Krasnaya St., Kазan, 420111, Russian Federation. E-mail: org@16.rospotrebnadzor.ru.

Ziatdinov V.B., Khakimzyanova M.V., Sadreeva L.F., Gainullin A.A., Saifullina G.Sh., Yantykova Yu.N., Gubaeva D.R. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan. 13a, Sechenova St., Kазan, 420061, Russian Federation. E-mail: fguz@16.rospotrebnadzor.ru.

Об авторах:

Князева Т.В., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Пяташина М.А. Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан. Российская Федерация, 420111, Казань, ул. Б. Красная, 30. E-mail: org@16.rospotrebnadzor.ru.

Зиятдинов В.Б., Хакимзянова М.В., Садреева Л.Ф., Гайнуллин А.А., Сайфуллина Г.Ш., Янтыкова Ю.Н., Губаева Д.Р. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан. Российская Федерация, 420061, Казань, ул. Сеченова 13а. E-mail: fguz@16.rospotrebnadzor.ru.

Поступила 19.05.15.

А.Н.Полухина¹, В.П.Попов², Д.С.Орлов³, Е.В.Царук¹, О.А.Гильденскиольд¹, Н.В.Попов⁴**ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЙОНОВ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ФБУЗ «ЦГиЭ в Московской области», Мытищи, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация; ³Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация; ⁴ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Целью настоящей работы является дифференциация энзоотичных по туляремии территорий Московской области по степени потенциальной эпидемической опасности с применением ГИС-технологий. **Материалы и методы.** Для ГИС-анализа использованы архивные данные ФБУЗ «ЦГиЭ в Московской области» и ФКУЗ «Противочумный центр» за период 1942–2014 гг., литературные данные, авторские данные. При помощи ГИС-пакета MapInfo Professional 10.5 построены 2 карты, отражающие особенности распространения туляремии на территории Московской области. **Результаты и обсуждение.** В результате ГИС-анализа ландшафтной приуроченности участков стойкого проявления туляремии в 1942–2014 гг. установлено, что районы с наибольшей кратностью (10 и более лет) ее проявления расположены в интервале высот от 100 до 150 м н.у.м. на территории Верхневолжской и Мещерской низменностей, Москворецко-Окской равнины, Заокского эрозионного плато, юго-западной части Смоленско-Московской возвышенности. Выполнена дифференциация энзоотичных по туляремии территорий Московской области по степени потенциальной эпидемической опасности. Полученные результаты послужат основой для усовершенствования тактики эпизоотологического мониторинга природных очагов туляремии и планирования объемов профилактических мероприятий.

Ключевые слова. Природные очаги туляремии, эпидемиологическая дифференциация территории, степень потенциальной эпидемической опасности, ландшафтная приуроченность стойких проявлений туляремии, ГИС-технологии.

Корреспондирующий автор: Полухина Анастасия Николаевна, e-mail: centr@cgemmo.ru.

A.N.Polukhina¹, V.P.Popov², D.S.Orlov³, E.V.Tsaruk¹, O.A.Gil'denskiol'd¹, N.V.Popov⁴**Application of GIS-Technologies for Identifying the Areas with Different Degree of Potential Hazard in Natural Tularemia Foci of the Moscow Region**¹Center of Hygiene and Epidemiology in the Moscow Region, Mytishchi, Russian Federation; ²Plague Control Center, Moscow, Russian Federation; ³M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; ⁴Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to differentiate enzootic, as regards tularemia, territories of the Moscow Region according to the degree of potential epidemic hazard, applying GIS-technologies. **Materials and methods.** Utilized have been archival records, held by the Center of Hygiene and Epidemiology in the Moscow Region and Plague Control Center, Moscow over the period of 1942–2014, literature and author's data. Constructed have been two maps, displaying the peculiarities of tularemia dissemination in the territory of the Moscow Region, deploying GIS software kit – MapInfo Professional, 10.5. **Results and discussion.** GIS-analysis of the landscape confinement of the areas with sustained tularemia manifestations during 1942–2014 has revealed that regions of the longest persistence (10 years and more) are situated within the altitudes interval of 100–150 m A.S.L. in the territory of Upper-Volga and Meshcherskaya lowlands, Moskvoretsko-Okskaya valley, Zaokskoe erosional plateau, south-western part of Smolensk-Moscow highlands. Carried out is differentiation of enzootic as regards tularemia territories in the Moscow Region according to the degree of potential epidemic hazard. The results obtained will serve as the basis for the enhancement of the strategies for epizootiological monitoring over natural tularemia foci and for effective planning of prophylactic activities.

Key words: natural tularemia foci, epidemiological differentiation of the territory, degree of potential epidemic hazard, landscape confinement of sustained tularemia manifestations, GIS-technologies.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anastasia N. Polukhina, e-mail: centr@cgemmo.ru.

Citation: Polukhina A.N., Popov V.P., Orlov D.S., Tsaruk E.V., Gil'denskiol'd O.A., Popov N.V. Application of GIS-Technologies for Identifying the Areas with Different Degree of Potential Hazard in Natural Tularemia Foci of the Moscow Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:59–64. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-59-64

В XX столетии накоплен большой фактический материал, характеризующий биоценотическую структуру и пространственно-временные особенности эпизоотической активности природных очагов туляремии на территории Московской области [2, 5, 6]. Однако в последние 2–3 десятилетия под

влиянием антропогенных и климатических факторов условия циркуляции возбудителя туляремии на территории Московской области, равно как и в других регионах России, значительно изменились [4, 8]. В частности, вследствие неблагоприятного влияния современного потепления климата эпизоотическая

активность природных очагов туляремии во многих регионах Российской Федерации значительно снизилась [7, 12]. Однако в 2005 г. в природных очагах туляремии Московской области имело место резкое обострение эпидемической обстановки [3]. В 2006–2014 гг. здесь также неоднократно регистрировали циркуляцию возбудителя туляремии на локальных участках, а также единичные случаи заражения [7]. В настоящее время для обеспечения эпидемиологического благополучия по туляремии в Московской области наибольший практический интерес представляет выявление участков высокого риска заражения как основы для планирования и упреждающего проведения профилактических мероприятий [9, 10]. Целью настоящей работы является дифференциация энзоотичных по туляремии территорий Московской области по степени потенциальной эпидемической опасности с применением ГИС-технологий.

Материалы и методы

Для ГИС-анализа использованы архивные данные ФБУЗ «ЦГиЭ в Московской области» Роспотребнадзора и ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора эпизоотологического (1965–2014 гг.) и эпидемиологического мониторинга (1942–2010 гг.) энзоотичных по туляремии территорий Московской области, литературные данные. В программе Microsoft Excel созданы таблицы с данными по участкам выделения возбудителя туляремии (всего 98) и по населенным пунктам, где были зарегистрированы больные жители (всего 654). Посредством Google Earth были определены географические координаты базовых точек (населенные пункты). При помощи ГИС-пакета MapInfo Professional 10.5 создана база данных, на основе которой были получены слои ГИС по местам заражения людей и выделению культур возбудителя туляремии. Далее были построены 2 карты, отражающие особенности распространения туляремии на территории Московской области: «Приуроченность эпизоотических и эпидемических проявлений туляремии к физико-географическим провинциям Московской области в 1942–2014 гг.» и «Потенциальная эпидемическая опасность природных очагов туляремии Московской области».

Результаты и обсуждение

В результате выполненного анализа в границах Московской области [1] выделено 39 природных очагов туляремии двух основных типов: пойменно-болотный (11 очагов) и луго-полевой (28 очагов). Природные очаги пойменно-болотного типа занимают более 30 % территории Московской области и широко распространены на территориях Волоколамского, Дмитровского, Егорьевского, Красногорского, Мытищинского, Одинцовского, Орехово-Зуевского, Сергиево-Посадского, Павлово-Посадского, Талдомского и Шатурского админи-

стративных районов. Для остальной территории Московской области (около 70 %) характерно наличие природных очагов туляремии луго-полевого типа. Также отмечено, что в настоящее время основным носителем инфекции на территории Московской области повсеместно является обыкновенная полевка, второстепенными – водяная полевка, мышь-малютка и обыкновенная бурозубка, а основным хранителем – клещи *Dermacentor reticulatus*, второстепенными *Ixodes ricinus* и *I. trianguliceps*. Следует отметить, что популяции водяной полевки, выполняющей в прошлом роль основного носителя туляремии в очагах пойменно-болотного типа в Московской области, как и в других регионах России, продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии [11].

По кратности эпидемических проявлений туляремии территории природных очагов пойменно-болотного типа условно подразделены на 3 группы районов: первая – 10–13 лет (Дмитровский, Орехово-Зуевский, Талдомский и Шатурский); вторая – 6–8 лет (Егорьевский, Одинцовский, Волоколамский и Сергиево-Посадский); третья – 2–3 года (Мытищинский, Красногорский и Павлово-Посадский). В 1942–2010 гг. в их границах выявлено 250 населенных пунктов, где были зарегистрированы случаи заражения туляремией, то есть в 38,2 % от всех населенных пунктов Московской области, в которых имели место заболевания этой инфекцией. Кроме того, в 1965–2014 гг. в природных очагах пойменно-болотного типа изолировано 15 культур возбудителя туляремии (по 1–3 культуры в каждом районе).

По кратности эпидемических проявлений туляремии территории природных очагов луго-полевого типа также условно подразделена на 3 группы районов: первая – 10–14 лет (Воскресенский, Раменский, Солнечногорский, Ступинский и Ленинский); вторая – 5–9 лет (Домодедовский, Зарайский, Истринский, Каширский, Луховицкий, Можайский, Наро-Фоминский, Подольский, Рузский, Серпуховской, Серебряно-Прудский, Клинский и Лотошинский); третья – 0–4 года (Ногинский, Озерский, Пушкинский, Химкинский, Щелковский, Шаховской, Коломенский, Люберецкий, Чеховский и Балашихинский). В 1965–2014 гг. здесь изолировано из различных объектов внешней среды 211 культур возбудителя туляремии.

Всего в 1965–2014 гг. в природных очагах туляремии на территории 33 административных районов изолировано 226 культур возбудителя туляремии, в том числе от мелких млекопитающих – 97 (42,9 %), от иксодовых клещей – 98 (43,9 %), из воды – 20 (8,8 %), из других объектов внешней среды – 11 (4,9 %). В 6 районах Московской области (Балашихинский, Егорьевский, Клинский, Красногорский, Серебряно-Прудский и Озерский) культуры не выделены.

Подчеркнем, что наиболее высокая эпизоотическая активность природных очагов туляремии на территории Московской области имела место в 1965–1993 гг. (выделено 211 культур). Причем 103

культуры выделены в период 1983–1993 гг., в том числе от грызунов – 28, от иксодовых клещей – 52, из воды – 14 и подснежных гнезд – 9. В 1994–2014 гг. на фоне значительного спада эпизоотического потенциала природных очагов выделено всего 15 культур возбудителя туляремии, в том числе от обыкновенной полевки – 3, от полевой мыши – 1, от иксодовых клещей (*Dermacentor reticulatus* и *Ixodes ricinus*) – 2, из субстрата гнезд грызунов – 3, из воды – 6.

Выполненный анализ пространственного распределения проявлений туляремии на территории Московской области с применением ГИС-технологий показал, что наиболее стойкий ее характер (выделение культур, случаи заражения людей) отмечен в границах Верхневолжской и Мещерской низменностей, Москворецко-Окской равнины и Заокского плато (рис. 1).

Особо подчеркнем, что на территории Московской области выявлено 42 населенных пункта, где в многолетнем аспекте неоднократно имели место как случаи заражения, так и выделения культур возбудителя туляремии. Такие участки, характеризующиеся высоким риском заражения, выявлены в границах как природных очагов пойменно-болотного, так и луго-полевого типов на территории 21 административного района Московской области. В 1965–2014 гг. здесь выявлено 82 культуры возбудителя туляремии, в том числе от различных видов мелких млекопитающих – 50, из водных источников – 12,

от иксодовых клещей – 14, из подснежных гнезд – 6. Особо подчеркнем, что выделение культуры возбудителя туляремии из воды в 2013 г. в Волоколамском районе (г. Ярополец) имело место после 70-летнего перерыва (в 1943 г. в 5 селах из окрестностей Яропольца зарегистрирована эпидемическая вспышка туляремии). Это, косвенно, подтверждает наличие в области участков стойкого проявления инфекции [7]. Именно к таким местам как в прошлом столетии, так и в современный период приурочены эпидемически активные природные очаги пойменно-болотного и луго-полевого типов. Последнее подтверждают положительные результаты иммунологических исследований 3492 погадок хищных птиц, собранных в 2003–2013 гг. на территории 21 административного района Московской области. Причем количество положительных проб в отдельные годы составляло от 12 (2007 г.) до 70 % (2013 г.). Более того, в 2013 г. в Волоколамском и Воскресенском районах получены положительные результаты на наличие ДНК возбудителя туляремии методом ПЦР от рыжей полевки и обыкновенной бурозубки [2].

Учитывая высокую вероятность новой активизации природных очагов туляремии, в первую очередь, на участках стойкого ее проявления, выполнен анализ приуроченности находок зараженных животных и объектов внешней среды к различным физико-географическим зонам и административным районам Московской области. Также определена крат-

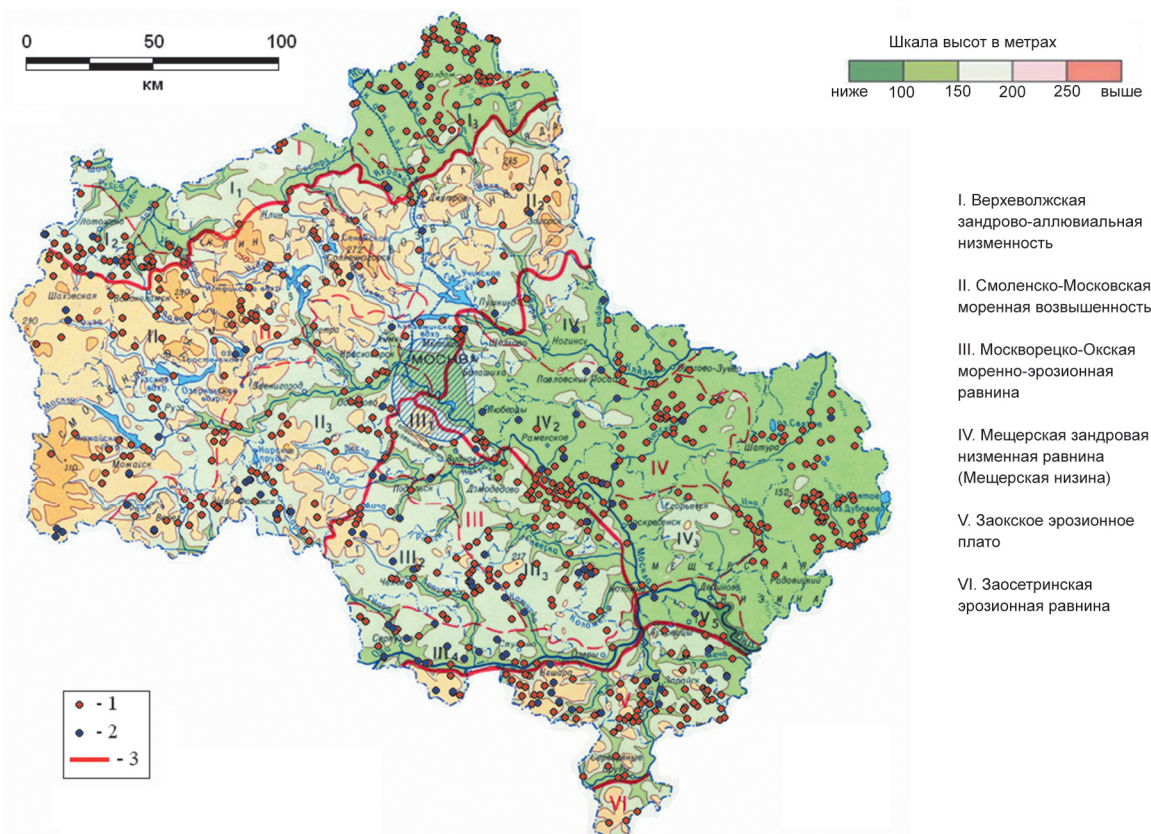


Рис. 1. Приуроченность эпизоотических и эпидемических проявлений туляремии к физико-географическим провинциям Московской области в 1942–2014 гг.:

1 – места заражения людей туляремией; 2 – места выделения культур возбудителя туляремии; 3 – границы физико-географических провинций

ность выделения культур возбудителя в 1965–2014 г. и регистрации случаев заражения в 1942–2010 гг. по административным районам Московской области. В результате установлено, что в 1965–2014 гг. культуры возбудителя туляремии выделены от различных систематических групп животных и объектов внешней среды в 33 административных районах лесной зоны. В лесостепной зоне (Заостринская эрозионная равнина) положительных результатов при исследовании проб полевого материала не получено. При этом наибольшая кратность (10 и более лет) выделения культур возбудителя туляремии от животных и объектов внешней среды зарегистрирована на территории Верейской-Звенигородской наклонной равнины (районы Нарофоминский, Можайский). Высокая кратность (5–8 лет) выделения культур возбудителя туляремии установлена для территорий на Москворецко-Окской равнине (Серпуховский, Ступинский, Подольский, Коломенский и Чеховский районы). Более низкие значения кратности проявления туляремии (3–4 года) характерны для территорий Заокского плато (Каширский, Зарайский районы) и Мещерской низменности (Воскресенский и др.). Для территорий Верхневолжской низменности, северо-западной части Смоленско-Московской возвышенности и Заостринской равнины кратность выделения культур туляремии в 1964–2014 гг. не превышала 1–2 года. Соответственно выполнен анализ распределения случаев заражения туляремией по

административным районам Московской области в 1942–2010 гг. В этот период спорадические случаи заболевания отмечены в 654 населенных пунктах. При этом наибольшая кратность (5 и более лет) регистрации больных туляремией, равно как и количества населенных пунктов, где в 1942–2010 гг. имели место заражения людей, зарегистрирована в границах Верхневолжской низменности (Талдомский район) и смежных территориях северо-западной части Смоленско-Московской возвышенности (Лотошинский, Шаховский, Волоколамский районы), на территории Москворецко-Окской равнины (Серпуховский, Раменский, Ленинский), Мещерской низменности (Шатурский, Орехово-Зуевский, Раменский), Верейской-Звенигородской наклонной равнины (Нарофоминский), Заокского эрозионного плато (Каширский, Зарайский).

На основании результатов анализа пространственных особенностей эпизоотических и эпидемических проявлений туляремии в 1942–2014 гг. проведено эпидемиологическое районирование Московской области по степени потенциальной эпидемической опасности (высокая, средняя, низкая) энзоотичных территорий (рис. 2).

К территории с высокой степенью потенциальной эпидемической опасности отнесена группа из 11 районов (Воскресенский, Зарайский, Каширский, Можайский, Наро-Фоминский, Орехово-Зуевский, Раменский, Серпуховский, Ступинский, Талдомский,

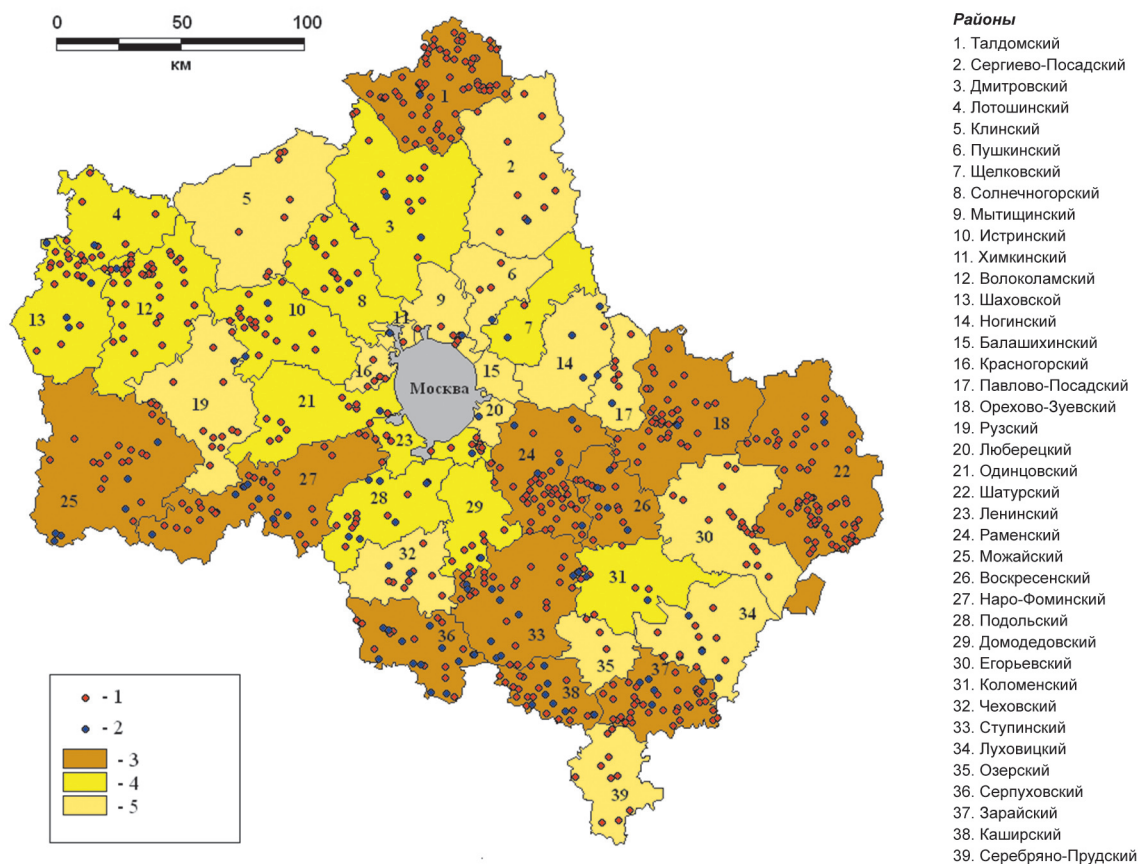


Рис. 2. Потенциальная эпидемическая опасность природных очагов туляремии Московской области:

1 – места заражения людей туляремией; 2 – места выделения культур возбудителя туляремии; 3 – районы с высокой эпидемической опасностью; 4 – районы со средней эпидемической опасностью

Шатурский) с кратностью проявления туляремии (выделение культур, случаи заражения) 0,5–0,7 за 72 года наблюдений. В 1942–2014 гг. периодически регистрировали обострения эпизоотической и эпидемиологической обстановки, причем отмечен многократный характер проявлений туляремии в одних и тех же местах. Общая площадь территории с высокой потенциальной эпидемической опасностью составляет 16 тыс. 629 кв. км. В 1965–2008 гг. выделено 165 культур возбудителя туляремии и зарегистрировано 394 населенных пункта, где имели место случаи заражения. Регистрация зараженных животных и объектов внешней среды отмечена в 1965–1969, 1973–1981, 1983–1988, 1993, 1997, 2002, 2006, 2008, 2013 гг. Случаи заражения зарегистрированы в 1942–1951, 1955, 1957, 1959, 1960, 1974, 1976, 1978, 1980–1986, 1988, 1990, 1992, 1995 и 2005 гг. С нашей точки зрения, стойкий характер энзоотии обусловлен наличием здесь многочисленных микроочагов, обеспечивающих длительное сохранение возбудителя туляремии во внешней среде и периодические его экспансии на смежные участки в годы активизации эпизоотического процесса. Энзоотии зарегистрированы в течение 28 лет, случаи заражения – 29 лет.

К территориям со средней степенью потенциальной эпидемической опасности отнесены 11 районов (Волоколамский, Дмитровский, Домодедовский, Солнечногорский, Истринский, Одинцовский, Ленинский, Лотошинский, Коломенский, Подольский, Шаховской) с кратностью проявления туляремии (выделение культур, случаи заражения) 0,3–0,4. Рассматриваемая территория фактически граничит с участками высокого риска заражения и, вероятно, является зоной выноса туляремийной инфекции в годы активизации эпизоотического процесса на участках стойкого ее сохранения. В 1967–2014 г. выделено 33 культуры возбудителя туляремии и зарегистрировано 158 населенных пунктов, где имели место случаи заражения. Регистрация зараженных животных и объектов внешней среды отмечена в 1967, 1968, 1975, 1977, 1978, 1981, 1984, 1986–1989, 1991, 1999, 2013 гг. Случаи заражения имели место в 1942–1954, 1956, 1957, 1963, 1965, 1967, 1976–1980, 1985, 1988, 1990, 1995, 2005 гг. Общая площадь территории со средней степенью высокой потенциальной эпидемической опасности составляет 12165 тыс. кв. км. Энзоотии зарегистрированы в течение 14 лет, случаи заражения – 28 лет.

К территориям с низкой степенью потенциальной эпидемической опасности отнесены 17 районов (Клинский, Сергиево-Посадский, Мытищинский, Пушкинский, Щелковский, Красногорский, Люблинский, Рузский, Балашихинский, Ногинский, Егорьевский, Озерский, Луховицкий, Серебряно-Прудский, Химкинский, Павлово-Посадский, Чеховский) с кратностью проявления туляремии (выделение культур, случаи заражения) 0,0–0,2. В ряде районов (Егорьевский, Озерский, Серебряно-Прудский, Клинский, Красногорский, Балашихинский) в 1965–

2013 гг. не выделяли культуры возбудителя туляремии из животных и объектов внешней среды, но имели место случаи заражения людей. В 1965–2004 гг. выделено 28 культур и зарегистрировано 103 населенных пункта, где имели место случаи заражения. Регистрация зараженных животных и объектов внешней среды отмечена в 1964, 1975, 1976, 1977, 1979–1981, 1986, 1988, 1989, 1993, 1997, 2000 гг. Случаи заражения имели место в 1942–1946, 1948–1950, 1952, 1953, 1957, 1964, 1976–1978, 1981–1984, 1988, 1993, 1997, 2000, 2001, 2005 гг. Общая площадь территории с низкой степенью потенциальной эпидемической опасности составляет 18206 тыс. кв. км. Энзоотии зарегистрированы в течение 26 лет, случаи заражения – 26 лет.

В результате анализа ландшафтной приуроченности участков стойкого проявления туляремии в 1942–2014 гг. установлено, что районы с наибольшей кратностью (более 5–10 лет) ее проявления (выделение культур, регистрации заражений) расположены в интервале высот от 100 до 150 м (Верхневолжская, Мещерская низменности, Москворецко-Окская равнина, Заокское эрозионное плато, пологая юго-западная часть Смоленско-Московской возвышенности). В северо-западной и центральной частях Смоленско-Московской возвышенности и центральной части Москворецко-Окской равнины, где высота рельефа достигает 150–300 м, кратность регистрации циркуляции возбудителя туляремии не превышает 1–2 лет. При этом установлено, что наиболее часто проявления туляремии регистрируют в долинах больших и малых рек, заболоченных участках на подзолистых, болотно-подзолистых, дерново-слабоподзолистых и дерново-среднеподзолистых почвах. Относительный показатель увлажненности почвы колеблется от 1,3–1,5 и выше 1,7. Такие участки характеризуются также относительно высоким уровнем грунтовых вод. Можно полагать, что этот комплекс условий способствует длительному сохранению возбудителя туляремии в почвенной биоте, в том числе в ассоциации с амебами рода *Acanthamoeba* [13, 14]. Для подтверждения участия амёб *Acanthamoeba sp.* в сохранении *Francisella tularensis* в микроочагах на территории Московской области необходимо проведение специальных исследований. Также отметим, что использование ГИС-технологий позволило провести эпидемиологическую дифференциацию энзоотичных по туляремии территорий Московской области, выявить районы, характеризующиеся разной (высокая, средняя и низкая) степенью потенциальной эпидемической опасности. Полученные результаты послужат основой для усовершенствования тактики эпизоотологического мониторинга природных очагов туляремии Московской области, планирования объемов профилактических мероприятий.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас Московской области. М.: ГУГК, 1976. 38 с.
 2. Демидова Т.Н., Попов В.П., Полухина А.Н., Орлов Д.С., Мешчерякова И.С., Михайлова Т.В. Эпизоотические и эпидемические проявления природных очагов туляремии на территории Московской области (1965–2013 гг.). *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; 2:24–31.
 3. Малхазова С.М., Семенов В.Ю., Шартова Н.В., Гуров А.Н. Здоровье населения Московской области: медико-географические аспекты. М.: Геос; 2010. 164 с.
 4. Медико-географический атлас России. Природно-очаговые болезни. М.; 2015. 208 с.
 5. Мешчерякова И.С. Туляремия. В кн.: Природная очаговость болезней: исследования института Гамалеи РАМН. М.: Русаки; 2003. С.137–160.
 6. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. М.: Медицина; 1970. 270 с.
 7. Полухина А.Н., Попов В.П. Обзор эпизоотической активности природных очагов туляремии Московской области. *Национальные приоритеты России.* 2014; 3:75–8.
 8. Попов В.П., Орлов Д.С., Безмертны В.Е. Эпизоотическая и эпидемиологическая обстановка в природных очагах туляремии на территории Центрального федерального округа Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4:10–4.
 9. Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Актуальные вопросы геоинформационного обеспечения мониторинга и прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы и других зоонозных инфекций на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):28–30.
 10. Попов Н.В., Топорков В.П., Сафронов В.А., Кузнецов А.А., Рябов С.В., Санджиев Д.Н. Современные направления снижения уровня заболеваемости природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол. Акту. вopr.* 2013; 5:15–7.
 11. Транквиловский Д.В., Борисов С.А., Киселева Е.Ю., Матросов А.Н., Удовиков А.И., Захаров К.С., Сурков А.В., Кутузов А.В., Жуков В.И., Корсаков М.Н., Бережная Т.В., Бережной А.В., Трегубов О.В., Шефтель Б.И. Результаты наблюдений за водяной полевкой (*Arvicola amphibious* Linnaeus, 1758) на территории Российской Федерации в 2011–2014 гг. по данным учреждений Роспотребнадзора. *Пест-менеджмент.* 2014; 4:14–26.
 12. Транквиловский Д.В., Удовиков А.И., Попов В.П., Захаров К.С., Попов Н.В., Безмертны В.Е. Состояние численности грызунов и эпидемиологическая обстановка по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:30–5.
 13. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.
 14. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.
- References**
1. [Atlas of the Moscow Region]. M.; 1976. 38 p.
 2. Demidova T.N., Popov V.P., Polukhina A.N., Orlov D.S., Meshcheryakova I.S., Mikhailova T.V. [Epizootic and epidemic manifestations of natural tularemia foci in the territory of the Moscow Region (1965–2013)]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2015; 2:24–31.
 3. Malkhazova S.M., Semenov V.Yu., Shartova N.V., Gurov A.N. [Health of the Moscow Region Population: Medical-Geographical Aspects]. M.: Geos; 2010. 164 p.
 4. [Medical-Geographical Atlas of Russia. Natural Focal Diseases]. M.; 2015. 208 p.
 5. Meshcheryakova I.S. [Tularemia]. In: [Natural Focality of Diseases: Studies of N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, RAMS]. M.: Rusaki; 2003. P. 137–60.
 6. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. [Natural Focality, Epidemiology, and Prophylaxis of Tularemia]. M.: Meditsina; 1970. 270 p.
 7. Polukhina A.N., Popov V.P. [Review of epizootic activity in natural tularemia foci of the Moscow Region]. *Natsional. Prioritety Rossii.* 2014; 3:75–8.
 8. Popov V.P., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. [Epizootic and epidemiological situation in natural tularemia foci in the territory of Central Federal District of the Russian Federation from 1992 to 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4:10–4.
 9. Popov N.V., Kouklev E.V., Kutyrev V.V. [Actual issues of geo-informational support to provide for monitoring and prognostication of epizootic activity in natural foci of plague and other zoonotic infections in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2:28–30.
 10. Popov N.V., Toporkov V.P., Safronov V.A., Kuznetsov A.A., Ryabov S.V., Sandzhiev D.N. [Current trends in the decrement of morbidity rates as regards natural focal infectious diseases in the territory of the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol. Aktual. Vopr.* 2013; 5:15–7.
 11. Trankvilevsky D.V., Borisov S.A., Kiseleva E.Yu., Matrosov A.N., Udovikov A.I., Zakharov K.S., Surkov A.V., Kutuzov A.V., Zhukov V.I., Korsak M.N., Berezhnaya T.V., Berezhnoy A.V., Tregubov O.V., Sheftel' B.I. [Results of survey over the water vole (*Arvicola amphibious* Linnaeus, 1758) in the territory of the Russian Federation in 2011–2014, according to the data from the Rosпотребнадзор Institutions]. *Pest-Management.* 2014; 4:14–26.
 12. Trankvilevsky D.V., Udovikov A.I., Popov V.P., Zakharov K.S., Popov N.V., Bezsmertny V.E. [Situation on rodents abundance and epidemiological situation on tularemia in the territory of the Russian Federation in the second half of 2014, and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:30–5.
 13. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.
 14. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.
- Об авторах:**
- Полухина А.Н., Царук Е.В., Гильденскиольд О.А. ЦГиЭ в Московской области. Российская Федерация, 141014, Московская обл., Мытищи, ул. Семашко, д. 2. E-mail: centr@cgeto.ru.
- Попов В.П. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.
- Орлов Д.С. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, 1. E-mail: orlovds@list.ru.
- Попов Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
- Поступила 30.11.15.

Н.В.Богачева, Г.Д.Елагин, Д.В.Печенкин, А.А.Кытманов, О.В.Тихвинская, А.В.Ерёмкин

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* СЕРОГРУППЫ I

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны РФ, Киров, Российская Федерация

Цель. Разработать иммунохроматографическую моноклональную тест-систему для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I. **Материалы и методы.** В качестве специфических компонентов для разработки иммунохроматографической тест-системы были использованы мышинные моноклональные антитела гибридных клеточных линий, полученные на липолисахаридный антиген наружной мембраны «холодового» варианта псевдотуберкулезного микроба I серотипа (YP-101H2B4, YP-105C5A10); кроличьи антивидовые антитела против иммуноглобулинов мыши. Для получения конъюгата коллоидного золота с антителами (КЗ-АТ) были использованы частицы диаметром (30 ± 2) нм. Для конъюгирования с коллоидным золотом использовали концентрацию антител, на 10–15 % превышающую точку выхода D580 на плато. Для изготовления иммунохроматографической тест-системы применяли комплект мембран фирмы MDI Easypack («Advanced Microdevice», Индия). Готовый конъюгат наносили на мембрану методом пропитывания. Антитела в аналитическую и контрольную мембраны в выбранной концентрации наносили с помощью диспенсора. Подложку с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакуумном сухожаровом шкафу. Собранные иммунохроматографические тест-системы нарезали по 4,5 мм и тестировали на специфичность и чувствительность. **Результаты и выводы.** Разработана иммунохроматографическая тест-система, в которой использовали моноклональные антитела гибридной клеточной линии YP-105C5A10 в конъюгате с коллоидным золотом и моноклональные антитела гибридной клеточной линии YP-101H2B4 в тестовой линии. Тест-система обеспечивает выявление штаммов *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I в концентрации от 500 тыс. м.к. · см⁻³ (при тестировании 8 штаммов из 11 исследованных) до 4 млн м.к. · см⁻³ и не выявляет при исследовании близкородственные иерсинии и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 100 млн м.к. · см⁻³.

Ключевые слова: возбудитель псевдотуберкулеза серогруппы I, моноклональные антитела, иммунохроматографическая тест-система.

Корреспондирующий автор: Богачева Наталья Викторовна, e-mail: bogacheva70@mail.ru.

N.V.Bogacheva, G.D.Elagin, D.V.Pechenkin, A.A.Kytmanov, O.V.Tikhvinskaya, A.V.Eremkin

Development of Immune-Chromatographic Monoclonal Test-System for the Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, Serogroup I

Affiliated Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Objective of the study was to develop monoclonal immunoassay for the detection of the pseudotuberculosis agent, serogroup I. **Materials and methods.** Specific components, that were used for immune-chromatographic test-system development were mouse monoclonal antibodies of hybrid cell lines, obtained to lipopolysaccharide antigen of the outer membrane of the pathogen's «cold» variant (YP-101H2B4, YP-105C5A10); and rabbit anti-species antibodies against murine immunoglobulins. Particles, (30 ± 2) nm in the diameter, were used to prepare colloidal gold-antibody conjugate. Antibody concentration for conjugation was 10–15 % greater than the D580 exit point on the plateau. For the production of immune-chromatographic test-system a set of membranes – MDI Easypack – manufactured by «Advanced Microdevice», India was deployed. Finished conjugate was applied onto the membrane by means of impregnation. Antibodies in the selected quantities were applied onto the analytical and control membranes via Dispensers. Substrates coated with the conjugate and ready-made working membranes were vacuum dried in a heat cabinet. Assembled immune-chromatographic test-systems were cut off 4.5 mm each and tested for specificity and sensitivity. **Results and conclusions.** Developed has been immune-chromatographic test-system for the detection of pseudotuberculosis pathogen, serogroup I. Utilized have been monoclonal antibodies of the hybrid cell line YP-105C5A10 in colloidal gold conjugate and monoclonal antibodies of the hybrid cell line YP-101H2B4 in the test line. The test-system allows for the detection of *Y. pseudotuberculosis* strains, serogroup I, at concentrations varying from 500 ths. m.c. · cm⁻³ (8 of the 11 strains under study) up to 4 million m.c. · cm⁻³ and does not identify closely related *Yersinia* and heterologous microorganisms in quantities of 100 million m.c. · cm⁻³.

Key words: pseudotuberculosis agent, serogroup I; monoclonal antibodies, immune-chromatographic test-system.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Natalia V. Bogacheva, e-mail: bogacheva70@mail.ru.

Citation: Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Eremkin A.V. Development of Immune-Chromatographic Monoclonal Test-System for the Detection of *Yersinia pseudotuberculosis*, Serogroup I. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:65–68. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-65-68

Псевдотуберкулез (дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка) – острое инфекционное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических проявлений с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта, кожи и опорно-двигательного аппарата [5].

Заболевание представляет проблему для современной инфектологии, что обусловлено его широким территориальным распространением и сложностью диагностики [3, 4].

Широкому распространению заболевания способствуют выраженные адаптационные свойства возбудителя – *Yersinia pseudotuberculosis*. Возбудитель псевдотуберкулеза персистирует на всей территории РФ: в Приморском, Камчатском и Хабаровском краях, на Сахалине, в Сибири, областях Северо-Западного Федерального округа. Основным возбудителем заболевания является микроорганизм, относящийся к первой серогруппе. Заболеваемость в РФ псевдотуберкулезом за последние годы составила 7,1–7,3 случая на 100 тыс. населения. Различные по интенсивности вспышки и спорадические случаи за последние десятилетия зафиксированы в странах ближнего зарубежья и Скандинавии [1].

Сложность диагностики псевдотуберкулеза обусловлена многообразием его клинических форм и необходимостью проведения дифференциальной диагностики с большим количеством сходных по клиническим симптомам заболеваний как инфекционной, так и неинфекционной природы [3, 4, 5].

Постановка предварительного диагноза основана на совокупности характерных для псевдотуберкулеза признаков заболевания и данных эпиданамнеза, окончательного диагноза – на результатах лабораторной диагностики.

Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза построена на детекции возбудителя и его дифференциации от других представителей рода *Yersinia*. Для этого используют традиционные бактериологические, серологические и биохимические методы исследования [2]. Диагностическая эффективность бактериологического метода ограничена трудоемкостью и относительно длительными сроками исследования материала. Серологические методы (реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ), основанные на выявлении антител, имеют ряд таких серьезных недостатков, как невысокая специфичность и поздние сроки подтверждения диагноза [2, 4, 5].

В настоящее время разрабатываются новые экспрессные методы диагностики, направленные на сокращение времени проведения анализа, его упрощение при одновременном увеличении надежности и легкости интерпретации результатов при высокой чувствительности и специфичности. Этим требованиям отвечает метод иммунохроматографии, основанный на принципах тонкослойной хроматографии и реакции антигенов микробной клетки со специфическими антителами [9].

В связи с этим целью настоящей работы стала

разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I.

Материалы и методы

В работе использованы: золотохлористоводородная кислота («Sigma», США), цитрат натрия, Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА) («MP Biomedicals», Великобритания), NaCl, K₂CO₃, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na₂B₄O₇ («Химмед», Россия), полиэтиленгликоль-40000 («Sigma», США). Все вспомогательные компоненты были аналитической и химической чистоты. Растворы для получения коллоидного золота и его конъюгатов с антителами готовили на деионизированной воде, полученной с помощью установки Milli-Q (Millipore, США).

В качестве специфических компонентов иммунохроматографической тест-системы были использованы: мышинные моноклональные антитела (МкАт) гибридных клеточных линий, полученные на липолисахаридный (ЛПС) антиген наружной мембраны «холодового» варианта псевдотуберкулезного микроба I серотипа (YP-101H2B4, YP-105C5A10); кроличьи антивидовые антитела против иммуноглобулинов мыши. Все специфические компоненты получены специалистами филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров).

Для изготовления иммунохроматографической тест-системы применяли комплект мембран фирмы MDI Easypack («Advanced Microdevice», Индия): нитроцеллюлозную мембрану – CNPF-SN12-L2-P25 со скоростью ламинарного потока 4 см за 125 с для нанесения тестовой и контрольной зон; подложку для конъюгата – PT-R5; подложку для образца – GFB-R7L (0,6); подложку для адсорбента – APO45.

Коллоидное золото (КЗ) получали по методу Френса [7]. Результат электронной микроскопии показал высокую степень однородности частиц по размерным характеристикам [6]. Для получения конъюгата коллоидного золота с антителами (КЗ-АТ) были использованы частицы диаметром (30±2) нм.

Определение связывания антител с КЗ проводили по рекомендациям [8]. Оптимальную концентрацию МкАт для получения конъюгата КЗ-АТ определяли на основании полученных фотометрических данных, используя длину волны 580 нм (D580). Для конъюгирования, в соответствии с рекомендациями, выбрали концентрацию антител, на 10–15 % превышающую точку выхода D580 на плато.

При приготовлении конъюгата КЗ-АТ в коллоидное золото с pH 9,0 вносили раствор иммуноглобулинов с выбранной концентрацией. Смесь КЗ-АТ перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. По окончании времени инкубации в смесь добавляли 4 % ПЭГ-40000 в объеме, необходимом для получения конечной концентрации 0,25 %, и вновь перемешивали содержимое на вортексе. Смесь инкубировали в течение 15 мин.

Удаление несвязавшихся антител от частиц КЗ с

Таблица 1

Иммунохимическая активность МкАт, полученных в ИФА, с антигенами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*

МкАт гибридной клеточной линии	Минимальная выявляемая концентрация							
	липополисахарида, выделенного из мембраны бактерий <i>Y. pseudotuberculosis</i> штамма 164/84 серогруппы I, выращенных при температуре (°C), нг·см ⁻³			бактерий <i>Y. pseudotuberculosis</i> штамма 164/84 серогруппы I, выращенных при температуре (°C), м.к.·см ⁻³			липополисахарида, выделенного из мембраны бактерий <i>Y. pestis</i> штамма ЕВ, выращенных при температуре 27–29 °C, нг·см ⁻³	
	4–8 °C	27–29 °C	36–38 °C	4–8 °C	27–29 °C	36–38 °C	27–29 °C, нг·см ⁻³	27–29 °C, м.к.·см ⁻³
YP-105C5A10	1,0	1,0	7,8	1,0·10 ⁴	2,5·10 ⁴	1·10 ⁵	>50000	>250·10 ⁶
YP-101H2B4	3,9	2,0	500	2,5·10 ⁴	5·10 ⁴	5·10 ⁵	То же	То же
YP-107C11A6	62,5	31,3	>500	1·10 ⁵	2·10 ⁵	1·10 ⁶	То же	То же
YP-109H9D10	7,8	3,9	>500	0,5·10 ⁵	1·10 ⁵	1·10 ⁶	То же	То же

иммобилизованными на их поверхности антителами проводили центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. По окончании центрифугирования супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 0,025 М ТРИС-буфере с pH 8,0, содержащем 0,25 % БСА и 10 % сахарозу, в объеме, составляющем одну четвертую часть от первоначального, взятого для отмывки.

Готовый конъюгат наносили на мембрану методом пропитывания, создавая плотность распределения реагента из расчета 30 мкл на 1 см² подложки.

Для формирования аналитической и контрольной зон иммуноглобулины в выбранной концентрации наносили с помощью диспенсора со скоростью движения каретки 30 мм·с⁻¹ плотностью нанесения 0,1 мкл·мм⁻¹. Подложки с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40 °C в течение 2 ч. Собранные и нарезанные по 4,5 мм иммунохроматографические тест-системы упаковывали в пластиковые контейнеры, которые для хранения помещали в фольгированные пакеты с силикогелевым осушителем и запаивали при помощи микроконвеера.

Результаты и обсуждение

На первом этапе разработки иммунохроматографической тест-системы провели выбор МкАт путем определения иммунохимической активности антител в ИФА с антигенами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о различной иммунохимической активности МкАт в отношении антигенов псевдотуберкулезного микроба. МкАт позволили выявить липополисахаридный антиген *Y. pseudotuberculosis* в концентрации от 1,0 до >500 нг·см⁻³ в зависимости от температур-

ного варианта ЛПС, микробные клетки – от 10 тыс. до 1 млн м.к.·см⁻³ в зависимости от температурного варианта выращивания микробной культуры.

Результаты оценки свидетельствуют об отсутствии перекрестного взаимодействия с ЛПС и микробной культурой чумного микроба, соответственно, в концентрациях 50 мкг·см⁻³ и 250 млн м.к.·см⁻³, что подтверждает видоспецифичность полученных гибридом. Более широким взаимодействием и чувствительностью в отношении антигенов *Y. pseudotuberculosis* обладают МкАт, продуцируемые гибридными клеточными линиями YP-105C5A10 и YP-101H2B4.

Далее провели выбор различных комбинаций соответствующих МкАт при использовании их в качестве основы для приготовления конъюгатов с коллоидным золотом и для формирования тестовой зоны, обеспечивающих наиболее высокую эффективность иммунохроматографического анализа, направленного на выявление *Y. pseudotuberculosis*. Оценка чувствительности иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I с использованием разных комбинаций специфических моноклональных антител представлена в табл. 2, из данных которой следует, что максимальную чувствительность (500 тыс м.к.·см⁻³) иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I показал образец, в котором использовали МкАт гибридной клеточной линии YP-105C5A10 в конъюгате с коллоидным золотом и МкАт гибридной клеточной линии YP-101H2B4 в тестовой линии.

На рисунке представлена фотография анализа с

Таблица 2

Оценка чувствительности иммунохроматографического анализа при выявлении *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 серогруппы I с использованием разных комбинаций специфических моноклональных антител

МкАт гибридной клеточной линии, используемые для формирования тестовой зоны	Чувствительность иммунохроматографического анализа при использовании конъюгата коллоидного золота с МкАт гибридной клеточной линии, м.к.·см ⁻³	
YP-105C5A10	1,0·10 ⁷	4·10 ⁶
YP-101H2B4	5·10 ⁵	1,0·10 ⁷

Примечание: во всех случаях n=20.



Результаты изучения чувствительности анализа при использовании иммунохроматографической моноклональной тест-системы, предназначенной для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I

Таблица 3

Результаты оценки чувствительности и специфичности анализа с использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I

Вид (серогруппа) микроорганизма	Количество исследованных штаммов, шт.	Определяемая концентрация, м.к.·см ⁻³	Количество выявляемых штаммов, шт.
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (I)	11	0,5·10 ⁶ –4·10 ⁶	11
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (II)	1	1·10 ⁸	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (III)	5	То же	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (IV)	1	«	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (V)	1	«	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> (VI)	1	«	-
<i>Y. pestis</i>	3	«	-
<i>Y. enterocolitica</i>	3	«	-
<i>E. coli</i>	1	«	-

использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы непосредственно после его постановки. Данный образец иммунохроматографической тест-системы был использован для дальнейшей оценки чувствительности с другими штаммами *Y. pseudotuberculosis*, а также специфичности с культурами – *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*. Результаты оценки чувствительности и специфичности анализа с использованием иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I представлены в табл. 3.

Оценка чувствительности и специфичности сконструированной иммунохроматографической моноклональной тест-системы показала, что она обеспечивает выявление штаммов *Y. pseudotuberculosis* серогруппы I в концентрации от 500 тыс. м.к.·см⁻³ (8 штаммов из 11 исследованных) до 4 млн м.к.·см⁻³ и не выявляет при исследовании штаммы других серогрупп псевдотуберкулезного микроба, близкородственные иерсинии, и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 100 млн м.к.·см⁻³.

Время постановки анализа с использованием разработанной тест-системы составляло 15 мин.

В результате проведенных исследований разработана высокочувствительная и специфичная иммунохроматографическая моноклональная тест-система, перспективная для выявления возбудителя псевдотуберкулеза серогруппы I.

Малая продолжительность анализа, отсутствие промежуточных стадий, возможность как визуального, так и инструментального учета результатов позволяют рассматривать иммунохроматографический анализ как один из методов выявления *Y. pseudotuberculosis* при лабораторной диагностике псевдотуберкулеза.

Разработанная иммунохроматографическая тест-система может также использоваться в качестве дополнительного средства иммунохимического анализа, повышающего достоверность идентификации возбу-

дителя псевдотуберкулеза после этапа «холодового обогащения» проб.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Косилко С.А., Бренёва Н.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Климов В.Т., Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Севостьянова А.В., Трушина Ю.Н., Мельникова О.В., Ярыгина М.Б., Худченко С.Э., Чеснокова М.В., Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекционным болезням бактериальной и вирусной этиологии в 2012 г. в Сибири и на Дальнем Востоке и прогноз ее развития на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:38–43.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
3. Покровский В.И., Сомов Г.П., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина; 2001. 256 с.
4. Ценева Г.Я., Воскресенская Е.А., Солодовникова Н.Ю. Биологические свойства иерсиний и лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: пособие для врачей. СПб.; 2001. С. 28–34.
5. Юшук Н.Д., Шестакова И.В. Псевдотуберкулез. Инфекционные болезни: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009. С. 352–62.
6. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010; 81(3):843–8.
7. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241:20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
8. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. 2nd Edition. Amsterdam: Acad. Press; 2008.
9. von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clin. Biochem.* 2005; 38(7):591–606. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008.

References

1. Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Breneva N.V., Mazepa A.V., Okunev L.P., Klimov V.T., Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Sevost'yanova A.V., Trushina Yu.N., Mel'nikova O.V., Yarygina M.B., Khudchenko S.E., Chesnokova M.V., Andaev E.I. [Epidemiological situation on natural focal infectious diseases of bacterial and viral etiology in 2012 in the territory of Siberia and Far East, and prognosis for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:38–43.
2. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. 2nd edition. M.: "Shiko"; 2013. 560 p.
3. Pokrovsky V.I., Somov G.P., Besednova N.N., Antonenko F.F. [Pseudotuberculosis]. M.: "Meditsin"; 2001. 256 p.
4. Tseneva G.Ya., Voskresenskaya E.A., Solodovnikova N.Y. [Biological Properties of Yersinia and Laboratory Diagnostics of Pseudotuberculosis and Yersiniosis: Guide Book for Medical Officers]. St. Petersburg; 2001. P. 28–34.
5. Yushchuk N.D., Shestakova I.V. [Pseudotuberculosis. Infectious Diseases: National Guidelines]. M.: "GEOTAR-Media"; 2009. P. 352–62.
6. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. *Talanta*. 2010; 81(3):843–8.
7. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241:20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
8. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. 2nd Edition. Amsterdam: Acad. Press; 2008.
9. von Lode P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. *Clin. Biochem.* 2005; 38(7):591–606. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.03.008.

Authors:

Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Eremin A.V. Affiliated Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation. E-mail: bogacheva70@mail.ru.

Об авторах:

Богачева Н.В., Елагин Г.Д., Печенкин Д.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В., Ерёмкин А.В. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 610000, г. Киров, Октябрьский проспект, 119. E-mail: bogacheva70@mail.ru.

Поступила. 24.06.15.

Е.И.Кошель¹, Г.А.Ерошенко¹, Л.В.Анисимова¹, Л.А.Новичкова¹, А.А.Широков², А.М.Буров²,
О.С.Кузнецов¹, В.В.Кутырев¹

ОЦЕНКА ДЛИТЕЛЬНОСТИ СОХРАНЕНИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В КЛЕТКАХ ПОЧВЕННЫХ АМЕБ *ACANTHAMOEBA* SP. В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН, Саратов, Российская Федерация

Цель работы. Анализ возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амебами *Acanthamoeba* sp. **Материалы и методы.** Исследовано взаимодействие амеб *Acanthamoeba* sp., выделенных из почв нор грызунов в Прикаспийском песчаном, Волго-Уральском степном и Прикаспийском Северо-Западном степном природных очагах чумы, с 4 штаммами *Y. pestis* основного подвида, 1 штаммом кавказского и 1 штаммом алтайского подвида. **Результаты и обсуждение.** Установлено, что штаммы основного подвида сохраняются в клетках амеб при температуре 26 °C и влажности 20 % (моделирование засушливых периодов в природных очагах чумы) в течение двух–четырех месяцев проведения эксперимента и в 10–20 раз дольше, чем в чистой культуре. Два штамма неосновных подвида не показали увеличения длительности выживания в ассоциации с акантамебами, что может быть связано с их пониженной резистентностью к фагоцитозу амебами этого рода. Методами флуоресцентной и электронной трансмиссионной микроскопии установлено, что клетки возбудителя чумы сохраняются в клетках амеб в индивидуальных вакуолях, окруженных эндоплазматическим ретикулом. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном участии амеб *Acanthamoeba* sp. в сохранении *Y. pestis* в почвенных биоценозах природных очагов чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, почвенные амебы, взаимодействие, внутриклеточная локализация.

Корреспондирующий автор: Елена Ивановна Кошель, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Е.И.Кошель¹, Г.А.Ерошенко¹, Л.В.Анисимова¹, Л.А.Новичкова¹, А.А.Широков², А.М.Буров², О.С.Кузнецов¹,
В.В.Кутырев¹

Exploratory Study of the Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in the Cells of Soil-Inhabiting Ameba – *Acanthamoeba* Sp.

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; ²RAS Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to explore the feasibility of the long-term persistence of *Yersinia pestis* strains in association with ameba – *Acanthamoeba* sp. **Materials and methods.** Investigated has been interaction of ameba – *Acanthamoeba* sp., isolated from rodent burrows in the Pre-Caspian sandy, Volga-Ural steppe, and Pre-Caspian North-Western steppe natural foci, with 4 strains of *Y. pestis* of the main subspecies, 1 strain of caucasica and 1 strain of altai subspecies. **Results and discussion.** It is established that the strains of the main subspecies survive in the cells of ameba at 26 °C and 20 % humidity (modeling of the drought conditions in the natural plague foci) within 2–4 months of experiment, and 10–20 times longer that in pure culture. Two strains of the non-main ssp. have not demonstrated an increase in persistency in association with *Acanthamoeba* sp., which may occur due to degraded resistance to phagocytosis in the ameba of this specie. Using fluorescent and transmission electronic microscopy, it is determined that the cells of plague agent persist in ameba cells in individual vacuoles, enclosed in endoplasmic reticulum. The data obtained may testify to the possible involvement of ameba *Acanthamoeba* sp. into sustainment of *Y. pestis* in soil biocoenoses of natural plague foci.

Key words: plague agent, soil-inhabiting ameba, interaction, intracellular localization.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena I. Koshel', e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burrov A.M., Kuznetsov O.S., Kuttyrev V.V. Exploratory Study of the Long-Term Persistence of *Yersinia pestis* in the Cells of Soil-Inhabiting Ameba – *Acanthamoeba* Sp. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:69–74. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74

До сих пор точные механизмы сохранения возбудителя чумы в природе остаются не выясненными. В соответствии с классическим представлением основным механизмом сохранения *Yersinia pestis* в природных очагах чумы является горизонтальная трансмиссия по цепочке грызун–блоха–грызун, с помощью которой поддерживается постоянная циркуляция возбудителя в очагах [4]. Однако эта схема не позволяет удовлетворительно объяснить многие особенности функционирования очагов, такие как длительные межэпизоотические периоды с отсутствием выявления

зараженных животных и выделения культур возбудителя чумы, быстрое и массовое начало эпизоотий чумы на обширных территориях очагов. Недавно сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, предполагающая участие членов почвенных биоценозов очагов чумы – простейших и нематод – в длительном сохранении и последующем выносе возбудителя чумы из почвенного биотопа в наземный [3, 6, 7]. Эта гипотеза объясняет сохранение возбудителя в течение межэпизоотических периодов и одновременное «взрывное» начало эпизоотий чумы на обширных

пространствах природного очага.

К числу наиболее многочисленных членов почвенных биоценозов относятся простейшие – амёбы. Установлено, что амёбы являются природными резервуарами многих патогенных бактерий – возбудителей легионеллеза, туляремии, холеры, сибирской язвы и других опасных и особо опасных инфекций [7, 11, 12]. Благодаря ассоциации с простейшими эти бактерии могут не только длительно сохраняться в окружающей среде, но и увеличивать свою численность за счет питательных ресурсов клеток амёб. Возможно, что такой же способ сохранения в почвенных биоценозах природных очагов использует и возбудитель чумы. Этот механизм может обеспечить его выживание во время межэпизоотических периодов и последующий вынос в наземный биоценоз при наступлении благоприятных климатических условий.

В предыдущих исследованиях нами установлено, что наиболее многочисленными представителями простейших в почвах нор грызунов природных очагов чумы Прикаспия являются цистообразующие амёбы рода *Acanthamoeba* [1]. Обсемененность клетками *Acanthamoeba* sp. почвенного субстрата в очагах очень высока и достигает 300000 кл./г. Такая высокая численность может обеспечить постоянное взаимодействие клеток амёб этого рода с возбудителем чумы, а устойчивость цист амёб к неблагоприятным условиям – долговременное сохранение возбудителя чумы в ассоциации с ними. В настоящее время доказана роль амёб рода *Acanthamoeba* в сохранении патогенных бактерий *Burkholderia*, *Coxiella*, *Legionella*, *Francisella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Helicobacter* и др. [11]. В то же время взаимодействие акантамёб с возбудителем чумы ранее не исследовалось. В литературе опубликована лишь одна работа, свидетельствующая о возможности сохранения клеток *Y. pestis* в предцистах амёбы *Hartmannella rhyssodes* [3]. Однако доказательства длительного сохранения клеток возбудителя чумы в ассоциации с амёбами до настоящего момента отсутствуют.

Цель данного исследования – анализ возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp., выделенными из почв прикаспийских очагов чумы.

Материалы и методы

Почвенные амёбы. В работе использованы амёбы *Acanthamoeba* sp., выделенные ранее из субстрата дна камер нор различных грызунов в Прикаспийском песчаном, Волго-Уральском степном и Прикаспийском Северо-Западном степном природных очагах чумы. Схемы выделения и идентификации почвенных амёб описаны нами в предыдущей работе [1].

Изучение длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp. В работе использовано 6 штаммов *Y. pestis*, включающих 4 штамма основного подвида и 2 штамма

неосновных подвигов. К основному подвиду относились штаммы *Y. pestis* KM-932, A-1792, 231(708) и его производный KM-130. Из двух штаммов неосновных подвигов C-534 относится к кавказскому подвиду, а И-3000 – к алтайскому. Культуры штаммов *Y. pestis* выращивали на агаре или бульоне LB.

В начале эксперимента получали совместные культуры амёб с исследуемыми штаммами *Y. pestis*. Для этого из суточных агаровых культур *Y. pestis* готовили суспензии клеток в концентрации $1 \cdot 10^{12}$ кл./мл в 0,9 % растворе NaCl. В 1 мл готовых бактериальных суспензий вносили 0,05 мл штоковой взвеси аксенической культуры амёб *Acanthamoeba* sp. с тем, чтобы конечная концентрация амёб составила $5 \cdot 10^2$ кл./мл. Затем полученные совместные культуры наносили по 0,2 мл на чашки Петри с плотной средой NGM [9] и растирали по поверхности среды шпателем. Совместные культуры *Y. pestis* и *Acanthamoeba* sp инкубировали при температуре 28 °С в термостате в течение нескольких суток до полного «выедания» газонов *Y. pestis* клетками амёб. Для каждого штамма готовили по 2 чашки. После накопления биомассы амёб собирали с поверхности агара двух чашек шпателем в пробирку с 2 мл 0,9 % раствором NaCl. Полученные суспензии центрифугировали со скоростью 4000 об./мин в течение 1 мин, после чего надосадочную жидкость удаляли, а осадок амёб ресуспендировали в 2 мл 0,9 % раствора NaCl. Этот этап промывки повторяли дважды. Промытые суспензии амёб наносили по 100 мкл на стерильные бумажные фильтры размером 1×4 см и помещали в отдельные стерильные стеклянные пробирки без добавления питательных веществ и влаги. Для каждого штамма готовили 18 таких пробирок. Кроме того, для каждого штамма готовили 18 контрольных пробирок с фильтрами с нанесенной на них чистой культурой штамма. Чистые культуры штаммов предварительно выращивали на плотной среде NGM при 28 °С в течение 2 сут и затем суспендировали в 2 мл 0,9 % раствора NaCl до получения концентрации $1 \cdot 10^{12}$ кл./мл. 100 мкл суспензии чистой культуры наносили на полоски фильтров того же размера. Таким образом, для каждого штамма готовили 18 опытных пробирок с полосками фильтров, содержащих отмытые после совместного культивирования с *Y. pestis* амёбы, и 18 контрольных пробирок с чистыми культурами штаммов *Y. pestis*. В общей сложности в одном повторе для 6 исследованных штаммов использовали 216 таких пробирок. Пробирки содержали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 20 % в течение 4 месяцев для моделирования условий засушливых климатических периодов. На протяжении всего эксперимента делали высевы из пробирок, начиная со вторых суток. Высевы проводили через 2, 4, 6, 14, 21, 28, 60, 90 и 120 сут. Для этого через каждый интервал времени в две опытные и две контрольные пробирки каждого штамма добавляли по 2 мл LB бульона. Посевы инкубировали при 28 °С. После по-

мутнения бульона (или по истечении 10 сут) 100 мкл бульона высевали на 1 чашку с LB агаром, которую инкубировали при 28 °С. С выросшей бактериальной культурой ставили реакцию с чумными бактериофагами Покровской и Л-413С, а также готовили из нее препараты ДНК. С препаратами ДНК проводили ПЦР с использованием набора реагентов «Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом ПЦР (ГенПест)» (производство РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкцией производителя, за исключением того, что количество циклов амплификации увеличивали до 40. Амплификацию проводили в термоциклере «БИС – А111» (БИС-Н, Россия).

По положительным результатам этих двух тестов судили о принадлежности выделенной бактериальной культуры к виду *Y. pestis*. В случае получения отрицательного результата из этой же пробирки делали повторный высеv через 10 сут после добавления бульона в образцы. Если возбудитель чумы в образце не выявлялся, то результат считали отрицательным. Для повышения достоверности весь эксперимент, начиная с этапа получения совместных культур, повторяли для каждого штамма *Y. pestis* 2 раза.

Определение локализации возбудителя чумы в клетках амёб *Acanthamoeba* sp. Для определения внутриклеточной локализации клеток возбудителя чумы в амёбах *Acanthamoeba* sp. готовили образцы для флуоресцентной и электронной микроскопии. Для анализа использовали совместную агаровую культуру штамма *Y. pestis* 231(708) и амёб *Acanthamoeba* sp., приготовленную по вышеуказанной методике. Культуру обеззараживали добавлением мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 с последующим прогреванием в течение 40 мин при температуре 57 °С. После этого совместную культуру промывали 2 раза. Из полученного осадка готовили мазки, которые окрашивали с помощью коммерческого набора «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные» (производство РосНИПЧИ «Микроб»), в состав которого входит иммуноглобулиновая фракция чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, меченая флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ). Для контрастирования и снижения уровня неспецифического свечения дополнительно использовали набор реагентов «Альбумин бычий или бараний, меченый родамином сухой» (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАН). Просмотр мазков осуществляли на микроскопе Axio Lab. A1 с цифровой камерой Axio Cam ERC 5s (Carl Zeiss, Германия). Для просвечивающей электронной микроскопии также использовали совместную агаровую культуру штамма *Y. pestis* 231(708) и амёб *Acanthamoeba* sp.

Для получения ультратонких срезов использовали ультратом LKB III (LKB, Швеция). Готовые образцы просматривали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) на базе Центра коллективного

пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов).

Результаты и обсуждение

*Изучение возможности длительного сохранения штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp.* Эксперимент по изучению длительного сохранения *Y. pestis* в акантамебах проводили в течение 4 месяцев. Совместные культуры амёб и штаммов *Y. pestis* содержали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 20 % в отсутствие питательных веществ и влаги, моделируя засушливые климатические периоды природных очагов чумы. Схожую схему использовали при изучении длительного сохранения возбудителя туляремии в амёбах *A. castellanii* [10]. В результате удалось установить, что в ассоциации с амёбами *Acanthamoeba* sp. большинство штаммов *Y. pestis* сохранялось значительно дольше, чем в чистой культуре. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* в чистой культуре сохранялись в указанных условиях эксперимента не более двух недель (таблица). Наибольшую жизнеспособность показали два штамма неосновных подвигов: кавказского (С-534) и алтайского (И-3000), которые высевались в течение 2 недель. Такое длительное сохранение на фильтровальной бумаге клеток этих штаммов было неожиданным, поскольку все штаммы *Y. pestis* являются ауксотрофами, не способными существовать в отсутствие ряда органических питательных веществ и влаги. Однако для этих двух штаммов нами установлено, что они образуют массивную биопленку на абиотических поверхностях и, возможно, это свойство обеспечило их наибольшую жизнеспособность в чистой культуре.

Штаммы *Y. pestis* 231(708), КМ 932 и А-1792 основного подвида, которые продуцируют существенно меньшее количество поли-*N*-ацетилглюкозамина – основного вещества биопленки, сохранялись в усло-

Длительность выживания штаммов *Y. pestis* в совместной культуре с амёбами *Acanthamoeba* sp. и в чистой культуре

Штамм <i>Y. pestis</i>	Длительность выживания в ассоциации с амёбами, сут	Длительность выживания в чистой культуре, сут
Основной подвид		
231(708)	120	6
КМ-130, мутант 231(708)	6	2
КМ 932	60	6
А-1792	60	6
Неосновные подвиды		
С-534, кавказский подвид	6	14
И-3000, алтайский подвид	14	14

виях проводимого эксперимента в чистой культуре не более недели. Самым нежизнеспособным оказался штамм КМ-130 (мутант природного штамма *Y. pestis* 231(708)), не образующий биопленку, который не выделялся уже через 2 сут. По-видимому, образование биопленки способствует сохранению возбудителя чумы в неблагоприятных условиях, защищая клетки от высыхания и недостатка питательных веществ.

В тех же условиях большинство исследованных штаммов *Y. pestis* в ассоциации с амебами *Acanthamoeba* sp. сохранялось значительно дольше, чем в чистой культуре (таблица). Штаммы КМ-932 и А-1792 основного подвида выжили в ассоциации с амебами в течение 2 месяцев, т.е. в 10 раз дольше, чем в чистой культуре. Штамм 231(708) основного подвида сохранился в культуре с амебами в течение наиболее длительного времени и выделился спустя 4 месяца от начала эксперимента, то есть в 20 раз дольше, чем в чистой культуре. Его мутант сохранился в совместной культуре с амебами в 3 раза дольше, чем в чистой культуре, но существенно меньше (в 20 раз), чем исходный штамм 231(708). Таким образом, у природных штаммов *Y. pestis* основного подвида отмечалось повышение длительности выживания в ассоциации с акантамебами в среднем в 10–20 раз по сравнению с чистой культурой. В то же время два штамма неосновных подвигов – С-534 и И-3000 – не показали увеличения длительности выживания в ассоциации с амебами, несмотря на их высокие показатели сохранения в чистой культуре в условиях эксперимента. Штамм И-3000 сохранился в ассоциации с амебами в течение того же срока, что и в чистой культуре – 14 сут, а штамм С-534 – 6 сут. Причиной этого может быть выявленная нами ранее пониженная резистентность штаммов неосновных подвигов к фагоцитозу амебами *Acanthamoeba* sp. по сравнению с более устойчивыми штаммами основного подвида, что подробно отражено в диссертации Е.И.Кошель «Образование биопленки штаммами *Yersinia pestis* разных подвигов и их взаимодействие с членами почвенных биоценозов очагов чумы». Это, в свою очередь, может быть связано с более низким уровнем экспрессии одного из основных факторов патогенно-

сти возбудителя чумы – системы секреции III-го типа у штаммов неосновных подвигов [8].

Внутриклеточная локализация клеток *Y. pestis* в амебах *Acanthamoeba* sp. По данным литературы, возбудители опасных инфекций могут сохраняться в амебах в пространстве между стенками цист амеб, свободно располагаться в цитоплазме, а также занимать органоиды клетки и вакуоли [11, 12]. В нашем исследовании с помощью флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии удалось выяснить, что клетки *Y. pestis* сохраняются в цитоплазме амеб в индивидуальных вакуолях. При обработке иммуноглобулинами, конъюгированными с ФИТЦ, и альбумином, меченым родамином, клетки возбудителя чумы внутри амеб при УФ-облучении визуализировались по характерному желто-зеленому специфическому свечению, в то время как стенки клеток амеб давали оранжевое флуоресцентное свечение (рис. 1). На первой стадии после фагоцитоза трофозоиты амеб оказывались полностью заполненными клетками возбудителя чумы. На рис. 1 виден крупный трофозоит, заполненный светящимися клетками *Y. pestis*. К моменту инцистирования часть клеток переваривалась амебой, а часть оставалась жизнеспособной. С течением времени количество жизнеспособных клеток становилось меньше, однако их число оказалось достаточным, чтобы спустя 4 месяца из амеб высевались культуры *Y. pestis*. С помощью электронной микроскопии показано, что неизмененные клетки *Y. pestis* находятся внутри клеток амеб, располагаясь при этом в отдельных вакуолях (рис. 2). Также как и легионеллы, клетки возбудителя чумы оказываются в этих вакуолях окруженными эндоплазматическим ретикулумом. Вероятно, в этих условиях клетки могут выживать длительное время, будучи надежно защищенными внутри цист амеб. Можно предположить, что при попадании в благоприятную для возбудителя чумы среду его клетки начинают активно делиться и разрушают хозяйскую клетку подобно другим бактериям.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены важные особенности взаимодействия возбудителя чумы с почвенными амебами.

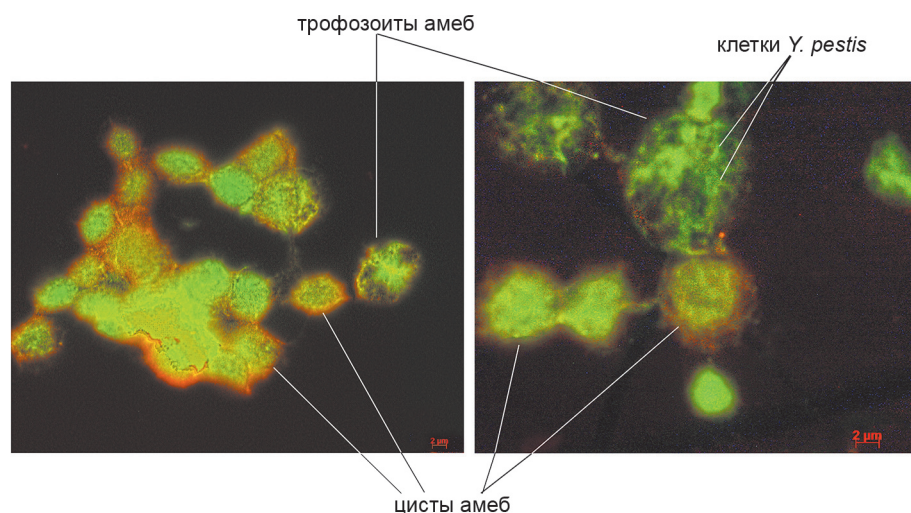


Рис. 1. Иммунофлуоресцентный анализ амеб *Acanthamoeba* sp. после их выращивания на штамме *Y. pestis* 231(708), микроскоп Axio Lab. A1 с цифровой камерой Axio Cam ERC 5s (Carl Zeiss, Германия). Увеличение $\times 1000$. Специфическое желто-зеленое свечение указывает на внутриклеточную локализацию клеток возбудителя чумы в трофозоидах и цистах амеб

клетки *Y. pestis* в индивидуальных вакуолях

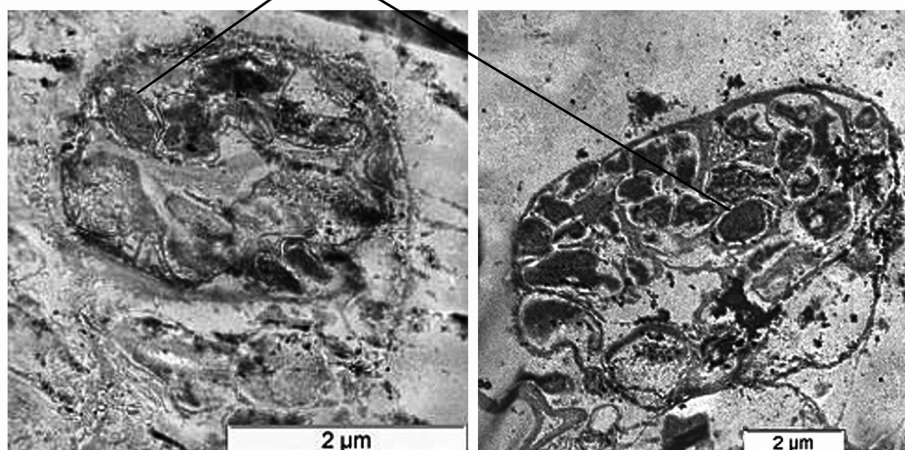
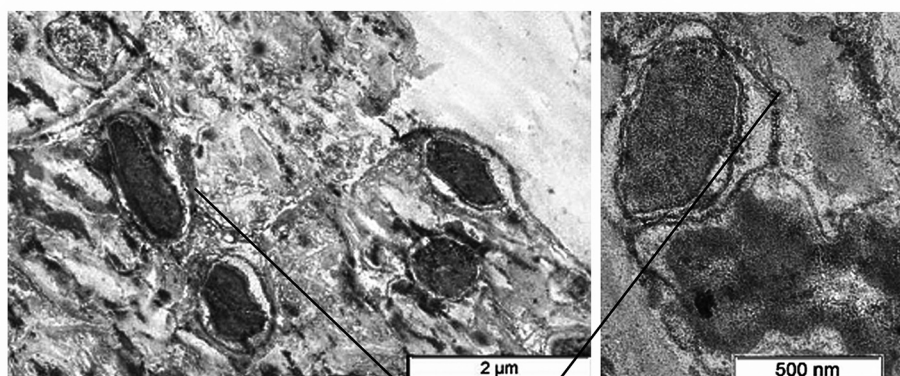


Рис. 2. Электронные микрофотографии амёб *Acanthamoeba* sp., содержащих клетки *Y. pestis* 231(708) в вакуолях. Получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия):

ЭПР – эндоплазматический ретикулум



ЭПР, окружающий вакуоль с клеткой *Y. pestis*

Впервые показано, что клетки *Y. pestis* способны выживать в течение длительного времени в отсутствие питательных веществ и влаги в ассоциации с *Acanthamoeba* sp. Установлено, что совместно с акантамебами штаммы основного подвида, в отличие от штаммов неосновных подвигов, выживают в среднем в 10–20 раз дольше (до 4 месяцев проведения опыта), чем в чистой культуре. Это может быть связано с их большей устойчивостью к фагоцитозу акантамебами по сравнению со штаммами неосновных подвигов. Также показано, что клетки *Y. pestis* локализуются в амёбах в индивидуальных вакуолях, окруженных эндоплазматическим ретикулумом. Можно высказать предположение, что почвенные амёбы могут быть не только резервуаром возбудителя чумы, но и переносчиком инфекции из почвенного экотопа в теплокровных животных, в первую очередь, в мелких роющих грызунов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы

Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика*. 2015; 51:39–45.

2. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 4:7–12.

3. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1992; 9 (10):2–4.

4. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.-Л.; 1964. 211 с.

5. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Аникин В.В., Яковлев С.А., Караваева Т.Б. К роли нематод [*Secernentea*, *Rhabdidae*] – паразитов блох в энзоотии чумы. *Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье*. 2006; 5:88–93.

6. Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизмах энзоотии чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):5–8.

7. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.

8. Ansong C., Schrimpe-Rutledge A.C., Mitchell H.D., Chauhan S., Jones M.B., Kim Y.-M., McAteer K., Kaiser B.L.D., Dubois J.L., Brewer H.M., Frank B.C., McDermott J.E., Metz T.O., Peterson S.N., Smith R.D., Motin V.L., Adkins J.N. Multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia pestis* virulence mechanisms. *Mol. Biosyst.* 2013; 9: 44–54.

9. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77:71–94.

10. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.

11. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33.

12. Harb O.S., Abu Kwai Y. Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:6970–8.

References

1. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyaeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Identification of systematic positioning of soil amoeba, isolated from foci of the Caspian-Sea Region, based on the analysis of ribosomal operon segments]. *Genetika*. 2015; 51:39–45.
2. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyaeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of interaction between plague agent and invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 4:7–12.
3. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukanina L.M. [Studies of association between soil amoeba *Hartmannella rhysodes* and bacteria – plague and pseudotuberculosis agents, *in vitro*]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1992; 9 (10):2–4.
4. Pavlovsky E.N. [Natural Focality of transmissible diseases in connection with landscape epidemiology of zoonoses]. M.-L.; 1964. 211 p.
5. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Anikin V.V., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B. [Concerning the role of nematodes (*Secernentea*, *Rhabdidae*), flea parasites, in plague enzootics]. *Entomol. Parazitol. Issled. v Povolzh'e*. 2006; 5:88–93.
6. Popov N.V., Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Formation of modern concepts on the mechanism of plague enzooty]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3:5–8.
7. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6.
8. Ansong C., Schrimpe-Rutledge A.C., Mitchell H.D., Chauhan S., Jones M.B., Kim Y.-M., McAteer K., Kaiser B.L.D., Dubois J.L., Brewer H.M., Frank B.C., McDermott J.E., Metz T.O., Peterson S.N., Smith R.D., Motin V.L., Adkins J.N. Multi-omic systems approach to elucidating *Yersinia pestis* virulence mechanisms. *Mol. Biosyst.* 2013; 9: 44–54.

9. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974; 77:71–94.
10. El-Etr S.H., Margolis J.J., Monack D., Robison R.A., Cohen M., Moore E., Rasley A. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7488–500. DOI: 10.1128/AEM.01829-09.
11. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33.
12. Harb O.S., Abu Kwai Y. Essential role for the *Legionella pneumophila* rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. *Infect. Immun.* 2000; 68:6970–8.

Authors:

Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Shirokov A.A., Burov A.M. RAS Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms. Saratov, Russian Federation.

Об авторах:

Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Широков А.А., Буров А.М. ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН. Саратов, Российская Федерация.

Поступила 20.04.15.

Н.Ю.Носов, Е.Г.Оглодин, Я.М.Краснов, Л.М.Куклева, Н.Ю.Шавина, Г.А.Ерошенко, В.В.Кутырев

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – филогенетический анализ штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и сопредельных странах с помощью SNP-анализа полногеномных последовательностей этих штаммов. **Материалы и методы.** Проведено секвенирование геномов 14 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из 13 природных очагов чумы России и стран ближнего зарубежья и их сравнение с 9 штаммами этого биовара из базы данных NCBI GenBank. С помощью программ Wombac 2.0 и Bionumerics 7.1 выявлено наличие 1875 коровых SNPs, на основе которых построена дендрограмма филогенетических связей средневековых штаммов. **Результаты и выводы.** По данным полногеномного SNP-анализа установлено, что штаммы *Y. pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и стран ближнего зарубежья относятся к филогенетической линии 2.MED1 и делятся на две основные эволюционные ветви, первая из которых включает штаммы из регионов Кавказа и Прикаспия, а вторая – из Средней Азии и Китая. Полученные данные могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических способов дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара.

Ключевые слова: возбудитель чумы, штаммы средневекового биовара, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Носов Никита Юрьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.Yu.Nosov, E.G.Oglodin, Ya.M.Krasnov, L.M.Kukleva, N.Yu.Shavina, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Medieval Biovar from Natural Plague Foci of the Russian Federation and Bordering Countries

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to conduct phylogenetic investigation of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) from plague foci of Russia and bordering countries, using SNP-analysis of the genome-wide sequences of these strains. **Materials and methods.** Carried out has been sequencing of 14 *Y. pestis* strains, medieval biovar, from 13 natural plague foci of Russia and neighboring states, as well as their comparison to 9 strains of the same biovar, contained in the NCBI GenBank database. Using software products – Wombac 2.0 and Bionumerics 7.1, revealed is the presence of 1875 core SNPs, on the basis of which a dendrogram of phylogenetic relations between medieval strains is constructed. **Results and conclusions.** In consequence of genome-wide SNP-analysis, it is established that *Y. pestis* strains, medieval biovar, from plague foci of Russia and bordering states are assigned to 2.MED1 phylogenetic line and fall under two major evolutionary branches, the first one of which includes strains from the Caucasus and Caspian-Sea regions, and the second one – from Central Asia and China. The data obtained can be used for the development of molecular-genetic methods for differentiation of *Y. pestis* strains, medieval biovar.

Key words: plague agent, strains of medieval biovar, phylogenetic analysis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nikita Yu. Nosov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Nosov N.Yu., Oglodin E.G., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Phylogenetic Analysis of *Yersinia pestis* Strains of Medieval Biovar from Natural Plague Foci of the Russian Federation and Bordering Countries. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:75–78. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-75-78

Штаммы *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара широко распространены в природных очагах чумы в Российской Федерации и в большинстве стран СНГ, в том числе они циркулируют в 7 из 11 очагов России [4]. Эти штаммы отличаются высокой вирулентностью и имеют высокую эпидемическую значимость. Считается, что штаммы средневекового биовара явились этиологическим агентом второй пандемии чумы под названием «Черная смерть», унесшей в средние века более трети населения Европы [2, 7]. Эпидемии и вспышки чумы, регистрировавшиеся в России вплоть до начала XX века, возможно, были вызваны штаммами средневекового биовара, и впоследствии отдельные случаи чумы на этой территории были также вызваны преимущественно штаммами средневекового биовара.

Считается, что штаммы средневекового биовара возникли незадолго до начала второй пандемии чумы, и что эта пандемия чумы началась в регионе Прикаспия [7]. Однако в последнее время это мнение оспаривается китайскими исследователями, которые считают, что штаммы средневекового биовара появились на территории Китая, откуда были занесены в Европу [10, 12].

Для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара характерно значительное единообразие их свойств. Они не редуцируют нитраты, не ферментируют рамнозу, но ферментируют глицерин и арабинозу. В связи с «эволюционной молодостью» и генетической однородностью штаммы средневекового биовара с трудом поддаются внутрибиоварной дифференциации с помощью традиционных методов молекулярного типирования – анализа полиморфизма длин

рестрикционных фрагментов (IS-типирование, риботипирование), ПЦР-типирования, мультилокусного сиквенса-типирования [1, 3, 5, 9, 11]. Наибольшую разрешающую способность в отношении штаммов средневекового биовара имеет метод анализа варибельного числа tandemных повторов, однако этот метод применялся для исследования ограниченного числа штаммов *Y. pestis* из природных очагов Российской Федерации и сопредельных стран [8]. По данным SNP-анализа полногеномных последовательностей, штаммы средневекового биовара зарубежного происхождения делятся на три филогенетические линии 2.MED1 (штаммы из Ирана и Китая), 2.MED2 и 2.MED3 (штаммы из Китая) [10, 13]. Отечественными исследователями, по данным полногеномного секвенирования, установлено, что наиболее древние средневековые штаммы линии 2.MED0 циркулируют в Центрально-Кавказском высокогорном очаге чумы в России, что подтверждает гипотезу возникновения средневекового биовара в регионе Кавказа – Прикаспия [6]. В то же время филогенетическая принадлежность штаммов средневекового биовара из очагов России и сопредельных стран остается малоисследованной.

Целью этой работы был филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из очагов чумы в России и сопредельных стран с помощью SNP-анализа полногеномных последовательностей этих штаммов.

Материалы и методы

В работе использовано 14 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из 13 природных очагов России и других стран СНГ (таблица). Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». Выделение ДНК штаммов проводили с помощью набора AxyPrep производства AXYGEN Biosciences. Для секвенирования геномов штаммов использовали систему Ion PGM (Life Technologies, США). Для обработки данных секвенирования применяли пакет программ Ion Torrent Suite software версии 3.4.2. и Newbler gsAssembler версии 2.6. Полногеномный SNP-анализ штаммов *Y. pestis* проводили с помощью программ Wombac версии 2.0 и Bionumerics версии 7.1.

Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара выполняли на основе анализа данных полногеномного секвенирования 14 штаммов из 13 природных очагов Российской Федерации и других стран СНГ, в том числе из всех 7 очагов России, в которых циркулируют штаммы средневекового биовара (таблица).

Для построения дендрограммы, отражающей филогенетические связи средневековых штаммов, использовали также зарубежные штаммы средневе-

Штаммы *Y. pestis* средневекового биовара, использованные в работе

Штамм <i>Y. pestis</i>	Место и год выделения	Принадлежность к филогенетической линии
C-627	Центрально-Кавказский высокогорный, 1986	2.MED0
M-978	Прикаспийский Северо-Западный степной, 1990	2.MED1, Кавказско-Прикаспийская ветвь
M-1484	Волго-Уральский степной. 1992	«
M-1773	Волго-Уральский песчаный, 2002	«
M-1864	Прикаспийский песчаный. 2009	«
1906	Прикаспийский песчаный, 2014	«
173	Мангышлакский пустынный, 1978	«
C-791	Дагестанский равнинно-предгорный, 2003	«
1116-Д	Терско-Сунженский низкогорный, 1970	«
KM918	Центрально-Кавказский высокогорный, 1986	«
A-1809	Таласский высокогорный, 1980	2.MED1, Среднеазиатско-Китайская ветвь
A-1920	Прибалхашский пустынный, 1988	«
244	Северо-Приаральский пустынный. 1967	«
A-1825	Кызылкумский пустынный, 1983	«
NCBI GenBank		
KIM10	Иран/Курдистан, 1968	2.MED1, Кавказско-Прикаспийская ветвь
2506	Китай, 2005	2.MED1, Среднеазиатско-Китайская ветвь
2654	Китай, 2006	«
2501	Китай, 2005	«
2504	Китай, 2005	«
K197302	Китай, 1983	2.MED2
91	Китай, 1988	«
CMCC125002	Китай, 1964	2.MED3
J1978002	Китай, 1978	«

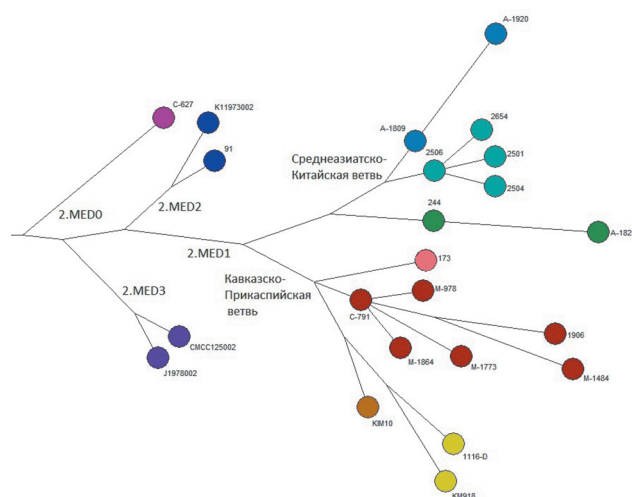
кового биовара, полногеномные последовательности которых представлены в базе данных NCBI GenBank. В анализ для сравнения включены штаммы *Y. pestis* K1197302 и 91 филогенетической линии 2.MED2 из Китая, штаммы CMCC125002 и J1978002 линии 2.MED3 из Китая, а также штамм KIM10 линии 2.MED1 из Ирана и штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 этой же линии из Китая (таблица, рисунок).

С помощью программы Wombac 2.0 у всех 23 взятых в анализ штаммов было выявлено 1875 коровых (общих для всех штаммов) вариабельных единичных нуклеотидов (SNPs). Построение дендрограммы на основе этих SNPs выявило четкую кластеризацию штаммов средневекового биовара по их принадлежности к филогенетическим линиям и географическим регионам происхождения (рисунок). Отдельную и наиболее раннюю эволюционную ветвь средневекового биовара представил штамм *Y. pestis* C-627 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы, который был ранее выделен в отдельную филогенетическую линию 2.MED0 [6]. Два отдельных кластера составили штаммы линий 2.MED2 и 2.MED3 из Китая. Все исследованные штаммы из очагов России и других стран СНГ вошли в отдельный большой кластер филогенетической линии 2.MED1, в который также вошел штамм этой линии *Y. pestis* KIM10 из Ирана и штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 этой же линии из Китая.

Как следует из дендрограммы, все штаммы, принадлежащие к линии 2.MED1, разделились на две крупные ветви. Одну из них мы обозначили как Кавказско-Прикаспийская ветвь по региону происхождения входящих в нее штаммов. Эта ветвь представлена двумя отдельными кластерами. Один из них включает штаммы *Y. pestis* 1116-Д из Терско-Сунженского низкогорного очага и 918 из Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. В этот же кластер вошел штамм KIM10 из Ирана. Второй кластер Кавказско-Прикаспийской ветви составили 6 штаммов из пяти очагов Прикаспия: Прикаспийского Северо-Западного, Волго-Уральского степного, Волго-Уральского песчаного, Прикаспийского песчаного очагов. И, наконец, третий кластер Кавказско-Прикаспийской ветви составил один штамм *Y. pestis* 173 из Мангышлакского пустынного очага.

Вторая ветвь микроэволюции средневековых штаммов линии 2.MED1 обозначена нами как Среднеазиатско-Китайская ветвь. Один из ее кластеров составили штаммы *Y. pestis* 244 и A-1825 из Северо-Приаральского пустынного и Кызылкумского пустынного очагов. Отдельный кластер представлен штаммами *Y. pestis* A-1809 и A-1920 из Таласского высокогорного и Прибалхашского пустынного очагов. Также отдельный кластер составили штаммы 2506, 2654, 2501, 2504 линии 2.MED1 из Китая.

Таким образом, впервые установлено, что штаммы средневекового биовара из очагов России, а также из шести других очагов стран СНГ относятся к филогенетической линии 2.MED1. Ранее было показано,



Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России и сопредельных государств. Программа Bionumerics 7.1 алгоритм Maximum Parsimony с логарифмической обработкой длины ветвей

что на территории Центрально-Кавказского высокогорного очага, наряду со штаммами линии 2.MED1, циркулируют штаммы древней линии 2.MED0 [6].

Установлено разделение штаммов *Y. pestis* средневекового биовара по региону происхождения с выделением кластеров штаммов из районов Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Китая. Такая популяционная структура средневекового биовара является результатом адаптации штаммов к природным биоценозам различных ландшафтно-географических зон, которая сопровождалась специфическими изменениями генома отдельных популяций этого биовара. Полученные данные по внутрибиоварному разнообразию средневековых штаммов представляют не только теоретический интерес, но и создают основу для разработки методов молекулярной идентификации этих штаммов в целях практического использования в системе молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителя чумы.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1997; 2:36–40.
2. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 176 с.
3. Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* на основе вариабельности генов биосинтеза рРНК. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 3:6–10.
4. Павлова А.И., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы России и Монголии. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):49–53.
5. Попов Ю.А., Савостина Е.П., Каштанова Т.Н., Ящечкин Ю.И. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2004; 1:22–6.
6. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:49–54.

7. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. М.: Вузовская книга; 2006. 468 с.
8. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шишняну М.В., Мишанкин Б.Н. Мультилокусный VNTR-анализ в изучении популяционной структуры *Yersinia pestis* в природных очагах. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2004;4:19–23.
9. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:14043–48.
10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
11. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G.J., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2674–24. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005.
12. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE.* 2009; 4(6):e6000. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000.
13. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

References

1. Bobrov A.G., Filippov A.A. [Occurrence of IS285 and IS100 in genomes of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1997; 2:36–40.
2. Domaradsky I.V. [Plague]. М.: Meditsina; 1998. 176 p.
3. Eroshenko G.A., Pavlova A.I., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Genotyping of *Yersinia pestis* strains based on rRNA biosynthesis gene variability]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 3:6–10.
4. Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odnokov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kuttyrev V.V. [Analysis of genetic variability of *Yersinia pestis* strains (medieval biovar) isolated in natural plague foci of the Russian Federation and Mongolia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):49–53.
5. Popov Yu.A., Savostina E.P., Kashtanova T.N., Yashechkin Yu.I. [Analysis of genomic polymorphism in typical and atypical strains of plague

agent, using polymerase chain reaction with universal primers]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2004; 1:22–6.

6. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:49–54.

7. Supotnitsky M.V., Supotnitskaya N.S. [An Outline of Plague History]. М.: “Vuzovskaya Kniga”; 2006. 468 p.

8. Suchkov I.Yu., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Shishnyanu M.V., Mishan'kin B.N. [Multi-locus VNTR-Analysis in Studies of Population Structure of *Yersinia pestis* in Natural Foci]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2004; 4:19–23.

9. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:14043–48.

10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variation in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

11. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G.J., Morris J.G., Sulakvelidze A., Stine O.C. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:2674–24. DOI: 10.1128/JCM.43.6.2674-2684.2005.

12. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS ONE.* 2009; 4(6):e6000. DOI: 10.1371/journal.pone.0006000.

13. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

Authors:

Nosov N.Yu., Oglodin E.G., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Носов Н.Ю., Оглодин Е.Г., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 16.06.15.

В.Ю.Охупкина, Н.В.Пяткова, А.К.Федотов

МЕТОД УСКОРЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ БРУЦЕЛЛЕЗЕ*Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны РФ, Киров, Российская Федерация*

Цель. Разработка метода предварительной ускоренной оценки эффективности антибактериальных препаратов при бруцеллезе в условиях *in vivo*. **Материалы и методы.** В качестве биологической модели использовали аутбредных белых мышей с остросептической формой экспериментального бруцеллеза, вызванной внутривенным заражением сублетальными дозами возбудителя. Одновременно с заражением животным проводили курсы антибактериальной терапии препаратами различных групп. Определяли изменение количественного содержания микробов во внутренних органах животных на фоне введения антибиотиков бактериологическим методом. На основании полученных данных рассчитывали индекс антимикробной активности, по величине которого возможно ранжирование испытуемых антибактериальных препаратов. **Результаты и обсуждение.** Между результатами оценки активности препаратов, полученными при использовании разработанного метода и при проведении полноценных стандартных курсов терапии, отмечается высокий уровень корреляционной зависимости (величина коэффициента корреляции 0,73), что определяет пригодность метода для скрининга новых антибиотиков в отношении возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, антибактериальные препараты, экспериментальная инфекция, антимикробная активность.

Корреспондирующий автор: Охупкина Вероника Юрьевна, e-mail: verona2205@mail.ru

V.Yu.Okhapkina, N.V.Pyatкова, A.K.Fedotov

Method of Accelerated Evaluation of Antimicrobial Preparation Efficacy against Experimental Brucellosis*Affiliated Branch of the 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation*

Objective of the study was to elaborate the method for preliminary accelerated evaluation of antimicrobial preparation efficacy in case of *in vivo* brucellosis. **Materials and methods.** Outbred BALB/c mice with the acute septic experimental brucellosis, caused by intravenous inoculation with sub-lethal doses of the agent, served as biological models. Concurrently with the challenge, animals were given antimicrobial treatment. They took preparations of different types. Further, against the background of antimicrobial therapy, changes of quantitative microbe content in the internal organs of animals were studied, applying bacteriological method. Based on the data obtained index of antimicrobial activity was calculated, according to the value of which, it is possible to rank the drugs under study. **Results and discussion.** Results of preparation potency estimation, received with the help of the developed method, and results obtained after complete standard regimens show high-level correlation dependence (correlation ratio being 0.73), which makes the method suitable for screening of new antimicrobials in reference to brucellosis agent.

Key words: brucellosis, antimicrobial preparations, experimental infection, antimicrobial activity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Veronika Yu. Okhapkina, e-mail: verona2205@mail.ru

Citation: Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K. Method of Accelerated Evaluation of Antimicrobial Preparation Efficacy against Experimental Brucellosis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:79–82. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-79-82

Антибиотики являются ведущим средством этиотропной терапии бруцеллеза. Их использование показано во всех случаях острого, рецидивах и обострениях хронического заболевания [1, 2, 3, 6, 7, 8]. При этом анализ литературы [4, 5, 9, 10, 11] выявляет значительные противоречия данных об эффективности различных антибактериальных препаратов при лечении бруцеллеза, связанные с методическими особенностями проведения испытаний.

Оценка антимикробной активности антибиотиков в отношении конкретного возбудителя традиционно складывается из нескольких этапов. Первичный скрининг препаратов осуществляется обычно с использованием метода диффузии в агар («метода дисков»). В дальнейшем объективность полученных

данных подтверждается при количественном определении величин минимальных подавляющих концентраций препаратов. В то же время результаты определения чувствительности бактериальных культур к антибиотикам *in vitro* зачастую не согласуются с их терапевтической эффективностью *in vivo*. Исходя из этого, достоверная оценка антибиотиков возможна только в опытах по экстренной профилактике и лечению экспериментальной инфекции.

Следует отметить, что экспериментальный бруцеллез лабораторных животных, так же как и заболевание человека в естественных условиях, характеризуется длительным затяжным течением. В связи с этим при оценке терапевтической эффективности антибиотиков *in vivo* исследования характеризуются

достаточно большой продолжительностью во времени. Также значительно возрастает риск проявления в опытах различного рода неучитываемых (случайных) внешних воздействий, которые могут значительно повлиять и даже исказить получаемые результаты.

Указанные обстоятельства определяют необходимость разработки для предварительной оценки эффективности антибактериальных препаратов *in vivo* методов, которые в более короткие сроки позволяют получать исходные данные для последующего окончательного изучения лекарственных средств при проведении полноценных курсов профилактики и терапии.

Материалы и методы

В опыте использовали следующие антибактериальные и химиопрепараты в пределах установленных сроков годности: доксициклин-акос (Россия, Курган, ОАО «Синтез»); рифампицин (Республика Беларусь, Минск, РУП «Белмедпрепараты»); сумамед (азитромицин) (Хорватия, Загреб, «Плива»); абактал (пемфлоксацин) (Словения, Любляна, «Лек»); цефрова (ципрофлоксацин) (Индия, Мумбай, «ЛЮПИН ЛТД»); ломефлоркс (ломефлоксацин) (Индия, Мумбай, «Ипка Лабораториз Лимитед»); спарфло (спарфлоксацин) (Индия, Хайдерабад, «Д-р Реддис»); эфлоркс (левофлоксацин) (Индия, Девас, «Ранбакси Лабораториз Лимитед»); офлорксин (офлоксацин) (Чешская Республика, Прага, «ЗЕНТИВА А.С.»); би-септол (Польша, Пабянице, «Польфа»); амоксилав (амоксициллин + клавулановая кислота) (Словения, Любляна, «Лек»); амикацин-виал (Россия, Москва, ООО «АЛВИС»); оксациллин (Россия, Курган, ОАО «Синтез»). Антибиотики вводили парентерально и перорально согласно прилагаемым инструкциям в дозах, пересчитанных исходя из площади поверхности тела подопытных животных.

Для выделения и накопления культур бруцелл в пробирках и на чашках Петри использовали модифицированную коммерческую сухую среду Эритрит-агар производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России. Общую концентрацию микробных клеток в суспензиях определяли с помощью стандартного образца мутности ОСО 42-28-85П.

Для воспроизведения инфекционного процесса *in vivo* была взята культура высоковирулентного природного изолята *Brucella melitensis* 21, относящегося к 1 биовару своего вида. В качестве биологических моделей при отработке ускоренной методики были использованы аутбредные белые мыши массой от 18 до 22 г обоего пола. С целью получения у мышей острой генерализованной формы инфекционного процесса их заражали внутривенно (в ретробульбарное венозное сплетение) суспензией двухсуточной агаровой культуры бруцелл. Накопление микробов в печени и селезенке оценивали путем посева серийных разведений гомогената органов (печени и селезенки) на плотную питательную среду в чашках Петри, инкубации с последующим подсчетом числа

выросших колоний.

Для оценки эффективности антибиотиков при полных курсах лечения в качестве биологической модели использованы морские свинки обоего пола массой от 250 до 300 г, которых заражали подкожно суспензией двухсуточной агаровой культуры бруцелл. Лечение начинали на 20-е сутки с момента заражения и продолжали в течение 15 сут. Через 30 дней после окончания курсов введения препаратов от животных получали сыворотку для постановки реакции агглютинации и проводили бактериологическое обследование, по результатам которых делали заключение об излечении животных. Реакцию агглютинации ставили общепринятым способом с использованием диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей (ФКУЗ «СтавНИПЧИ»).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал определяли для вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была изучена возможность воспроизведения на лабораторных животных острой генерализованной формы инфекционного процесса при внутривенном заражении сублетальными дозами возбудителя бруцеллеза. В этих условиях происходит быстрая и интенсивная диссеминация микробов, которые минуют естественные защитные барьеры и практически полностью попадают в органы, захватываясь тканевыми макрофагами. Кроме того, изучение активности химиопрепаратов в условиях быстро развивающейся остросептической формы экспериментального бруцеллеза без формирования сенсibilизации организма позволяет осуществить количественную оценку непосредственно антимикробного действия антибиотиков без влияния на их активность других патогенетических механизмов заболевания.

Сравнительное изучение динамики накопления микробов штамма *B. melitensis* 21 во внутренних органах белых мышей, инфицированных внутривенно суспензией агаровой культуры бруцелл в диапазоне доз от 1 до 500 млн микробов по оптической концентрации, позволило остановиться в дальнейшем на дозе в 100 млн м.к., дающей возможность получать наиболее быстрый и воспроизводимый результат. В отсутствие воздействия внешних факторов, численный уровень микробной популяции в печени и селезенке инфицированных мышей в этом случае сохранялся на достаточно стабильных значениях (в среднем $5,6 \pm 1,2$ млн живых микробов в 1 г гомогената органов) на протяжении 20 сут.

В табл. 1 приведены результаты опытов, в ходе которых белым мышам непосредственно после внутривенного инфицирования культурой бруцелл в дозе 100 млн м.к. вводили антибактериальные препараты. Использовали антибиотики разных групп

Таблица 1

Динамика изменения содержания бруцелл в печени и селезенке внутривенно инфицированных мышей в зависимости от кратности введения антибактериальных препаратов ($X \pm I_{95}$, $n=5$)

Антибиотик	Срок наблюдения	Содержание бруцелл в гомогенате органов при введении доз препарата, млн живых микробов			
		0 (контроль)	1	2	3
Доксициклин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	4,6±1,5	-	-
	2 сут	5,0±1,1	1,3±0,4	0,3±0,1	-
	3 сут	6,7±1,3	1,3±0,1	1,2±0,2	0,9±0,3
	4 сут	8,4±2,8	1,2±0,2	0,9±0,2	0,7±0,2
Пефлоксацин	30 мин	13,2±3,1	13,2±3,1	13,2±3,1	13,2±3,1
	1 сут	10,8±2,0	7,9±2,0	-	-
	2 сут	10,2±2,3	5,1±1,2	2,6±1,0	-
	3 сут	8,7±1,9	4,2±1,2	1,3±0,3	0,4±0,1
	4 сут	5,6±1,4	2,9±1,0	2,4±0,8	0,5±0,2
Азитромицин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	6,5±1,9	-	-
	2 сут	5,0±1,1	5,9±1,8	8,7±2,0	-
	3 сут	6,7±1,3	4,7±1,5	6,9±1,7	5,0±1,5
	4 сут	8,4±2,8	5,2±1,6	6,0±1,5	5,6±1,7
Оксациллин	30 мин	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8	12,9±2,8
	1 сут	6,6±1,2	5,8±1,7	-	-
	2 сут	5,0±1,1	7,6±2,1	5,1±1,2	-
	3 сут	6,7±1,3	4,9±1,0	6,0±1,6	5,9±1,5
	4 сут	8,4±2,8	7,8±1,9	6,9±1,8	7,9±2,0

Примечание: «-» – исследование не проводили.

с известной активностью в отношении возбудителя бруцеллеза: высокоэффективные пефлоксацин и доксициклин, малоэффективный азитромицин, неэффективный оксациллин. Препараты животным опытных групп вводили от 1 до 3 дней. Суточные дозы препаратов для мышей составляли: 0,5 мг доксициклина, 3 мг пефлоксацина, 1,25 мг азитромицина, 10 мг оксациллина. Доксициклин и азитромицин вводили 1 раз в сутки, пефлоксацин и оксациллин 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч. В процессе исследования осуществляли контроль динамики накопления микробов в органах животных.

Анализ данных, представленных в табл. 1, указывает на то, что введение антибиотиков оказывает существенное воздействие на накопление бруцелл во внутренних органах внутривенно инфицированных мышей. При этом влияние изученных антибиотиков на величину указанного показателя весьма отличается. Наиболее отчетливые различия в антимикробной активности препаратов удалось получить при их 3-кратном введении и контроле показателя накопления микробов в органах на 4-е сутки.

На следующем этапе исследований в соответствии с описанной методикой была изучена эффективность ряда антибактериальных препаратов из числа отобранных по результатам предварительной положительной оценки их в условиях *in vitro*. В ходе опыта препараты животным вводили в течение 3 дней. Ломефлоксацин, спарфлоксацин, левофлоксацин и доксициклин вводили в суточной дозе 1 раз в сут, ципрофлоксацин, пефлоксацин, офлоксацин, ри-

фампицин, бисептол, амикацин, амоксиклав – 2 раза в сутки с интервалом в 12 ч. Полученные данные представлены в табл. 2.

Для возможности сравнительной характеристики активности изученных антибактериальных препаратов был предложен индекс антимикробной активности, который рассчитывали по формуле:

$$\text{ИАА} = B_k : B_0,$$

где ИАА – индекс антимикробной активности; B_k – содержание микробных клеток в гомогенате органов в контрольной группе к окончанию срока

Таблица 2

Содержание бруцелл в печени и селезенке внутривенно инфицированных мышей после введения различных антибактериальных препаратов ($X \pm I_{95}$, $n=10$)

Антибиотик	Суточная доза препарата, мг	Содержание бруцелл в 1 г гомогената органов, млн живых микробов
Ломефлоксацин	1,0	1,9±0,2
Ципрофлоксацин	2,5	1,2±0,5
Спарфлоксацин	0,5	0,2±0,1
Левофлоксацин	1,25	3,1±0,3
Пефлоксацин	3,0	0,6±0,2
Офлоксацин	2,0	1,5±0,4
Рифампицин	2,25	0,1±0,1
Доксициклин	0,5	0,2±0,2
Бисептол	4,8	0,9±0,2
Амикацин	2,5	0,9±0,3
Амоксиклав	2,5	4,8±0,7
Контроль	0	9,6±1,9

Таблица 3

Результаты оценки антимикробной эффективности антибактериальных препаратов по предлагаемой методике и при проведении полных курсов лечения (n=10–12)

Антибиотик	Индекс антимикробной активности в опытах на мышах	Эффективность при лечении экспериментальной инфекции морских свинок, процент
Ломефлоксацин	5,05	25,0
Ципрофлоксацин	8,00	50,0
Спарфлоксацин	48,00	83,3
Левифлоксацин	3,09	22,2
Пефлоксацин	16,00	75,0
Офлоксацин	6,40	50,0
Рифампицин	96,00	100,0
Доксициклин	48,00	85,0
Бисептол	10,67	60,0
Амикацин	10,67	66,7
Амоксиклав	2,00	17,0

наблюдения; B_0 – содержание микробных клеток в гомогенате органов в опытной группе к окончанию срока наблюдения.

Наибольшие величины данного показателя отмечены для рифампицина, спарфлоксацина и доксициклина (48,00–96,00) и несколько меньше для пефлоксацина (16,00), средние – для бисептола, ципрофлоксацина, офлоксацина и амикацина (от 6,40 до 10,67), минимальные – для ломефлоксацина, левофлоксацина и амоксиклава (от 1,06 до 5,05).

На следующем этапе исследований была проведена оценка эффективности изученных антибиотиков при проведении полноценных курсов лечения экспериментального бруцеллеза. В качестве биологической модели использовали морских свинок, которых заражали подкожно суспензией двухсуточной агаровой культуры штамма *Br. melitensis* 21 в дозе 200 м.к. Лечение начинали через 20 сут после инфицирования. Лечебную эффективность антибактериальных препаратов оценивали по проценту излеченных животных, выявляемых при бактериологическом и серологическом обследовании через 30 сут после окончания курсов введения препаратов.

В табл. 3 представлены обобщенные данные по результатам оценки антимикробной активности антибактериальных препаратов в соответствии с предлагаемой методикой и их терапевтической эффективности при проведении полных курсов лечения экспериментального бруцеллеза.

Величина коэффициента корреляции (0,73) результатов оценки активности препаратов, полученных при использовании методики оценки изменения содержания микробов во внутренних органах на фоне введения антибиотиков и при проведении полных курсов терапии, свидетельствует о высоком уровне корреляционной зависимости.

На основании проведенных исследований можно предложить границы предварительного ранжирования антибиотиков по результатам оценки в соответствии с предложенной методикой: малоэффектив-

ные (ИАА от 1 до 6), среднеэффективные (ИАА от 6 до 12), эффективные (ИАА от 12 и более).

Таким образом, результаты проведенных исследований определяют целесообразность использования предлагаемой методики для предварительной сравнительной оценки антимикробной активности антибиотиков химиопрепаратов в отношении культур возбудителя бруцеллеза.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бунин К.В., Белов Г.Ф. Иммуноантибиотикотерапия рецидивирующих и хронических форм инфекционных болезней. Новосибирск: Наука; 1982. 280 с.
2. Лобзин Ю.В., редактор. Инфекционные болезни: уч. для студентов мед. вузов. СПб.: Фолиант; 2001. 542 с.
3. Лобзин Ю.В., редактор. Руководство по инфекционным болезням. СПб.: Фолиант; 2000. 460 с.
4. Малецкая О.В. Эффективность некоторых новых антибиотиков при лечении экспериментального бруцеллеза. *Антибиотики и химиотерапия*. 2002; 47(11):4–7.
5. Малецкая О.В. Новые подходы к лечению бруцеллеза. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2003; 6:32–5.
6. Elberg S.S. Guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva: WHO; 1985. P. 345–54.
7. Farrel L.D., Robertson L.R. The treatment of brucellosis. *J. Chemother.* 1980; 6:695–97.
8. Hall W.H. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12(6):1060–99.
9. Malik G.M. Early clinical response to different therapeutic regimens for human brucellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(2):190–91.
10. Shehabi A., Shakir K. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.* 1990; 20(1):5–10. DOI: 10.1016/S0163-4453(90)92214-6.
11. Solera J. Treatment of human brucellosis. *J. Med. Liban.* 2000; 48(4):255–63.

References

1. Bunin K.V., Belov G.F. [Immune Antibiotic Treatment of Recurrent and Chronic Forms of Infectious Diseases]. Novosibirsk: Nauka; 1982. 280 p.
2. Lobzin Yu.V., editor. [Infectious Diseases: Textbook for Medical College Students]. St. Petersburg: Foliant; 2001. 542 p.
3. Lobzin Yu.V., editor. [Guidelines on Infectious Diseases]. St. Petersburg: Foliant; 2000. 460 p.
4. Maletskaya O.V. [Potency of certain novel antibiotics in case of experimental brucellosis treatment]. *Antibiot. Khimioterapiya*. 2002; 47(11): 4–7.
5. Maletskaya O.V. [Novel approaches to treatment of brucellosis]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2003; 6:32–5.
6. Elberg S.S. Guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva: WHO; 1985. P. 345–54.
7. Farrel L.D., Robertson L.R. The treatment of brucellosis. *J. Chemother.* 1980; 6:695–97.
8. Hall W.H. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev. Infect. Dis.* 1990; 12(6):1060–99.
9. Malik G.M. Early clinical response to different therapeutic regimens for human brucellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(2):190–91.
10. Shehabi A., Shakir K. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J. Infect.* 1990; 20(1):5–10. DOI: 10.1016/S0163-4453(90)92214-6.
11. Solera J. Treatment of human brucellosis. *J. Med. Liban.* 2000; 48(4):255–63.

Authors:

Okhapkina V.Yu., Pyatkova N.V., Fedotov A.K. Affiliated Branch of the «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610000, Russian Federation.

Об авторах:

Охапкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 610000, г. Киров, Октябрьский проспект, 119.

Поступила 23.07.15.

Е.В.Сазанова, В.Е.Куклев, Т.А.Малюкова, Л.М.Куклева, А.Н.Малахаева, Н.И.Вахрушина

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В УЧЕБНОМ ПРОЦЕССЕ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования. Детекция основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации штаммов возбудителя чумы – кандидатов в учебные. **Материалы и методы.** В работе использовано 18 штаммов *Yersinia pestis*. Исследования проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ»). **Результаты и обсуждение.** В ходе исследования штаммы возбудителя чумы, подобранные в качестве кандидатов в учебные, были охарактеризованы по составу основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации. Работу проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. На основании оценки молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя чумы были выделены генетические варианты, в геноме которых зафиксировали отсутствие одной или нескольких основных детерминант вирулентности, наиболее перспективные для использования с целью снижения биологических рисков обучающих технологий на практических занятиях при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы».

Ключевые слова: ПЦР-анализ, *Yersinia pestis*, учебные штаммы, биологическая безопасность.

Корреспондирующий автор: Сазанова Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Sazanova, V.E.Kuklev, T.A.Malyukova, L.M.Kukleva, A.N.Malakhaeva, N.I.Vakhrushina

Characteristics of Molecular-Genetic Properties of Plague Agent Strains – Promising for Application with Educational Purposes

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Training of specialists in advanced methods of plague laboratory diagnostics and in the safety of works with its agent is associated with the necessity to select strains for educational purposes, allowing for the reduction of risk of laboratory infection at tutorials. Deployment of avirulent strains or those with attenuated virulence is the guiding principle in the case. **Objective** of the study is to detect basic virulence genes of chromosomal and plasmid localization in plague agent strains – candidates to be used for educational purposes. **Materials and methods.** Utilized have been 18 strains of *Yersinia pestis*. Investigations have been carried out with the help of reagent panel for identification of *Y. pestis* strains using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with hybridization-fluorescent registration of results (“Gene *Yersinia pestis* Identification – HFR”). **Results and discussion.** In the course of the study, the strains, selected as the prospective ones, have been characterized by composition of the key virulence genes of chromosomal and plasmid localization. The operation has been performed by means of the reagent panel for identification of *Y. pestis* strains using RT-PCR with hybridization-fluorescent registration of results. Consequently to the assessment of molecular-genetic properties of plague agent strains, distinguished have been genetic variants (the genome of which lacks one or more key virulence determinants) which are the most relevant in the reduction of biological risks of training technologies at tutorials within the frames of the educational course “Microbiology and laboratory diagnostics of plague”.

Key words: PCR-analysis, *Yersinia pestis*, strains used for educational purposes, biological safety.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Sazanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Sazanova E.V., Kuklev V.E., Malyukova T.A., Kukleva L.M., Malakhaeva A.N., Vakhrushina N.I. Characteristics of Molecular-Genetic Properties of Plague Agent Strains – Promising for Application with Educational Purposes. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:83–86. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-83-86

Природные очаги чумы зарегистрированы на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды. На территории стран Содружества Независимых Государств расположено 45 природных очагов чумы, в том числе 11 – в Российской Федерации. По данным ВОЗ, в мире в среднем ежегодно регистрируют около 2000 случаев чумы у людей, часть из которых имеет летальный исход. С 1999 г. по настоящее время в странах ближнего зарубежья (Казахстан, Киргизия) неоднократно фиксировали заболевания людей чумой. В Российской Федерации в 1979 г. заражение человека чумой было зафиксировано в

Республике Калмыкия на фоне резкой активизации Прикаспийского песчаного природного очага чумы, а в сентябре 2014 г. – на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага [2].

Для предупреждения возникновения чумы, а также завоза и распространения из стран ближнего и дальнего зарубежья в Российской Федерации и странах Таможенного союза внедрены и успешно реализуются Международные медико-санитарные правила (ММСП, 2005 г.), являющиеся стандартизирующим инструментом глобальной и национальной готовности к предупреждению и ответным мерам на

чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения. Разработанная методология внедрения ММСП на национальном уровне базируется на преобразовании на инновационной основе организационного, методологического, технологического, материально-технического, кадрового, производственного (МИБП), нормативно-методического обеспечения системы предупреждения, надзора и контроля чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, имеющих национальное и международное значение. При этом одним из актуальных мероприятий является обучение специалистов современным методам лабораторной диагностики чумы и безопасной работы с возбудителем болезни. Вместе с тем национальная концепция обеспечения биологической безопасности определяет необходимость максимального сокращения использования в технологических процессах патогенных микроорганизмов [1, 6]. В сфере снижения биологических рисков обучающих технологий это означает необходимость подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных и применения их при реализации программ дополнительного профессионального образования.

Слушатели курсов при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» проводят исследования на пробах-имитаторах патогенных биологических агентов (ПБА) методами, включенными в регламентированную схему лабораторной диагностики, в том числе биологическим методом [4, 5, 8].

Методические рекомендации по приготовлению проб-имитаторов ПБА предлагают использование штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ [9]. Однако это не позволяет обучающимся изучить биологические свойства всех подвидов возбудителя чумы в полном объеме. Кроме того, используемый вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ при имитации чумы у лабораторных животных не позволяет стабильно получать типичную патоморфологическую картину, а также выделять микроорганизмы при посеве паренхиматозных органов.

Ранее нами были предложены критерии подбора учебных штаммов и определены принципы формирования из них специализированного набора с целью обучения. Основопологающим принципом является использование авирулентных штаммов или штаммов со сниженной вирулентностью [11].

В соответствии с предложенными критериями нами были подобраны 19 штаммов возбудителя чумы – кандидатов в учебные, из числа хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Однако было установлено, что у 72 % штаммов отсутствуют данные о наличии генетических маркеров вирулентности и срок их хранения составляет от 9 до 60 лет. Следовательно, необходимо провести оценку аутентичности штаммов – кандидатов в учебные для получения представления об их вирулентности в настоящий момент.

Цель исследования – охарактеризовать штаммы возбудителя чумы – кандидаты в учебные по составу основных генов вирулентности хромосомной и плазмидной локализации.

Материалы и методы

В работе использовано 18 штаммов *Yersinia pestis*, подобранные согласно выработанным критериям и на основании изученных морфологических, культуральных, биохимических свойств. Из них 13 штаммов выделены на территории природных очагов; 2 штамма – кандидаты в вакцинные, не прошедшие государственные испытания; 2 авторских экспериментальных штамма, входящие в изогенную систему на основе высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231; 1 штамм, резистентный к бактериофагам, применяемым в схеме лабораторной диагностики чумы (таблица). Штаммы *Yersinia pestis* выращивали на агаре Хоттингера, pH 7,2, при температуре (28±1) °C в течение 48 ч.

Исследования проводили с помощью набора реагентов для идентификации штаммов *Y. pestis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ») по следующей программе: 1 цикл – 95 °C 15 мин, затем 10 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с и еще 35 циклов: 95 °C – 20 с, 56 °C – 20 с, 72 °C – 20 с. Флуоресценцию измеряли при 56 °C по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange.

Идентификация чумного микроба с помощью данного набора реагентов основана на одновременной амплификации фрагментов следующих генов: *pla* (плазида pPst), хромосомного локуса *3a*, *cafI* (плазида pFra), *hmsH* (*hms*-локус хромосомной области пигментации) и двух генетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью: *irp2* (остров высокой патогенности) и *lcrV* (плазида pCad).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования у 18 штаммов установлено наличие хромосомного видоспецифичного фрагмента *3a* (таблица), что подтверждало отнесение их к виду *Y. pestis* и соответствовало паспортным данным.

Все изученные с помощью ПЦР штаммы содержали ген *cafI* – маркер плазмиды pFra. Вместе с тем у девяти штаммов выявлено отсутствие плазмиды pPst (гена *pla*), у четырех – плазмиды pCad (гена *lcrV*), у десяти – *ybt*- и/или *hms*-регионов области пигментсорбции острова патогенности (генов *hmsH* и/или *irp2*).

Как известно, видоспецифичная плазида pPst содержит ген *pla*, кодирующий синтез специфических для возбудителя чумы белков: бактериоцина – пестицина и активатора плазминогена. Активатор плазминогена в условиях 37 °C осуществляет инвазию

Характеристика штаммов *Yersinia pestis* с помощью набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ»

Штамм	Генетические маркеры					
	<i>3a</i> (хромосома)	<i>pla</i> (плазмида pPst)	<i>cafI</i> (плазмида pFra)	<i>lcrV</i> (плазмида pCad)	<i>irp2</i> (хромосомный остров патогенности)	<i>hmsH</i> (хромосомный остров патогенности)
<i>Y. pestis</i> 14/44	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 707 Касуга	+	+	+	-	+	+
<i>Y. pestis</i> M-1813	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 7896	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 290 (1499)	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 100P6(36M5)	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 652 «Гризель»	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 780 (K-1)	+	-	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 471 Овсепсика	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> KM 260 (5)	+	+	+	-	+	+
<i>Y. pestis</i> M-1815	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 521 (2101)	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> M-1814	+	+	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 6483 АМО	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> 22 (22)	+	-	+	+	-	-
<i>Y. pestis</i> 835 2 «PBC»	+	-	+	+	+	+
<i>Y. pestis</i> KM- 130 (3)	+	-	+	-	-	-
<i>Y. pestis</i> A-819	+	+	+	-	-	-

тканей теплокровных организмов за счет прикрепления к внеклеточному матриксу, а также разрушает фибриновые пленки, облегчая выход возбудителя из очага воспаления и его дальнейшее распространение. В условиях 28 °С реализуется плазмокоагулязная активность, которая важна для обеспечения специфического трансмиссивного пути передачи возбудителя чумы. Таким образом, продукция плазмиды pPst играет важную роль в патогенезе чумы, но не является основной детерминантой вирулентности [3, 10, 12, 14, 15].

Видоспецифичная плазмида возбудителя чумы pFra кодирует продукцию капсульного антигена (FI), его транспорт на поверхность клетки и сборку капсулы, а также синтез мышинового токсина. Значение FI в патогенезе связано с антифагоцитарными свойствами – противодействием фагоцитозу возбудителя чумы нейтрофилами и моноцитами, но не макрофагами. Наличие этого антигена не всегда коррелирует с вирулентностью, следовательно, он не относится к числу основных факторов вирулентности [3, 10, 12, 14, 15].

Плазмида pCad, которая является общим репликоном для всех патогенных иерсиний, несет одну из главных детерминант вирулентности – ген *lcrV* [7].

Одним из основных генетических детерминант вирулентности хромосомной локализации является ген *irp2*, расположенный в пределах *ybt*-региона острова высокой патогенности [3, 10, 12, 14, 15]. Гены пигментации, или хранения гема, *hms* (5 генов) видоспецифичны. В 1992 г. В.В.Кутыревым и соавт. было показано, что фактор пигментации не имеет значения для вирулентности, но важен для приживания и размножения возбудителя чумы в преджелудке блохи, а

также для образования блока преджелудка. Результаты представлены в диссертационном исследовании.

В ходе ПЦР-анализа определены следующие генетические варианты изученных штаммов возбудителя чумы: pFra⁺pPst⁺pCad⁺Pgm⁻ (6 штаммов); pFra⁺pPst⁺pCad⁻Pgm⁺ (2 штамма); pFra⁺pPst⁻pCad⁺Pgm⁺ (6 штаммов); pFra⁺pPst⁻pCad⁺Pgm⁻ (2 штамма); pFra⁺pPst⁻pCad⁻Pgm⁻ (1 штамм); pFra⁺pPst⁺pCad⁻Pgm⁻ (1 штамм) (таблица).

Однако при анализе полученных результатов у штамма KM130(3) установлено несоответствие генетических характеристик, полученных в результате ПЦР-анализа, и содержащихся в паспорте. Согласно паспорту штамм характеризуется как pCad⁺, а по данным ПЦР – pCad⁻. Для уточнения сведений проведен плазмидный скрининг [13], который подтвердил наличие плазмиды pCad. Причиной, по которой она не была обнаружена при ПЦР-анализе, является делеция фрагмента гена *lcrV*, комплементарного праймерам и зонду в использованном наборе реагентов.

Таким образом, на основании ПЦР-анализа изучаемые штаммы *Y. pestis* были дифференцированы на имеющие детерминанты вирулентности хромосомной (Pgm⁺ – *irp2* и *hmsH*) и плазмидной локализации (pCad⁺) и штаммы, в геноме которых наблюдается отсутствие одной или нескольких детерминант вирулентности.

Для использования в качестве учебных наиболее перспективными являются следующие генетические варианты штаммов: Pgm⁻ (*hmsH*⁻, *irp2*⁻) pCad⁺ (*lcrV*⁺) или Pgm⁺ (*hmsH*⁺, *irp2*⁺) pCad⁻ (*lcrV*⁻).

Однако наличие детерминант вирулентности не позволяет дать окончательную характеристику виру-

лентности штаммов. Регламентированный подход к оценке вирулентности штаммов возбудителя чумы, включает комплексное исследование *in vitro*, а также *in vivo* на лабораторных животных. В связи с тем, что многие из исследованных штаммов имеют срок хранения в ГКПБ более 9 лет, целесообразно провести контроль их вирулентности с помощью методов, регламентированных действующими нормативно-методическими документами (определить вирулентность *in vitro*, установить LD₅₀, оценить патоморфологическую картину чумы, развивающуюся при заражении ими лабораторных животных), а также оценить стабильность выделения возбудителя из паренхиматозных органов.

Таким образом, на основании ПЦР-анализа из исследованной группы штаммов *Y. pestis* отобраны генетические варианты, в геноме которых наблюдается отсутствие одной или нескольких основных детерминант вирулентности. Для оценки степени вирулентности конкретных штаммов необходимо установить LD₅₀ для лабораторных животных, а также определить вирулентность *in vitro* регламентированными методами. Штаммы, отнесенные к группам авирулентных (LD > 10⁵ м.к.) и слабовирулентных (LD > 10⁶ м.к.), сформируют группу наиболее перспективных для использования в качестве учебных с целью снижения биологических рисков обучающих технологий на практических занятиях при освоении учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы».

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Концепция Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации. http://fcgie.ru/DOC/170712/post_74r.pdf (дата обращения 11.03.2016 г.).
2. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4: 9–16.
3. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Y. pestis*. *Пробл. особо опасных инф.* 1998; 78:11–22.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. 2-е изд. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: МУ 3.1.3.2355-08. М., 2009. 103 с.
6. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу. <http://docs.cntd.ru/document/499057916> (дата обращения 11.03.2016 г.).
7. Попов Ю.А., Проценко О.А., Анисимов П.И., Кокушкин А.М., Можаров О.Т. Обнаружение плазмид пестициногенности чумного микроба методом электрофореза в агарозном геле. В кн.: Профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1980. С. 20–25.
8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2940-11. М., 2011. 55 с.
9. Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов: МУ 4.2.1103-02. М., 2002.
10. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т., Коннов Н.П., Попов Ю.А., Кокушкин А.М. Выявление и характеристика плазмид чумного микроба, детерминирующих синтез пестицина I, антигена фракции I и экзотоксина «мышинного» токсина. *Генетика*. 1983; 19(7):1081–90.
11. Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:38–41.
12. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*. 2002; 296:733–35. DOI: 10.1126/science.1069972.
13. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (3):1365–73.
14. Kutyrev V.V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67:1359–67.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

References

1. [Conception of the Federal Target Program “National system of chemical and biological safety of the Russian Federation”]. (Cited 11 Mar 2016). Available from: http://fcgie.ru/DOC/170712/post_74r.pdf.
2. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
3. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular-genetic investigations of *Yersinia pestis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1998; 78:11–22.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases: practice guidelines. 2nd edition]. M.: “Shiko”; 2013. 560 p.
5. [Organization and carrying out of epidemiological surveillance in the natural plague foci in the territory of the Russian federation]. MR 3.1.3.2355-08. M.; 2009. 103 p.
6. [Basic Principles of the State Policy in the provision of chemical and biological safety of the Russian Federation for the period until 2025 and prospective further on]. (Cited 11 Mar 2016). Available from: <http://docs.cntd.ru/document/499057916>.
7. Popov Yu.A., Protsenko O.A., Anisimov P.I., Kokushkin A.M., Mozharov O.T. [Detection of pesticinogenicity plasmids in plague microbe using agarose gel electrophoresis]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1980. P. 20–5.
8. [Procedure of organization and carrying out of laboratory diagnostics of plague for the territorial, regional, and federal facilities]. MR 4.2.2940-11. M.; 2011. 55 p.
9. [Preparation of samples with surrogates of pathogenic biological agents]. MR 4.2.1103-02. M.; 2002.
10. Protsenko O.A., Anisimov P.I., Mozharov O.T., Konnov N.P., Popov Yu.A., Kokushkin A.M. [Detection and characteristics of plague microbe plasmids, determining synthesis of pesticin I, antigen fraction I, and exotoxin of “murine toxin”]. *Genetika*. 1983; 19(7):1081–90.
11. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Dummy *Yersinia pestis* strains: selection criteria, usage guidelines]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:38–41.
12. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*. 2002; 296:733–35. DOI: 10.1126/science.1069972.
13. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145 (3):1365–73.
14. Kutyrev V.V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67:1359–67.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

Authors:

Sazanova E.V., Kuklev V.E., Malyukova T.A., Kukleva L.M., Malakhaeva A.N., Vakhruzhina N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сазанова Е.В., Куклев В.Е., Малукова Т.А., Куклева Л.М., Малахаева А.Н., Вахружина Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 26.08.15.

Ю.В.Сизова, Р.В.Писанов, О.С.Бурлакова, И.Я.Черепяхина, В.В.Балахнова

РОЛЬ КАДАВЕРИНА В АДАПТАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К СТРЕССУ, ОБУСЛОВЛЕННОМУ ГИПОКСИЕЙ*ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

Цель. Изучение роли кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу, обусловленному гипоксией. **Материалы и методы.** В работе использовано 18 штаммов *V.cholerae* с различным набором детерминант патогенности, выделенные от больных и из речной воды. **Результаты и выводы.** Показано, что при экспериментальном моделировании газовой среды кишечника, холерные вибрионы реагируют на неблагоприятные условия окружающей среды путем продукции кадаверина. При этом его количество коррелирует с патогенностью культур (оно выше у эпидемически значимых штаммов, чем у штаммов, лишенных генов токсина и пилепродукции). Установлено, что уровень продукции внеклеточного кадаверина выше, чем внутриклеточного, но соотношение этих показателей зависит от концентрации кислорода и углекислоты в окружающей среде. Внутриклеточный кадаверин образуется, в основном, при условии высокой концентрации кислорода (10–12 %), при выраженной гипоксии (<1 % O₂) и повышении уровня углекислого газа (9–13 %) его количество резко снижается.

Ключевые слова: полиамины, кадаверин, холерный вибрион, персистенция, адаптация, гипоксия.

Корреспондирующий автор: Сизова Юлия Владимировна, e-mail: E-mail: plague@aanet.ru.

Yu.V.Sizova, R.V.Pisanov, O.S.Burlakova, I.Ya.Cherepakhina, V.V.Balakhnova

The Role of Cadaverine in Cholera Vibrio Adaptation to Stress Conditions, Induced by Hypoxia*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

Objective of the study is to evaluate the role of cadaverine in cholera vibrio adaptation to stress, induced by hypoxia. **Materials and methods.** Utilized have been 18 *V. cholerae* strains with different set of pathogenicity determinants. The strains are isolated from patients and from river-water. **Results and conclusions.** It is demonstrated that under experimental modeling of intestinal tract gas medium, cholera vibrios respond to unfavorable conditions of the environment by producing cadaverine. Its amount coincides with pathogenicity of cultures (it is higher in epidemically significant strains, than in the strains that lack genes of toxin and pilus production). It is established that the level of extracellular cadaverine production is greater than that of intracellular; but correlation of the parameters depends upon the oxygen and carbon dioxide concentration in the environment. Intracellular cadaverine is mainly generated at a high oxygen concentration (10–12 %); while under extreme hypoxia (<1 % O₂) and in case of carbon dioxide level increase (9–13 %), its production markedly declines.

Key words: polyamines, cadaverine, cholera vibrio, persistence, adaptation, hypoxia.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Yulia V. Sizova, e-mail: E-mail: plague@aanet.ru.

Citation: Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Burlakova O.S., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V. The Role of Cadaverine in Cholera Vibrio Adaptation to Stress Conditions, Induced by Hypoxia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:87–90. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-87-90

Проблема адаптации микроорганизмов к стрессу является одной из наиболее актуальных в современной микробиологии. Доказано, что воздействие неблагоприятных факторов способствует формированию у микроорганизмов универсальных механизмов защиты. В качестве таких неспецифических адаптогенов, принимающих участие в процессе приспособления разнообразных организмов (от бактерий до растений и млекопитающих) к неблагоприятным условиям среды, некоторые авторы рассматривают полиамины, которые могут быть вовлечены в различные физиологические процессы, включая регуляцию экспрессии генов, трансляцию, пролиферацию клеток, модуляцию сигнализации клетки, стабилизацию мембран [7, 8]. Энергетические сигналы стресса воспринимаются ферментами синтеза полиаминов в клетке, что приводит к возрастанию концентрации этих соединений.

Известно, что полиамины – это большая группа низкомолекулярных азотсодержащих соединений, образующихся при декарбоксилировании аминокислот в кислой среде (кадаверин – из лизина, путресцин – из орнитина, агматин – из аргинина и т.д.), они представляют собой короткие углеводородные цепочки, состоящие из 4–10 углеродных атомов, которые содержат от 2 до 4 аминогрупп. Важнейшие из них, содержащиеся во всех живых клетках, – кадаверин [NH₂(CH₂)₅NH₂], путресцин [NH₂(CH₂)₄NH₂], спермидин [NH₂(CH₂)₄-NH(CH₂)₃NH₂] и спермин [NH₂(CH₂)₃NH-(CH₂)₄-NH(CH₂)₃NH₂] – являются универсальными, полифункциональными молекулами [3].

Показано влияние полиаминов на устойчивость условно-патогенных бактерий (*E. coli*, *P. aeruginosa* и др.) к окислительному, кислотному, тепловому и другим видам стресса за счет их антиоксидантных

свойств [2], а также за счет способности ингибировать проницаемость пориновых каналов клеточной стенки, как бы обособливая микробную клетку от вредного окружения с помощью полиаминов [3, 5, 6].

Сведения о продукции полиаминов при стрессовом воздействии на возбудителя холеры в литературе практически отсутствуют. Одним из видов стресса на холерные вибрионы в кишечнике человека является резкое изменение газового состава среды обитания. В желудочно-кишечном тракте человека содержится около 200 мл различных газов, среди которых кислород составляет 0–12 %, углекислый газ – 6–13 %. Концентрация кислорода при переходе от тонкого к толстому кишечнику постепенно снижается за счет всасывания с 21 до 1 % и ниже, а углекислоты, напротив, повышается с 6 до 13 % и выше [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния газовой среды обитания на продукцию холерными вибрионами одного из основных полиаминов – кадаверина, являющегося одним из индикаторов стрессового ответа.

Материалы и методы

В работе использовано 14 штаммов *V. cholerae* El Tor, 2 – *V. cholerae* classical, 2 – *V. cholerae* O139, имеющих различный набор детерминант патогенности, выделенных от больных и из речной воды.

Для проведения опыта в бульон Мартена вносили взвеси суточных агаровых культур холерных вибрионов и культивировали в течение 4 сут при 37 °С в микроаэрофильных условиях – в эксикаторе (10–12 % O₂ и 5 % CO₂ – имитация газовой среды тонкого отдела кишечника – I вариант) и в анаэробе с газ-пакетами AnaeroGen, обеспечивающими газовый состав с содержанием кислорода не более 1 % и CO₂ 9–13 % (как в толстом отделе кишечника – II вариант).

Продукцию кадаверина определяли по методике S.Cortacero-Ramirez *et al.* [4] с нашими модификациями (патент RU 2566558). Для определения внутриклеточного и внеклеточного кадаверина полученные бульонные культуры холерных вибрионов после инкубации центрифугировали, супернатанты переносили в отдельные пробирки, а к осадку добавляли 150 мкл дистиллированной воды. К обеим пробам добавляют 50 мкл 200 мМ раствора гидрокарбоната натрия. В качестве контрольного компонента использовали FITC-дериваты коммерческого кадаверина (производство фирмы «Sigma») в концентрации 1 мг/мл. Полученные смеси, в том числе и контрольную, прогревали при 99 °С в течение 30 мин в твердотельном термостате «Термит» и вносили в них 100 мкл 10 мМ раствора FITC в 80 % ацетоне и 200 мкл 50 % ацетона, после чего пробы инкубировали 2 ч в термостате «Гном» при температуре 50 °С. Далее добавляли во все пробы 500 мкл деионизированной воды, перемешивали и центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин.

Полученные пробы исследовали в системе ка-

пиллярного электрофореза Backman. Результаты выводились в виде электрофореграммы: при подаче напряжения в систему FITC-кадаверин достигал зоны детекции и регистрировался в виде пика свечения 520 нм при длине возбуждения 488 нм аргонным лазером. Полученные с помощью электрофореграмм цифровые выражения пиков опытных и контрольных образцов позволяли определять количество продуцируемого кадаверина у исследуемых штаммов холерных вибрионов по формуле:

$$C = \frac{Po \cdot Ck}{Pк},$$

где C – концентрация кадаверина исследуемого штамма холерных вибрионов, мкг/мл; Cк – концентрация кадаверина в контрольной пробе, мкг/мл; Po – цифровое выражение пика опытного образца; Pк – цифровое выражение пика контрольного образца.

Все результаты статистически обработаны.

Результаты и обсуждение

При варьировании газовой среды, соответствующей ее составу по кислороду и углекислому газу в кишечнике (как в I, так и во II варианте), холерные вибрионы Эль Тор образовывали как внутриклеточный, так и внеклеточный кадаверин в значительном количестве. При этом средние суммарные показатели продукции этого полиамина в I варианте (имитирующем тонкий кишечник, в котором происходят все основные события патогенеза холеры) оказались несколько выше, чем во II варианте (имитирующем толстый кишечник) – 1156,6 мкг/мл против 974,25.

Обращает на себя внимание снижение значений суммарной продукции кадаверина в каждой из групп вибрионов Эль Тор по мере снижения эпидемической значимости: в I варианте – с 453,2 мкг/мл у ctx⁺tcp⁺ и 425 мкг/мл у ctx⁺tcp⁺ штаммов до 277,0 мкг/мл у ctx⁺tcp⁺ штаммов (39 и 35 % соответственно); во II варианте концентрация кадаверина снижалась меньше от 345,6 и 333,4 мкг/мл до 295,25 мкг/мл (на 15 и 11 % соответственно).

Классические холерные вибрионы, представленные двумя токсигенными штаммами, по активности не уступали холерным вибрионам Эль Тор из такой же группы ctx⁺tcp⁺ штаммов: суммарное значение при культивировании в I варианте составило 450,0 мкг/мл и 383,2 мкг/мл – во II.

Максимальным суммарным значением характеризовался токсигенный штамм O139 серогруппы (502,0 и 481,0 мкг/мл), показания у атоксигенного штамма были гораздо ниже, особенно в I варианте (всего 61,0 мкг/мл).

При этом обращает на себя внимание, что у всех штаммов с генотипом ctx⁺tcp⁺ и ctx⁺tcp⁺ (Эль Тор, классических и O139) суммарные значения показателей продукции кадаверина в I группе были выше, чем во II, то есть для патогенных и потен-

циально патогенных вибрионов стрессом, вероятно, являлась более высокая концентрация кислорода (10–12 %); у авирулентных штаммов (ctx⁻tcp⁻) Эль Тор и O139, напротив, значения во II группе были выше, чем в I, то есть для этих штаммов более стрессовыми были условия высокой концентрации углекислоты (12–13 %).

При ранжировании штаммов вибрионов Эль Тор по источнику выделения суммарные показатели уровней продукции кадаверина в группах выглядели следующим образом (таблица).

Показатели кадаверина в группах отличались незначительно. Несколько более высокие показатели суммарной продукции кадаверина (как в I, так и во II варианте) отмечены в группе штаммов, выделенных от вибрионосителей (431 и 443,7 мкг/мл). Для сравнения: от больных – 377,8 и 316,3 мкг/мл; из воды – 365,3 и 274,2 мкг/мл. При этом установлено, что такие высокие показатели продукции кадаверина в группе носителей обусловлены одним ctx⁻tcp⁺ штаммом *V. cholerae* El Tor (488 и 520 мкг/мл). Является ли этот результат характерным для всей группы ctx⁻tcp⁺ штаммов, выделенных на протяжении последних десяти лет от носителей, предстоит выяснить впоследствии, хотя (судя по данным, полученным при изучении таких же изолятов от больных и из воды) не исключено, что речь может идти об индивидуальных особенностях некоторых штаммов. Если не принимать во внимание результаты, полученные при исследовании этой культуры, можно констатировать, что при ранжировании штаммов по источнику выделения внутри каждой группы наблюдалась та же динамика снижения продукции кадаверина в зависимости от степени патогенности штаммов (от больных: с 470,5 до 246 мкг/мл в I группе, с 350 до 298 – во II; от носителей: с 404 до 401 мкг/мл в I группе, с 442 до 369 мкг/мл – во II; из воды: с 460,5 до 230,5 в I группе, с 293 до 257 мкг/мл – во II).

Установлено, что суммарный уровень продукции кадаверина в обоих вариантах опыта у всех штаммов

холерных вибрионов, выделенных из организма человека (больного или носителя), был несколько выше, чем у водных штаммов, что свидетельствует о более эффективном использовании данной защитной системы в организме человека именно такими штаммами.

При анализе продукции внутриклеточного и внеклеточного кадаверина в разных условиях опытов наблюдалось преобладание внеклеточного кадаверина, но в разной степени. В экспериментах, имитирующих газовую среду тонкого кишечника (I вариант – 10–12 % O₂, 5 % CO₂), суммарное среднее количество внутриклеточного кадаверина составляло 456,7 мкг/мл, внеклеточного – 698,9 мкг/мл, (соотношение 1:1,5), то есть разница в продукции кадаверина незначительная. Мы ранее в этой работе предположили, что эти условия могут быть достаточно стрессовыми для холерных вибрионов, поскольку ни в толстом кишечнике, ни в водных объектах окружающей среды нет такой высокой концентрации кислорода. В ответ на стресс происходит синтез полиаминов, которые защищают холерные вибрионы как путем заполнения пориновых каналов (внутриклеточный кадаверин), так и путем изоляции клеток от вредного окружения (внеклеточный кадаверин), способствуя тем самым сохранению популяции возбудителя и развитию патологического процесса в тонком кишечнике.

Совершенно другая картина наблюдалась при моделировании условий газовой среды в толстом кишечнике (II вариант – 1 % O₂, 9–13 % CO₂). При низкой концентрации кислорода и высокой углекислоты газа соотношение внутриклеточного и внеклеточного кадаверина составляло уже 1:4, то есть приоритетной была продукция внеклеточного кадаверина, необходимого для внешней защиты клеток вибрионов. Возможно стрессором в данной модели опыта служила именно повышенная концентрация CO₂.

Таким образом, при экспериментальном моделировании газовой среды кишечника, в котором осуществляется развитие патологического процесса (адгезия, колонизация, токсинопродукция), показано,

Продукция кадаверина холерными вибрионами Эль Тор, выделенными из различных источников

Источник выделения	Наличие генов		Культивирование в условиях эксикатора (10 % O ₂ , 5 % CO ₂) I вариант (кадаверин)			Культивирование в условиях газ-пакета (1 % O ₂ , 12 % CO ₂) II вариант (кадаверин)		
			внутриклеточный, мкг/мл	внеклеточный, мкг/мл	сумма	внутриклеточный, мкг/мл	внеклеточный, мкг/мл	сумма
Больные	+	+	189,5	281,0	470,5	16,5	333,5	350,0
	-	+	144,5	270,0	414,5	29,0	272,0	301,0
	-	-	101,0	145,0	246,0	46,0	252,0	298,0
Среднее по группе			145,0	232,0	377,0	30,5	285,8	316,3
Носители	+	+	154,0	250,0	404,0	176,0	266,0	442,0
	-	+	221,0	267,0	488,0	151,0	369,0	520,0
	-	-	149,0	252,0	401,0	94,0	275,0	369,0
Среднее по группе			174,7	256,3	431,0	140,3	303,3	443,7
Вода	+	+	181,5	279,0	460,5	34,0	259,0	293,0
	-	+	180,0	225,0	405,0	53,5	219,0	272,5
	-	-	82,0	148,5	230,5	22,0	235,0	257,0
Среднее по группе			147,8	217,5	365,3	36,5	237,7	274,2

что холерные вибрионы реагируют на неблагоприятные условия окружающей среды путем продукции кадаверина, одного из полиаминов, являющихся неспецифическими антистрессовыми адаптогенами.

При этом количество продуцируемого кадаверина в определенной степени коррелирует с патогенностью культур (оно выше у эпидемически значимых и потенциально эпидемически значимых штаммов, чем у штаммов, лишенных генов токсино- и пиле-продукции).

Установлено, что при использовании обеих моделей газовой среды кишечника уровень продукции внеклеточного кадаверина выше, чем внутриклеточного, но соотношение этих показателей зависит от концентрации кислорода и углекислоты в окружающей среде. В условиях газовой среды тонкого кишечника (10–12 % O₂, 5 % CO₂) оно практически равно (1:1,5), в условиях толстого кишечника (1 % O₂, 10–12 % CO₂) преобладает синтез внеклеточного кадаверина (соотношение 1:4).

Внутриклеточный кадаверин, «запечатывающий» пориновые каналы микробных клеток, образуется, в основном, при условии высокой концентрации кислорода (10–12 %), при выраженной гипоксии (<1 % O₂) и повышении уровня углекислого газа (9–13 %) его количество резко снижается.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутурова Л.И. Синдром избыточного газообразования при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. <http://www.disbak.ru/php/content.php?id=1446> (дата обращения 20.06.2015 г.).
2. Ткаченко А.Г., Федотова М.В. Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от стрессорных воздействий супероксидных радикалов. *Биохимия*. 2007; 72(1):128–36.
3. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: УрО РАН; 2012. 267 с.
4. Cortacero-Ramirez S., Arrarez-Romarn D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Determination of biogenic amines in

beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100:383–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.037.

5. De la Vega A.L., Delcour A.H. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO J*. 1995; 14:6058–65. PMC394726.

6. De la Vega A.L., Delcour A.H. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol*. 1996; 178:3715–21. PMC232627.

7. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228:367–81. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7.

8. Rhee J.Y., Lee S.H., Singh A.P., Chung G.C., Ahn S.J., Detoxification of hydrogen peroxide maintains the water transport activity in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) root system exposed to low temperature. *Physiol. Plant*. 2007; 130(2):177–84. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00895.x.

References

1. Buturova L.I. [Syndrome of excessive gas in case of gastrointestinal diseases]. [Cited 20 Jun 2015]. Available from: <http://www.disbak.ru/php/content.php?id=1446>.
2. Tkachenko A.G., Fedotova M.V. [The correlation between protective functions of *Escherichia coli* polyamines and stress effects of super-oxide radicals]. *Biokhimiya*. 2007; 72(1):128–36.
3. Tkachenko A.G. [Molecular Mechanisms of Stress Responses in Microorganisms]. Yekaterinburg: Ural Branch of RAS; 2012. 267 p.
4. Cortacero-Ramirez S., Arrarez-Romarn D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*. 2007; 100:383–9. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.037.
5. De la Vega A.L., Delcour A.H. Cadaverine induces closing of *E. coli* porins. *EMBO J*. 1995; 14:6058–65. PMC394726.
6. De la Vega A.L., Delcour A.H. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol*. 1996; 178:3715–21. PMC232627.
7. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228:367–81. DOI: 10.1007/s00425-008-0772-7.
8. Rhee J.Y., Lee S.H., Singh A.P., Chung G.C., Ahn S.J., Detoxification of hydrogen peroxide maintains the water transport activity in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*) root system exposed to low temperature. *Physiol. Plant*. 2007; 130(2):177–84. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00895.x.

Authors:

Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Burlakova O.S., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Бурлакова О.С., Черепяхина И.Я., Балахнова В.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 29.06.15.

А.Н.Спицын, Д.В.Уткин, Н.Е.Щербакова, С.А.Портенко, А.С.Абдрашитова, И.А.Кас'ян,
В.Г.Германчук, В.Е.Куклев

MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», Саратов, Российская Федерация

Цель. Продемонстрировать целесообразность создания базы данных референсных масс-спектров возбудителей особо опасных инфекций методом MALDI-TOF масс-спектрометрии на примере штаммов возбудителей чумы. **Материалы и методы.** В работе использовался метод MALDI-TOF масс-спектрометрии для получения масс-спектров рибосомальных белков исследуемых микроорганизмов с помощью масс-спектрометров Microflex LT. **Результаты и выводы.** Проведено сравнение полученных масс-спектров 10 штаммов *Y. pestis* с референсными спектрами *Y. pseudotuberculosis* коммерческой базы данных MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Германия). Произведено апробирование базы данных при проведении идентификации штаммов чумного микроба, выделенных из природных очагов чумы на территории Российской Федерации в 2012 и 2014 гг. Разработанная база данных позволяет осуществлять идентификацию штаммов *Y. pestis* до вида.

Ключевые слова: *Y. pestis*, MALDI-TOF масс-спектрометрия, база данных, идентификация, референсные масс-спектры.

Корреспондирующий автор: Спицын Алексей Николаевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.N.Spitsyn, D.V.Utkin, N.E.Shcherbakova, S.A.Portenko, A.S.Abdrashitova, I.A.Kas'yan, V.G.Germanchuk, V.E.Kuklev

MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study was to demonstrate practicability of data base creation, containing reference mass-spectra of agents of particularly dangerous infections, using MALDI-TOF mass-spectrometry, by the example of plague agent strains. **Materials and methods.** MALDI-TOF mass-spectrometry was deployed for the obtainment of mass-spectra of ribosomal proteins from the microorganisms under investigation with the help of mass-spectrometers – Microflex LT. **Results and conclusions.** Carried out was comparative analysis of the obtained mass-spectra of 10 *Y. pestis* strains and reference spectra of *Y. tuberculosis*, contained in commercial data base of MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Germany). Developed data base was validated in the process of identification of plague microbe strains, isolated in the territory of natural plague foci of the Russian Federation. That data base provided for correct identification of *Y. pestis* strains up to a species.

Key words: MALDI-TOF mass-spectrometry, database, identification, reference mass-spectra.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksey N. Spitsyn, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Spitsyn A.N., Utkin D.V., Shcherbakova N.E., Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Kas'yan I.A., Germanchuk V.G., Kuklev V.E. MALDI-TOF Mass-Spectrometry Analysis of Plague Agent Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:91–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-91-94

В последнее время широкое распространение в идентификации микроорганизмов получил метод времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Масс-спектрометрия – метод исследования и анализа вещества, основанный на ионизации атомов и молекул, входящих в состав исследуемого образца, и регистрации спектра масс образовавшихся ионов. Полученный спектральный паттерн (белковый профиль) является уникальной родо-, видо-, а в некоторых случаях штаммоспецифичной характеристикой, которая позволяет идентифицировать микроорганизм до рода, вида и иногда осуществить подвидовую дифференциацию.

Высокая точность идентификации микроорганизмов с помощью данного метода, основанного на анализе белкового состава микроорганизмов, была отмечена многими исследователями [3, 4, 5, 6]. Применение метода прямого белкового профили-

рования позволяет сократить время идентификации выделенных культур микроорганизмов (до 2 ч) по сравнению с общепринятыми методиками (6–48 ч), а также снижает стоимость исследований и увеличивает пропускную способность лаборатории [1, 2, 7]. Одним из необходимых условий достоверной видовой дифференциации является наличие достаточной масс-спектрометрической базы данных белковых профилей микроорганизмов.

При идентификации микроорганизмов на MALDI-TOF масс-спектрометрах Microflex в работе используют коммерческие базы данных (MALDI Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Германия). Однако в коммерческой базе данных программы MALDI Biotyper 3.1, поставляемой в Российскую Федерацию, отсутствуют референсные спектры возбудителей опасных инфекционных болезней, в частности, микроорганизмов вида *Yersinia pestis*. Цель данной работы заключалась в дополнении существующей базы данных спектрами

штаммов *Y. pestis* для использования в дальнейшем при идентификации чумного микроба методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для решения данной проблемы специалистами учреждений Роспотребнадзора ведется работа по созданию библиотек и баз данных спектров штаммов *Y. pestis*.

Материалы и методы

В работе использовали 25 штаммов *Y. pestis*, выделенных в период с 1970 по 2014 год в различных природных очагах чумы, из них 10 штаммов – для создания референсных масс-спектров (таблица) и 15 штаммов – при апробации созданной базы данных в ходе идентификации штаммов чумного микроба. Штаммы *Y. pestis* из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» являются типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и молекулярно-генетическим свойствам. Штаммы чумного микроба для получения масс-спектров культивировали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 24–48 ч.

Методика масс-спектрометрического анализа

Для создания референсных масс-спектров (MSP) возбудителей особо опасных инфекционных болезней и внесения их в базу данных используют белковые экстракты исследуемых культур микроорганизмов. Белковую экстракцию проводили с использованием 96 % этанола и 70 % водного раствора муравьиной кислоты по стандартной методике, рекомендованной Bruker для проведения MALDI-TOF прямого белкового профилирования неспорообразующих микроорганизмов.

Полученный супернатант (1 мкл), содержащий белковый экстракт, наносили на ячейку 96-луночного MSP-чипа (MSP 96 target polished steel BC, microScout Target). На поверхность супернатанта в чипе наносили 1 мкл раствора матрицы (насыщенный раствор α -Циано-4-гидроксикоричной кислоты (α -HCCA) с 50 % содержанием ацетонитрила и 2,5 % трифторук-

сусной кислоты (TFA)) и высушивали при комнатной температуре.

Чип с нанесенными на него образцами помещали в MALDI-TOF масс-спектрометр microflex LT. После позиционирования чипа в ионизационной камере и достижения необходимых значений рабочих параметров прибора проводили калибровку с помощью нанесенного калибровочного стандарта. После этого приступали к сбору спектров в ручном или автоматическом режиме, устанавливая необходимые параметры. Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц). Анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000–20000 Да.

Для штаммов *Y. pestis* сбор спектров проводили по следующей схеме: с 8 ячеек MSP-чипа (для каждого штамма) были получены 24 исходных масс-спектра. В программе flexAnalysis (Bruker Daltonics) проводилась оценка качества исходных масс-спектров, сглаживание, выравнивание и вычет фоновой линии. Далее в программе «MALDI Biotyper 3.1 (Offline classification)» из отобранных исходных масс-спектров были созданы референсные масс-спектры. Для создания референсного масс-спектра одного штамма необходимо не менее 20 исходных.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного масс-спектрометрического анализа были получены референсные масс-спектры десяти штаммов возбудителя чумы *Y. pestis* (таблица). В ходе проведения эксперимента исследуемые типичные штаммы *Y. pestis* с использованием референсных масс-спектров, содержащихся в базе данных программы MALDI Biotyper 3.1, были идентифицированы как микроорганизмы вида *Y. pseudotuberculosis*. При построении MALDI-TOF дендрограммы масс-спектров в программе Biotyper по алгоритму метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (англ. Unweighted Pair Group

Штаммы *Y. pestis*, используемые для создания референсных масс-спектров

Название штамма	Место выделения	Природный очаг	Дата выделения
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> M-1773 [1047 Аст.]	Астраханская область, Красноярский район	Волго-Уральский песчаный	17.05.2002
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> M-1864 (883-Аст)	Республика Калмыкия, Лаганский район	Прикаспийский песчаный	16.04.2009
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> M-978 [1109 Астр.]	Калмыкская АССР, Юстинский район, Черные земли	Прикаспийский Северо-Западный степной	14.04.1990
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>caucasica</i> C-740 [494]	Республика Дагестан, Кулинский район, с. Хозрек	Восточно-Кавказский высокогорный	08.06.1998
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> C-627 [176 КБ]	Карачаево-Черкесская Республика, г. Кызыл-Кала	Центрально-Кавказский высокогорный	28.08.1986
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> A-1809	Урочище Карагайлы (долина реки Беш-Таш) Таласского хребта Тянь-Шаня	Таласский высокогорный	28.08.1980
<i>Y. pestis</i> A-1815 [257/17]	Таласский район, урочище Карагайлы	Таласский высокогорный	06.09.1980
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>ulegeica</i> KM-684 (И-2422)	МНР, Баян-Улэгэйский аймак, г. Цаган-Нур		27.06.1974
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>altaica</i> И-2998 [62]	Республика Алтай, Кош-Агачский район, Кызыл-Тас	Горно-Алтайский высокогорный	27.08.1982
<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i> 1116-Д	Малгобекский эпидотряд, 5 км севернее с. Ачалуки	Терско-Сунженский низкогорный	23.06.1970

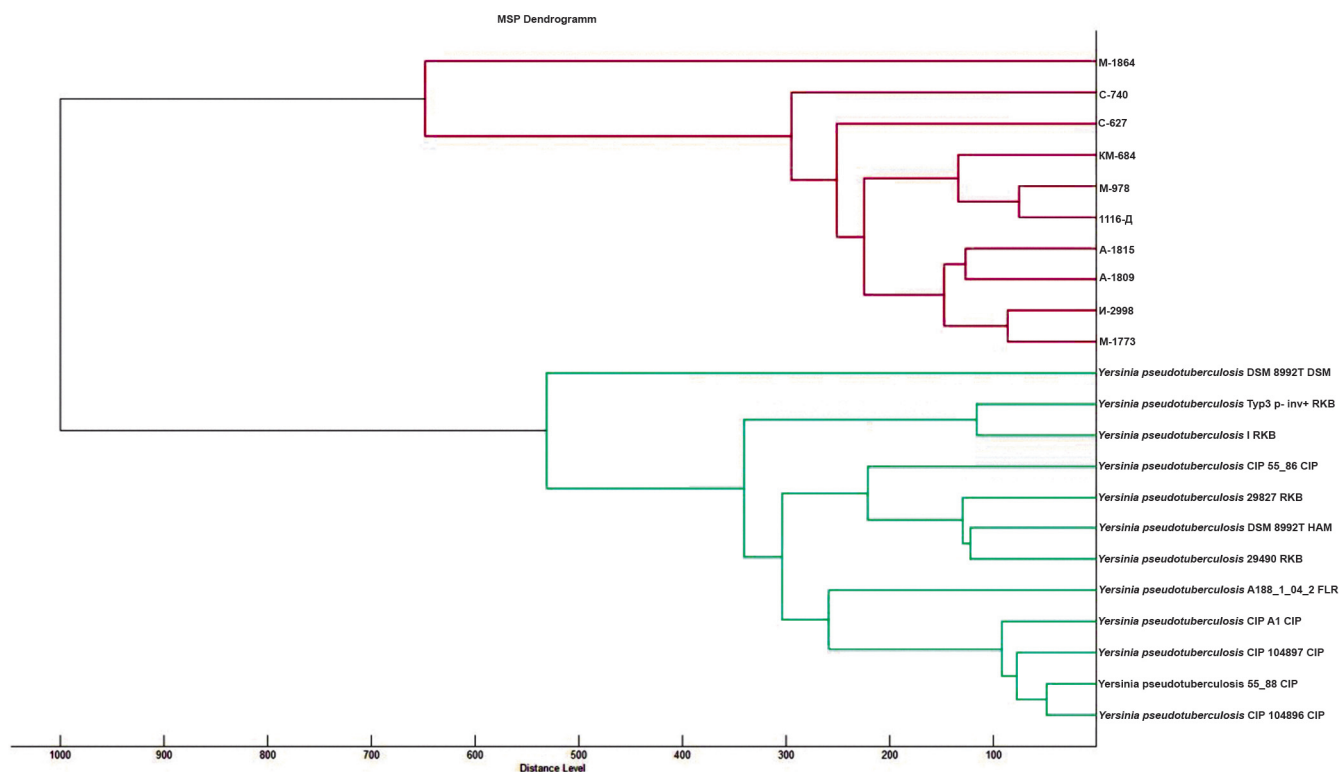


Рис. 1. Кластерный анализ MALDI-TOF-MS спектров штаммов *Y. pseudotuberculosis*, содержащихся в базе данных программы MALDI Biotyper 3.1 и вносимых в базу данных штаммов возбудителя *Y. pestis*. Расстояние отображается в относительных единицах

Method with Arithmetic Mean, UPGMA) было установлено, что исследуемые штаммы микроорганизмов

вида *Y. pestis* и вида *Y. pseudotuberculosis* кластеризуются двумя четко различимыми группами (рис. 1).

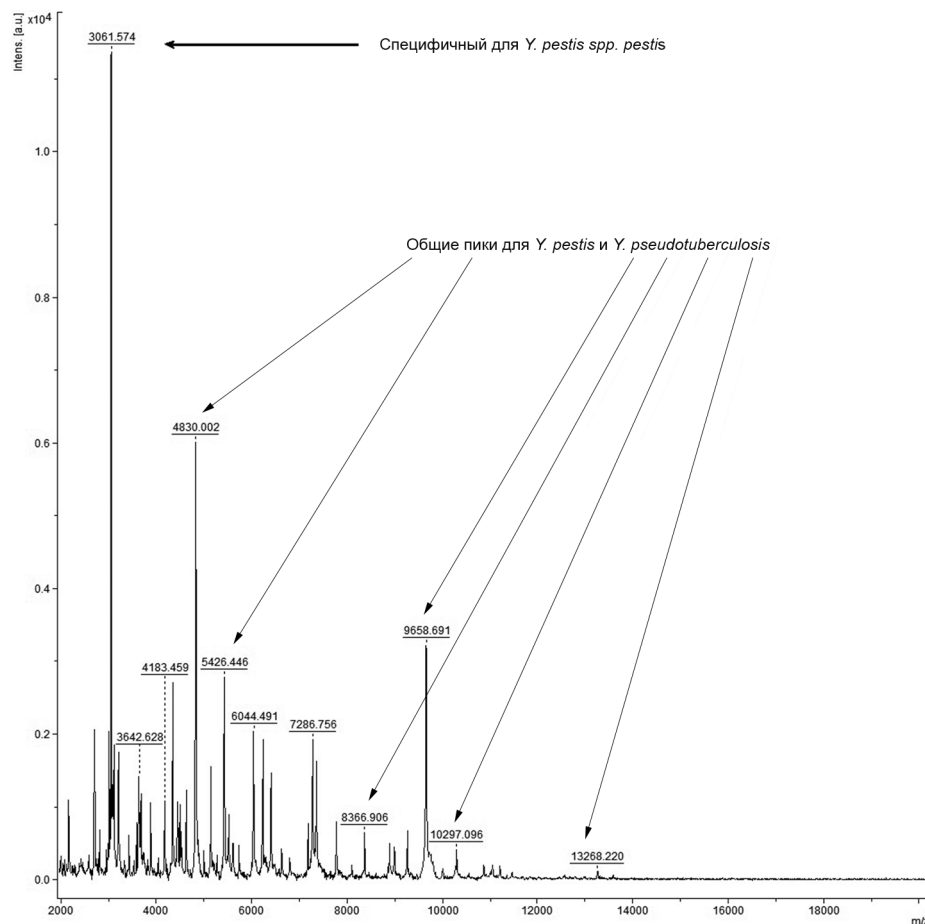


Рис. 2. Пики, специфичные и общие для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Сравнительный анализ полученных масс-спектрометрических профилей *Y. pestis* позволил определить специфичный пик для основного подвида *pestis* (m/z 3061) и общие пики для *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* (m/z 4830, 5426, 8366, 9658, 10297, 13268) (рис. 2).

Следующий этап работы заключался в апробации созданной базы данных масс-спектров при проведении идентификации 15 штаммов возбудителя чумы: *Y. pestis* основного подвида (штамм 1454) и *Y. pestis* алтайского подвида, выделенных на территории Горно-Алтайского природного очага чумы в 2012 и 2014 гг. (штаммы 1307, 2397, 2416, 2513-15, 2633, 2639, 2739, 2774, 2881, 2967, 3021, 2691, 3057, 3067). Во всех случаях культуры были идентифицированы как *Y. pestis* со значением score $\geq 2,3$.

Таким образом, полученные результаты исследования показали возможность создания баз данных возбудителей опасных инфекций, что, в свою очередь, позволяет проведение их идентификации методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике инфекционных болезней. Современное состояние и перспективы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:77–82.
2. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiology*. 2010; 10:285.
3. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x.
4. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
5. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of

MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.

6. Veen van S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.

7. Wittwer M., Lasch P., Drevinek M., Schmoldt S., Indra A., Jacob D., Grunow R. First Report: Application of MALDI-TOF MS within an External Quality Assurance Exercise for the Discrimination of Highly Pathogenic Bacteria from Contaminant Flora. *Applied Biosafety*. 2012; 17(2):59–63.

References

1. Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., Portenko S.A., Germenchuk V.G., Osina N.A. [Application of MALDI mass-spectrometry for diagnostics of particularly dangerous infectious diseases: current state of affairs and prospects]. *Probl. Osobo. Opasn. Infek.* 2014; 3:77–82.
2. Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiology*. 2010; 10:285.
3. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x.
4. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75. DOI: 10.1128/JCM.01881-09.
5. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x.
6. Veen van S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed. J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.
7. Wittwer M., Lasch P., Drevinek M., Schmoldt S., Indra A., Jacob D., Grunow R. First Report: Application of MALDI-TOF MS within an External Quality Assurance Exercise for the Discrimination of Highly Pathogenic Bacteria from Contaminant Flora. *Applied Biosafety*. 2012; 17(2):59–63.

Authors:

Spitsyn A.N., Utkin D.V., Shcherbakova N.E., Portenko S.A., Abdrashitova A.S., Kas'yan I.A., Germenchuk V.G., Kuklev V.E. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Спицын А.Н., Уткин Д.В., Щербакова Н.Е., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Касьян И.А., Германчук В.Г., Куклев В.Е. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 07.05.15.

Е.Г.Абрамова, С.В.Генералов, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, А.К.Никифоров, А.В.Комиссаров

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВНЕДРЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ПРОИЗВОДСТВО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В обзоре представлены основные итоги научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы, выполненной при реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) по разработке и внедрению культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Освещены основные этапы разработки методологии масштабного культивирования фиксированного вируса бешенства, концентрирования культуральной жидкости, количественного обнаружения вируса бешенства с применением ПЦР, иммунизации продуцентов. Получение пилотных серий усовершенствованного антирабического иммуноглобулина, соответствующего нормативным требованиям на коммерческий препарат, свидетельствовало об эффективности разработанных биотехнологических, методологических приемов, а также разработанного проекта производственно-технологической документации.

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, антирабический иммуноглобулин, культура клеток, иммунизация, ультрафильтрация, стандартная операционная процедура, производственный регламент, фармакопейная статья.

Корреспондирующий автор: Абрамова Елена Геннадьевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.G.Abramova, S.V.Generalov, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, A.K.Nikiforov, A.V.Komissarov

Experimental Substantiation of Cultural Technologies Introduction into Manufacturing of Anti-Rabies Immunoglobulin

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The review provides information on the major outcomes of research and development work, performed within the frames of the Federal Target Program "National system of chemical and biological safety" (2009–2014), aimed at elaboration and introduction of cultural techniques into the manufacturing of anti-rabies immunoglobulin. Described are the key phases in methodology engineering, deployed for the large-scale cultivation of fixed rabies virus, concentration of cultural liquid, quantitation of rabies virus using PCR, and immunization of producers. Obtained pilot batches of the enhanced anti-rabies immunoglobulin, complying with normative requirements to commercial formulations, testify to the effectiveness of the developed biotechnological and methodological procedures, as well as of the designed engineering-manufacturing project documentation.

Key words: rabies, rabies virus, anti-rabies immunoglobulin, cell culture, immunization, ultra-filtration, standard operational procedure, master formula, pharmacopoeial monograph.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena G. Abramova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. Experimental Substantiation of Cultural Technologies Introduction into Manufacturing of Anti-Rabies Immunoglobulin. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:95–101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101

Бешенство относится к группе опасных инфекционных заболеваний человека и животных, характеризуется поражением центральной нервной системы, абсолютной летальностью и является одним из наиболее распространенных зооантропонозов. В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ежегодно за антирабической помощью обращаются от 430 до 470 тыс. человек, больше половины из них получают специфическое антирабическое лечение [1, 13]. Для специфической профилактики бешенства используют антирабические вакцину и иммуноглобулин, в производстве которых применяют фиксированные штаммы вируса бешенства [11, 15]. Россия на протяжении десятков лет не имела собственной площадки для производства антирабического имму-

ноглобулина, производство препарата было сосредоточено на территории Украины (Харьков). После распада СССР остро встал вопрос производства антирабического иммуноглобулина на территории России. С 2004 г. ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» начал серийный выпуск препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций» (АИГ) по воспроизведенной спиртово-риванольной технологии.

На сегодняшний день гетерологичный АИГ можно считать приемлемой и безопасной альтернативой гомологичному препарату, так как применяемые в производстве современные методы очистки иммуноглобулина позволяют значительно снизить частоту побочных эффектов, проявляющихся в результате применения АИГ животного происхожде-

ния. По данным ВОЗ, нежелательные поствакцинальные реакции наблюдаются в 1–2 % случаев [30]. Для сравнения, в середине прошлого столетия значение данного показателя составляло около 46 %, а в конце восьмидесятых годов – около 6 % [23, 31]. Тем не менее, вопрос дальнейшего усовершенствования гетерологичных препаратов АИГ, даже при такой сравнительно небольшой доле возникновения побочных эффектов, остается актуальным. Важнейшей научно-практической задачей, способствующей повышению качества АИГ, является внедрение культуральных технологий на этапе получения рабического антигена для иммунизации продуцентов. Отказаться от использования органо-тканевого антигена в производстве антирабических препаратов настоятельно рекомендует ВОЗ, поскольку мозговая ткань может индуцировать в организме продуцента выработку антител нейротоксического характера, способных стать причиной поствакцинальных неврологических осложнений [30]. В качестве альтернативного варианта рекомендовано использование культурального антигена на основе вируса бешенства, репродуцированного на клеточных культурах [29, 30].

Использование культурального антигена для получения антирабической сыворотки впервые предложено P.Lepin и P.Atanasiu [9, 10]. Они использовали вирус, полученный в первичнотрипсинизированной культуре ткани почек эмбриона хомяка, однако для иммунизации требовалось либо применение больших доз антигена, что индуцировало образование низкоафинных антител в течение длительного времени, либо введение в организм продуцента живого вируса. К настоящему времени существуют более совершенные схемы иммунизации продуцентов антирабической сыворотки, которые предполагают применение только инактивированного вируса, выращенного на перевиваемых клеточных культурах ВНК [20] и Vero [17, 21, 27]. Использование перевиваемых клеток в качестве клеточного субстрата для репродукции вируса бешенства предпочтительнее по сравнению с первичнотрипсинизированными, что связано с высокой потенцией роста клеток, стандартностью биологических свойств и возможностью крупномасштабного культивирования в ферментерах большого объема. Перевиваемая линия клеток Vero аттестована в России для производства МИБП, она характеризуется отсутствием онкогенных свойств и не представляет опасности для человека. Последнее обстоятельство определило выбор этой линии для использования в качестве субстрата для размножения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», используемого в отечественном производстве антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Целью исследований в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) являлась разработка технологии масштабного культивирования производственного штамма фиксиро-

ванного вируса бешенства «Москва 3253» на клетках перевиваемой линии Vero и получение культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

На первом этапе исследований решалась задача по адаптации производственного штамма вируса бешенства к клеточной культуре. Адаптацию вируса осуществляли с применением как прямого пассирования вируса на клеточной культуре Vero, так и поочередного пассирования через мозг кролика и на клеточной культуре. Для улучшения адсорбции вируса к клеточной мембране к клеточной суспензии предварительно добавляли протамина сульфат в конечной концентрации 0,1 мг/мл. К завершению адаптации вирус стабильно накапливался в клеточной культуре и вызывал деструкцию (85 ± 5) % клеточного монослоя. Одновременно были подобраны оптимальные условия культивирования исследуемого штамма на клеточной культуре Vero в культуральных флаконах стационарным способом. Для заражения клеточной культуры вируссодержащую субстанцию добавляли к взвеси клеток. Экспериментально выявленная оптимальная заражающая доза для эффективной репродукции вируса составляла 0,1 ЛД₅₀/кл. Культивирование фиксированного вируса бешенства осуществляли при температуре 37 °С от 5 до 7 сут с использованием культуральной среды 199 (pH 7,2–7,4) с добавлением человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в концентрации 0,1 %.

Для увеличения объемов выхода биомассы фиксированного вируса бешенства рассматривали способы культивирования в биореакторе и роллерных бутылках [5]. Использование биореактора позволяет автоматизировать контроль параметров культивирования клеток и вируса и стандартизировать данный технологический процесс. В биореакторе вирус выращивали двумя способами: суспензионным и псевдосуспензионным. При суспензионном способе клетки культивируются во взвешенном состоянии благодаря постоянному перемешиванию среды; при использовании псевдосуспензионного метода клетки растут на специальных сферических микроносителях. С одной стороны, клетки находятся в естественных для роста условиях, с другой стороны, для их выращивания возможно использование процессов и аппаратуры, разработанных для суспензионных культур. Разработанная методология выращивания суспензионным и псевдосуспензионным способами позволяет получать вируссодержащую жидкость с титром в ИФА соответственно (1:32 – 1:64) и (1:64 – 1:128). В результате экспериментов были отработаны оптимальные параметры культивирования клеток и вируса для каждого из указанных методов.

Культивирование клеток Vero суспензионным методом осуществляли в 2 л питательной ростовой среды Игла MEM с добавлением 10 % фетальной сыворотки КРС при температуре ($37 \pm 0,5$) °С и pH ($7,2 \pm 0,1$). Частоту вращения мешалки поддержи-

вали на уровне от 80 до 100 об/мин. Аэрацию осуществляли периодически: воздух, содержащий 5 % углекислого газа, подавали в биореактор в течение 30 мин, затем подачу воздуха прекращали на 2 ч. Экспериментально определена оптимальная посевная концентрация клеток, равная $(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$ кл/мл. После 3–4 сут культивирования к клеточной суспензии добавляли вируссодержащую жидкость в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл. Через 30 мин после инокуляции вируса добавляли поддерживающую среду 199, содержащую 0,1 % ЧСА, либо 5 % сыворотку КРС. Культивирование вирусинфицированной культуры осуществляли в течение 5 сут.

При выращивании клеток псевдосуспензионным способом посевную клеточную суспензию добавляли к 2 л ростовой среды, содержащей микроносители Cytodex-3 в концентрации $(2,5 \pm 0,5)$ г/л. Начальная концентрация клеток должна составлять $(0,7 \pm 0,2) \cdot 10^5$ кл/мл. Для прикрепления клеток к частицам Cytodex-3 в течение первых 8 ч выращивания использовали следующий режим перемешивания: 1 мин с частотой 50 об/мин, затем остановка мешалки на 30 мин. Далее в реактор добавляли ростовую среду до конечного объема 5 л и осуществляли культивирование в условиях, аналогичных условиям суспензионного способа. По окончании выращивания клеток ростовую среду удаляли из биореактора, к клеткам добавляли вируссодержащую жидкость в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл и поддерживающую среду. Дальнейшее культивирование осуществляли в течение 5–7 сут.

Процесс масштабного культивирования вируса бешенства *in vitro* был оптимизирован за счет освоения роллерного способа. При культивировании в роллерных бутылках клеточный монослой располагается по всей внутренней цилиндрической поверхности горизонтально вращающихся сосудов и периодически омывается питательной средой. Данный способ позволяет сочетать возможности максимального накопления вируса бешенства на клеточной культуре, простоты и эффективности технологического обслуживания процесса культивирования. Роллерное культивирование клеток Vero осуществляли при 37 °C в 200 мл ростовой среды при частоте вращения бутылки $(0,4 \pm 0,1)$ об/мин в первые 24 ч выращивания, которую затем увеличивали до $(1,25 \pm 0,25)$ об/мин. Через 5 сут выращивания среду удаляли, клеточный монослой промывали раствором Дальбекко, клетки отсоединяли раствором трипсина и версена. Затем к клеткам добавляли вируссодержащую субстанцию в концентрации 0,1 ЛД₅₀/кл и поддерживающую среду. Культивирование вируса осуществляли в объеме (250 ± 25) мл при температуре 32 °C.

При культивировании роллерным способом вирус бешенства накапливается в культуральной жидкости до значения титра в ИФА (1:64 – 1:128). При равнозначном выходе целевой биомассы роллерный способ представляется менее затратным по сравнению с псевдосуспензионным способом из-за исполь-

зования микроносителей, стоимость которых достаточно высока. Следует отметить, что в условиях производства антирабического иммуноглобулина технологическая реализация роллерного способа имеет весомое преимущество, поскольку в данном случае отсутствует необходимость круглосуточного наблюдения за процессом выращивания вируса.

Полученную в результате культивирования биомассу после инактивации использовали в качестве основы для приготовления материала для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки. Инактивацию осуществляли добавлением к вируссодержащей биомассе фенола в концентрации 0,5 % с последующим инкубированием при 37 °C в течение 24 ч согласно методическим указаниям «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства».

Для количественной оценки вируса бешенства в инактивированном материале использовали ИФА и ПЦР. Эффективность применения ИФА для оценки специфической активности культурального вируса бешенства при производстве антирабических вакцин подтверждается в многочисленных исследованиях [18, 19]. В настоящем исследовании использовали «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа» (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Республика Татарстан).

Альтернативным вариантом количественной оценки количества вирусных частиц в материале для иммунизации является использование полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Данный подход нашел успешное применение для определения концентрации РНК вируса диареи крупного рогатого скота [24]; желтой геморрагической лихорадки, человеческого герпесвируса-6 и цитомегаловируса [28], вируса клещевого энцефалита [12]. Для количественной оценки содержания вируса бешенства штамма «Москва 3253» в вирусном материале в рамках данных исследований разработана ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов с использованием праймеров и зонда формата TaqMan на основе последовательности G-L области вируса бешенства; определены ДНК-калибраторы [8]. Разработанные методические подходы позволили установить концентрацию вирусных частиц в культуральном антигене. В зависимости от способа и сроков культивирования вируса данный показатель находится в пределах от 10^5 до 10^6 копий РНК/мл. Для сравнения, в органотканевом антигене количество вирусных частиц составляет от 10^7 до 10^8 копий РНК/мл.

Одна из основных сложностей в разработке эффективных технологий выделения продуктов культивирования связана с их низкой концентрацией в исходной культуральной жидкости. Для повышения концентрации вирусных частиц и повышения показателей антигенной активности вируса, выращенного в культуре клеток, необходимо было подобрать метод

концентрирования инактивированного вирусного материала. Из многообразия методов концентрирования вирусосодержащих материалов выбор был остановлен на методе тангенциальной или проточной ультрафильтрации, достоинствами которого являются практическое отсутствие инактивирующих воздействий на биологические продукты, высокая селективность, а также низкие энергозатраты на их разделение. В сравнении с традиционным методом «тупиковой» ультрафильтрации, когда разделяемый раствор подают на мембрану перпендикулярно к ее поверхности, при тангенциальной ультрафильтрации направления подачи среды и фильтрации не совпадают: они перпендикулярны друг другу. В результате часть фильтруемой среды проходит через мембраны как фильтрат, а основная часть потока выходит из системы в рабочую емкость, а затем вновь поступает в фильтрующий контур [2]. Для концентрирования инактивированной культуральной жидкости, содержащей вирус бешенства, использовали модуль для тангенциальной ультрафильтрации Vivaflow 200 (Sartorius), снаряженный плоскораменными фильтрующими элементами с площадью фильтрации, равной 20 дм².

В результате исследований отработаны оптимальные условия процесса концентрирования, предусматривающие использование одного ультрафильтрационного модуля с номинальной отсечкой по молекулярной массе, не превышающей 300 кДа, при давлении от 0,24 до 0,26 МПа и температуре (20±2) °С. Далее для получения стерильного антигена подобраны параметры последующей стерилизующей фильтрации. В экспериментах установлено, что оптимальным является последовательное использование микрофильтрационных мембран из ацетата целлюлозы с размерами пор 0,8, 0,45 и 0,22 мкм при температуре (32±1) °С. Предлагаемые способы концентрирования и стерилизующей фильтрации позволили получить культуральный антиген с содержанием вирусной РНК от 10⁷ до 10⁸ копий/мл, что близко по значению к содержанию вирусной РНК в органотканевом антигене.

Эффективность применения культурального рабического антигена для иммунизации животных с целью получения высокоактивных сывороток предварительно была изучена на кроликах. Животных иммунизировали подкожно в объеме 1 мл на 0, 7, 21, 28, 52, 59-е сутки. Титр вируснейтрализующих антител в сыворотке животных определяли на 42-е и 73-е сутки в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [9, 23]. Одновременно проводили исследования эффективности использования адъювантов при иммунизации животных. Среди большого разнообразия адъювантов были выбраны гидроксид алюминия – адъювант, традиционно применяемый в производстве вакцин, и полиоксидоний – сравнительно новый синтетический отечественный адъювант, официально разрешенный в производстве вакцин [16]. Установлено, что к 73-му дню иммунизации антитела в крови животных накапливались в титре

(1:640 – 1:1280), что соответствовало требованиям ВОЗ [9, 26], согласно которым титр специфических антител в антирабической сыворотке, предназначенной для получения антирабического иммуноглобулина, должен составлять в реакции нейтрализации не менее 1:500. Проведенные исследования показали принципиальную возможность использования культурального антигена для иммунизации производителей антирабической сыворотки. При этом рациональным представляется применение на этапе иммунизации гидроксида алюминия в качестве адъюванта, однако следует отметить и выраженный стимулирующий эффект полиоксидония.

Полученные результаты по изучению антительного ответа на кроликах явились основой для разработки схемы иммунизации более крупных производителей – лошадей [4]. В отличие от других крупных животных, применяемых при изготовлении лечебно-профилактических сывороток, лошади отличаются высокой иммунологической реактивностью, от них в короткий срок можно получать сыворотку, содержащую специфические антитела в достаточно высоком титре [10]. Для иммунизации использовали трех клинически здоровых лошадей в возрасте от 3 до 10 лет. Животным внутримышечно вводили по 5 мл рабического антигена с установленной концентрацией вирусных частиц – от 10⁷ до 10⁸ копий РНК в 1 мл. Титр вируса, содержащегося в культуральной жидкости, в ИФА составлял не менее 1:128. Установлено, что для получения высокоактивной сыворотки с титром специфических антител не менее 1:500 целесообразно проводить иммунизацию лошадей с семидневным интервалом в течение 11–14 недель. При этом первые пять инъекций рекомендуется осуществлять с использованием адъюванта: гидроксида алюминия в концентрации 3 мг/мл, либо полиоксидония в конечной концентрации 1 мг/мл. Взятие крови с целью получения антирабической сыворотки следует выполнять через 7–10 дней после последней иммунизации. Через три недели после взятия крови лошадям показана повторная иммунизация. Исследования антирабических сывороток лошадей, иммунизированных культуральным антигеном, позволили выявить их специфическую активность на уровне (1:554 – 1:692) в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах.

В лабораторных условиях из сывороток кроликов и лошадей, иммунизированных культуральным антигеном, были получены экспериментальные образцы антирабического иммуноглобулина. Специфическая активность лабораторных образцов кроличьего АИГ, определенная в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах, составила 332 и 347 МЕ/мл; лабораторные образцы АИГ, полученные из сыворотки крови лошади, показали специфическую активность на уровне 242 и 214 МЕ/мл. Согласно нормативной документации, для применения в практической медицине специфическая активность антирабического иммуноглобулина должна составлять не менее 150 МЕ/мл. Физико-химические свойства (содержа-

ние белка, электрофоретическая чистота, цветность, прозрачность, pH) лабораторных образцов АИГ также удовлетворяли требованиям, предъявляемым к выпускаемому препарату АИГ.

Рабочий цикл по получению пилотных серий антирабического иммуноглобулина с использованием культуральных технологий предварял этап разработки соответствующей производственно-технологической документации. Основными нормативными документами на производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются промышленный регламент и фармакопейная статья предприятия. Промышленный регламент устанавливает методы производства, технологические нормы, технические средства, условия и порядок проведения технологического процесса, обеспечивающий получение препарата с показателями качества, отвечающими требованиям фармакопейной статьи предприятия. Регламент также устанавливает безопасность ведения работ и достижение оптимальных технико-экономических показателей производственного процесса. Разработанный проект изменений в настоящий промышленный регламент включал изложение основных этапов изготовления культурального рабического антигена: пассирования клеточной культуры, подготовки клеточной культуры к криоконсервации, восстановления клеточной культуры после криоконсервации, культивирование вируса бешенства на клеточной культуре, концентрирование урожая культуральной биомассы методом тангенциальной ультрафильтрации. Помимо изложения новых технологических этапов, дополнения в действующий регламент описывают требования к используемой для репродукции производственного штамма вируса бешенства «Москва 3253» перевиваемой клеточной линии Vero, а также методы контроля на отсутствие микоплазм.

Требования к качеству выпускаемого препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина устанавливает соответствующая фармакопейная статья предприятия (ФСП). Данный документ содержит перечень показателей и методов контроля качества препарата с учетом технологии производства. Разработанный проект изменений в действующую ФСП на антирабический иммуноглобулин определяет требования к клеточной культуре для репродукции производственного штамма вируса бешенства. В проекте изменений в ФСП также приведено описание процедуры проведения тестирования антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культуральных технологий, на отсутствие микоплазм в ПЦР с использованием коммерческой тест-системы для выявления микоплазм PCR Mycoplasma Kit («AppleChem», Германия) с последующей визуализацией продуктов ПЦР в агарозном геле с помощью системы «GelDoc 2000».

Использование новых этапов в технологическом процессе требует их обязательного документального описания непосредственно для самого оператора [7].

Подобное изложение подлежит оформлению в специальных документах – стандартных операционных процедурах (СОП). Целью СОП является стандартизация деятельности сотрудников, повышение их ответственности, а следовательно, обеспечение надлежащего качества выполнения технологической операции и получения качественного продукта. Составлению СОП предшествовала разработка соответствующих методических рекомендаций учрежденческого уровня, которые использовали для первичного обучения персонала выполнению соответствующей СОП и получения объективной оценки применимости требований данного документа и его соответствия требованиям практики. По итогам обучения были предложены рекомендации по оптимизации процессов или текста, согласно которым корректировали финальный вариант СОП. При разработке СОП на новые технологические этапы принимали во внимание рекомендации российских и зарубежных исследователей [3, 7, 14, 22], а также нормативные документы.

В рамках проведенных исследований на каждую производственную операцию с использованием клеточных культур составлен соответствующий проект СОП. Каждый проект СОП содержит следующую информацию: наименование учреждения и подразделения, для которого предназначается данный документ; название документа, которое должно отражать суть проводимой операции, фамилии автора, а также утверждающих должностных лиц и даты утверждения. В документе отражены цель процедуры и область ее применения в соответствии с особенностями деятельности производственного участка, для которого предназначена СОП; указаны материалы, оборудование и инструменты, используемые для выполнения процедуры. Инструкции выполнения СОП содержат всю необходимую информацию, включая ссылки на применяемую при разработке СОП литературу и нормативные документы. При этом в документе также отражены требования к квалификации и ответственности исполнителя данной СОП.

С учетом внесенных изменений в нормативную документацию были выпущены три пилотные серии антирабического иммуноглобулина. Получение антирабического иммуноглобулина осуществляли методом риванол-спиртового фракционирования иммунной сыворотки [6]. Осадок гамма-глобулиновой фракции растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации белка $(10 \pm 1) \%$. Очистку белкового раствора от посторонних примесей проводили с помощью разработанной системы каскадной фильтрации. Она состоит из нескольких баромембранных процессов: фильтрация через патронные мембранные элементы с размерами пор 0,80 и 0,45 мкм, ультрафильтрация на диализной колонке FX100 Fresenius Helixone, фильтрация через глубинные фильтры ZetaCarbon и ZetaPlus, конечная стерилизующая фильтрация через ацетатцеллюлозные мембраны 0,22 мкм. Данная система фильтрации позволяет получить стерильный антира-

бический иммуноглобулин, максимально очищенный от риванола, гемпигмента, пирогенов, остатков спирта, что в совокупности с биологическими показателями характеризует высокое качество выпускаемого препарата. Очищенный препарат был разлит в ампулы по 5 см³. Всего получено три пилотные серии общим объемом 8,2 дм³. Специфическая активность пилотных серий в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышках составила 151, 160 и 165 МЕ/мл. Физико-химические и биологические свойства полученных пилотных серий антирабического иммуноглобулина, изученные в межлабораторных испытаниях, подтвердили соответствие полученных показателей требованиям нормативной документации на коммерческий препарат антирабического иммуноглобулина. Положительные результаты, полученные при проведении испытаний пилотных серий антирабического иммуноглобулина, подтверждают эффективность разработанной технологии получения культурального рабического антигена для иммунизации продуцентов.

Таким образом, в результате выполнения исследований при реализации ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности» (2009–2014) по разработке и внедрению культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина достигнуты следующие целевые показатели:

опубликовано пять статей в журналах, рекомендованных ВАК;

разработано шесть методических рекомендаций учрежденческого уровня;

получен патент № 2511440 «Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» [8];

защищена одна диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук;

разработаны проекты изменений в нормативную документацию на производство препарата «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций»;

разработаны проекты 26 стандартных операционных процедур;

получены три пилотные серии антирабического иммуноглобулина с применением культуральных технологий с учетом разработанных изменений в нормативную документацию.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И., Грязин В.Н., Зайковская А.В. Современные проблемы бешенства животных. М.: КолосС; 2007. 81 с.
2. Брайт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевт. технол. и упаковка. 2009; 6: 47–51.
3. Вялков А.И., Воробьев П.А., Сура М.В., Авксентьева М.В. Стандартные операционные процедуры (СОПы) как один из элементов управления качеством медицинской помощи. *Пробл. стандартизации в здравоохран.* 2005; 7: 1–6.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии по-

лучения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):65–8.

5. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Свинцов Р.А. Крупномасштабное культивирование фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253 на перевиваемой линии клеток Vero (B): методы и сравнительный анализ. *Биотехнол.* 2014; 5: 38–43.

6. Губенко Т.Л., Смирнова В.И. Совершенствование риванол-спиртового метода получения гамма-глобулина. *Укр. биохим. журн.* 1963; 5: 747–54.

7. Дьяконова Е.В., Рубан Т.И. Принципы организации документов СМК на предприятии-производителе лекарственных средств. *Сибирский мед. журн. (г. Томск)* 2011; 26(2-2):100–2.

8. Матвеева Ж.В., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К., Кутырев В.В. Способ количественного определения фиксированного вируса бешенства «Москва 3253». Патент 251177440 РФ. МПК C12Q1/06. Оpubл. 10.04.14. Бюл. № 10.

9. Каплан М.М., Копровский Н., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. 360 с.

10. Карпов С.П., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федоров Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.

11. Мовсесянц А.А., Миронов А.Н., Ведерников В.А., Хадарцев О.С., Борисевич С.В. Проблема смертности людей от бешенства в Российской Федерации в 2010–2011 годах. *Ведомости ЦСМЭП.* 2012; 3: 48–52.

12. Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н., Исаева Е.И., Подчерняева Р.Я. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток. *Вопр. вирусол.* 2012; 57(2):40–3.

13. Плеханов В.И., Одиноченко Н.Г., Макаров М.Л., Балашов А.В., Баранович С.Ю., Барабаш В.И., Плеханова Л.А. Лечение больных с укушенными ранами. *Усп. совр. естествознания.* 2006; 12: 71–2.

14. Реутская Л.А., Долголикова А.Н., Александрова Е.Л., Кугач В.В. Порядок разработки рабочих инструкций и операционных процедур. *Вестник фармации.* 2007; 3(37):10–5.

15. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.

16. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионика; 2007. 524 с.

17. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С., Кунцевич Ю.Г., Петрова И.И. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент 2322503 РФ. МПК C12P 21/00, A61K 39/42. Оpubл. 20.04.08. Бюл. № 11.

18. Цетлин Е.М., Волкова В.А. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины. *Вопр. вирусол.* 1996; 1: 21–4.

19. Чернов С.М., Цетлин Е.М., Ботвинкин А.Д., Романова Л.Н. Результаты использования прямого твердофазного иммуноферментного анализа для оценки специфической активности антирабических вакцин. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1991; 5: 30–3.

20. Consales C.A., Valentini E., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A., Pereira C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J. Biol. Stand.* 1988; 16: 27–32. DOI: 10.1016/0092-1157(88)90026-1.

21. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals.* 2003; 31: 233–6. DOI: 10.1016/S1045-1056(03)00059-9.

22. Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOPs). U.S. EPA; 2007. 60 p.

23. Karliner J.S., Belaval G.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases. *JAMA.* 1965; 193: 359–62. DOI: 10.1001/jama.1965.03090050035009.

24. Kosinova E., Psikal I., Robesova B., Kovarcik K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Veterinarni medicina.* 2007; 52(6): 253–61.

25. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

26. Luekrajat T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In.: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.

27. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi.* 2004; 15: 49–54.

28. Radonic A., Thulke S., Bae H., Müller M., Siegert W., Nitssche A. Reference gene selection for quantitative realtime PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cytomegalovirus and Cytomegalovirus infections. *Virol. J.* 2005; 2: 7. DOI: 10.1186/1743-422X-2-7.

29. Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine.* 2008; 2: 3305–11. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.077.

30. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva: WHO; 2013. 139 p.

31. Wilde H., Chomchey P., Prakongsri S., Puyaratabanhu P., Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. *Vaccine*. 1989; 7:10–1. DOI: 10.1016/0264-410X(89)90003-0.

References

- Baryshnikov P.I., Gryazin V.N., Zaikovskaya A.V. [Current problems of rabies in animals]. M.: Kolos; 2007. 81 p.
- Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'eva S.P. [Cross-flow filtration]. *Farmatsevt. Tekhnol. Upak.* 2009; 6:47–51.
- Vyal'kov A.I., Vorob'ev P.A., Sura M.V., Avksent'eva M.V. [Standard operational procedures (SOPs) as one of the tools of health care quality management]. *Probl. Standartiz. v Zdravookhran.* 2005; 7:1–6.
- Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Cultural antigen in the technology for anti-rabies immunoglobulin obtainment from equine blood serum]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4:65–8.
- Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Svintsov R.A. [Large-scale cultivation of fixed rabies virus, the strain Moscow 3253, on the finite Vero (B) cell line: methods and comparative analysis]. *Biotechnologiya*. 2014; 5:38–43.
- Gubenko T.L., Smirnova V.I. [Enhancement of rivanol-ethanol method for gamma-globulin obtainment]. *Ukr. Biokhim. Zh.* 1963; 5:747–54.
- D'yakonova E.V., Ruban T.I. [Principles of Quality Management System (QMS) protocol establishment at pharmaceutical product manufacturing enterprise]. *Sibirskii Med. Zh.(Tomsk)* 2011; 26(2-2):100–2.
- Matveeva Zh.V., Osina N.A., Bugorkova T.V., Abramova E.G., Generalov S.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K., Kutryev V.V. [Method of fixed rabies virus "Moscow 3253" quantitation]. RF Patent 251177440. IPC C12Q1/06. 10.04.14.
- Kaplan M.M., Koprovsky N., editors. [Methods of Laboratory Studies on Rabies]. Geneva: WHO; 1976. 360 p.
- Karpov S.P., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorov Yu.V. [Hyper-Immune Sera]. Tomsk; 1976. 380 p.
- Movsesyants A.A., Mironov A.N., Vedernikov V.A., Khadartsev O.S., Borisevich S.V. [The problem of human mortality from rabies virus in the Russian Federation in 2010–2011]. *Bulletin of the Scientific Center on Expertise of Medical Application Products*. 2012; 3:48–52.
- Morozova O.V., Grishchkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. [Dynamics of reproduction of tick-borne encephalitis virus in cell cultures]. *Vopr. Virusol.* 2012; 57(2):40–3.
- Plekhanov V.I., Odinochenko N.G., Makarov M.L., Balashov A.V., Baranovich S.Yu., Barabash V.I., Plekhanova L.A. [Treatment of patients with bite wounds]. *Uspekhi Sov. Estestvoznaniya*. 2006; 12:71–2.
- Reutskaya L.A., Dolgolikova A.N., Aleksandrova E.L., Kugach V.V. [Procedure for the development of operational instructions and operational procedures]. *Vestnik Farmatsii*. 2007; 3(37):10–5.
- Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
- Sergeev V.A., Nepoklonov E.A., Aliper T.I. [Viruses and Viral Vaccines]. M.: Biblioteka; 2007. 524 p.
- Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S., Kuntsevich Yu.G., Petrova I.I. [Method for production of highly specific heterologous anti-rabies serum]. RF Patent 2322503. IPC C12P 21/00, A61K 39/42. 20.04.08.
- Tsetlin E.M., Volkova V.A. [Validation of the optimum scheme for registration of results on the application of immune-enzymatic test-system for determination of antigenic activity of cultural anti-rabies vaccine]. *Vopr. Virusol.* 1996; 1:21–4.
- Chernov S.M., Tsetlin E.M., Botvinkin A.D., Romanova L.N. [Effect of application of direct enzyme-linked immunoassay for the assessment of specific activity of anti-rabies vaccines]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1991; 5:30–3.
- Consales C.A., Valentini E., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A., Pereira C.A. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. *J. Biol. Stand.* 1988; 16: 27–32. DOI: 10.1016/0092-1157(88)90026-1.
- Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. *Biologicals*. 2003; 31:233–6. DOI: 10.1016/S1045-1056(03)00059-9.
- Guidance for Preparing Standard Operating Procedures (SOPs). U.S. EPA; 2007. 60 p.
- Karliner J.S., Belaval G.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases. *JAMA*. 1965;193: 359–62. DOI: 10.1001/jama.1965.03090050035009.
- Kosinova E., Psikal I., Robesova B., Kovarcik K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. *Veterinari medicina*. 2007; 52(6): 253–61.
- Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
- Luekrajana T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In.: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
- Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2004; 15:49–54.
- Radonic A., Thulke S., Bae H., Müller M., Siegert W., Nitsche A. Reference gene selection for quantitative realtime PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Cytomegalovirus and Cytomegalovirus infections. *Virology*. 2005; 2:7. DOI: 10.1186/1743-422X-2-7.
- Silva A., Deldago I., Sousa M., Carrondo M., Alves P. Scalable culture systems using different cell lines for the production of Peste des Petis ruminants vaccine. *Vaccine*. 2008; 2:3305–11. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.03.077.
- WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva: WHO; 2013. 139 p.
- Wilde H., Chomchey P., Prakongsri S., Puyaratabanhu P., Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. *Vaccine*. 1989; 7:10–1. DOI: 10.1016/0264-410X(89)90003-0.

Authors:

Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 05.10.15.

П.Н.Дерябин¹, Б.В.Каральник², Т.Г.Денисова², Т.С.Пономарева¹, Б.Б.Атшабар¹, Г.Б.Жунусова²,
Т.И.Тугамбаев¹, А.А.Туружанова², С.Б.Закарян¹, З.Т.Алымкулова¹

РАЗРАБОТКА РЕАГЕНТА ДЛЯ ОЦЕНКИ НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ЖИВУЮ ЧУМНУЮ ВАКЦИНУ

¹Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций имени М.Айкимбаева, Алматы, Республика Казахстан;

²Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Х.Жуматова, Алматы, Республика Казахстан

Цель работы. Разработка реагента для выявления лимфоцитов с рецепторами (ЛФР) к F1 антигену *Yersinia pestis*. **Материалы и методы.** В работе использована живая чумная вакцина на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, инактивированные формалином взвеси микроорганизмов – *Y. pestis*, 3123, *Y. enterocolitica* серовара O9 H-383, *Y. pseudotuberculosis* серовара O1 2841; капсульный антиген *Y. pestis* F1, полученный по методу Baker; липополисахарид *Y. pestis* K1, фиксированные ацетальдегидом эритроциты быка. Сенсибилизацию эритроцитов быка F1 проводили при помощи риванола. Лимфоциты из крови выделяли в градиенте плотности фиколла-верографин 1.077. ЛФР определяли методом адгезии реагента на выделенных лимфоцитах. В контроле использовали эритроциты, не нагруженные F1. После экспозиции выполняли по 7 определений ЛФР специфичности F1 и лимфоцитов, связавших контрольный реагент. В работе использовано 8 кроликов, иммунизированных живой вакциной EV, и 2 кролика, иммунизированных инактивированной вакциной EV. Обследовано 5 людей, иммунизированных вакциной EV. **Результаты и выводы.** Определена оптимальная сенсибилизирующая доза антигена F1 (250 мкг/мл). В опытах ингибции гомологичными и гетерологичными антигенами показана специфичность выявления лимфоцитов с рецепторами к F1. ЛФР к F1 обнаружены в периферической крови всех кроликов и людей, иммунизированных вакциной EV. У кроликов ЛФР выявлены со 2-х по 35-е сутки, у людей – со 2-х по 14-е сутки после вакцинации. Показано, что при повторной вакцинации людей ЛФР появлялись и исчезали раньше, чем при первичной вакцинации.

Ключевые слова: живая чумная вакцина EV, лимфоциты с рецепторами к антигену F1, вакцинация людей и кроликов

Корреспондирующий автор: Дерябин Павел Николаевич, e-mail: pderyabin@gmail.com.

P.N.Deryabin¹, B.V.Karal'nik², T.G.Denisova², T.S.Ponomareva¹, B.B.Atshabar¹, G.B.Zhunosova²,
T.I.Tugambaev¹, A.A.Turuzhanova², S.B.Zakaryan¹, Z.T.Alymkulova¹

Development of a Reagent for Evaluation of Incipient Immune Response to the Live Plague Vaccine

¹M.Aikimbaev Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan; ²Kh.Zhumatov Scientific Center of Hygiene and Epidemiology, Almaty, Republic of Kazakhstan

Objective of the study is to develop a reagent for the detection of lymphocytes with *Yersinia pestis* F1 antigen receptors. **Materials and methods.** Utilized have been: live plague vaccine based on the strain of *Yersinia pestis* EV NIEG, formalin killed suspensions of microorganisms – *Y. pestis*, 3123, *Y. enterocolitica* O9 H-383 serovar, *Y. pseudotuberculosis* O1 2841 serovar; acetaldehyde-immobilized capsular antigen of *Y. pestis* F1 (obtained applying Baker methodology), lipopolysaccharide of *Y. pestis* K1, and bovine erythrocytes. Bovine erythrocyte F1 sensitization has been performed using rivanol. Lymphocytes from blood have been isolated in density gradient ficoll-verografin 1.077. Lymphocytes with *Yersinia pestis* F1 antigen receptors have been detected by means of reagent adhesion onto the isolated lymphocytes. F1-free erythrocytes serve as controls. After the exposition, 7 evaluations of specificity to F1 and the lymphocytes, binding control reagent, have been carried out. Deployed have been 8 rabbits, immunized with live vaccine EV, and 2 rabbits, immunized with inactivated vaccine EV. Examined have been EV-vaccinated 5 persons. **Results and conclusions.** Identified is optimum sensibilizing dose of F1 antigen (250 µg/ml). Specificity of lymphocytes with receptors to F1 is demonstrated in inhibition experiments applying homologous and heterogeneous antigens. Lymphocytes with receptors to F1 (LRs) have been detected in peripheral blood of all rabbits and humans, immunized with vaccine EV. LRs have been registered since day 2 till day 35 in the rabbits, and in humans – since day 2 till day 14 after vaccination. It is shown that in case of revaccination of humans, LRs emerge and disappear earlier, than in case of primary immunization.

Key words: live plague vaccine EV, lymphocytes with receptors to F1 antigens, immunization of humans and rabbits.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Pavel N. Deryabin, e-mail: pderyabin@gmail.com.

Citation: Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Denisova T.G., Ponomareva T.S., Atshabar B.B., Zhunosova G.B., Tugambaev T.I., Turuzhanova A.A., Zakaryan S.B., Alymkulova Z.T. Development of a Reagent for Evaluation of Incipient Immune Response to the Live Plague Vaccine. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:102–106. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-102-106

Для специфической иммунопрофилактики чумы в странах СНГ, в том числе в Казахстане, используется живая чумная вакцина на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ (ЖЧВ) [4, 5]. Адаптивный (антиген специфический) иммунный ответ на вакцинацию включает два периода свое-

го развития: «начальный» и «эффекторный» [1]. Начало антигенспецифического иммунного ответа при вакцинации характеризуется формированием лимфоцитов, имеющих рецепторы к антигену возбудителя (ЛФР) [1]. Этот период иммунного ответа на ЖЧВ практически не изучен. Наиболее часто такие

лимфоциты выявляют адгезивным тестом – связыванием лимфоцитами инертного носителя с сорбированным антигеном возбудителя/иммуногена [1]. Адгезивный тест оценки содержания ЛфР успешно использован при различных инфекционных заболеваниях и при иммунизации людей и животных различными вакцинами [2].

Цель настоящего исследования – разработка реагента для оценки содержания ЛфР к F1 у людей и животных, вакцинированных ЖЧВ.

Материалы и методы

Использовали штаммы микроорганизмов *Yersinia pestis*, EV, *Y. pestis* 3123, *Y. pestis* K1, *Y. enterocolitica* серовара O9 H-383, *Y. pseudotuberculosis* серовара O1 2841, полученные из Республиканской коллекции и депозитария особо опасных микроорганизмов с музеем живых культур Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева (КНЦКЗИ), а также живую чумную вакцину, полученную на основе штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (производства КНЦКЗИ).

Капсульный антиген *Y. pestis* F1 получали по методу Е.Е.Вакер [8] с использованием *Y. pestis* штамма K1, выращенного при 37 °С в течение 48–72 ч на агаре Хоттингера с добавлением 1 % хлористого кальция и 0,5 % гемолизированной крови. Получение использованного капсульного антигена F1 регламентировано Стандартом предприятия (КНЦКЗИ) – СТ 24340-1910-ГП-25-2011. Активность F1 антигена проверяли в РНГА с диагностикумом эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым производства КНЦКЗИ. Чистоту полученного антигена определяли с использованием «Western blot» со стандартной анти-F1-сывороткой (сыворотка чумная агглютинирующая лошадиная производства «Микроб», Саратов, РФ). Полученный антиген представляет собой белок с молекулярным весом 17000 Da, с возможным присутствием незначительных количеств белков с молекулярным весом 34000 и 68000 Da.

В качестве сорбента, связывающего F1, применили фиксированные ацетальдегидом эритроциты быка, спонтанно не связывающиеся с лимфоцитами человека, кролика и морских свинок [3]. Сенсибилизацию эритроцитов F1 осуществляли при помощи риванола [7]. Выделение лимфоцитов из крови проводили в градиенте плотности фиколла-верографин 1,077.

ЛфР определяли методом адгезии реагента на выделенных лимфоцитах при соотношении $1,2 \cdot 10^8$ корпускул реагента на $2 \cdot 10^6$ лимфоцитов. В контроле вместо реагентов специфичности F1 использовали те же эритроциты, не нагруженные F1. После экспозиции выполняли по 7 повторов определений ЛфР специфичности F1 и лимфоцитов, связавших контрольный реагент. Рецепторы к F1 у лимфоцита считали выявленными, если он связывал не менее 3 корпускул реагента. При этом ЛфР в пробе лимфо-

цитов считали выявленными, если их содержание, определенное с тем или иным опытным реагентом, достоверно ($P \leq 0,05$) превышало содержание в той же пробе лимфоцитов, связавших контрольный реагент. По этим данным определяли среднее содержание ЛфР в биопробе лимфоцитов. На протяжении всего опыта использовали одну и ту же серию каждого реагента. Содержание ЛфР и лимфоцитов, связавших контрольный реагент, в суспензии лимфоцитов выражали в процентах. Учет реакции проводили визуальным методом с использованием светового микроскопа «Zeiss» со встроенной подсветкой с иммерсионной системой, при увеличении в 1000 раз (окуляр – $\times 10$, объектив – $\times 100$).

Специфичность разработанного реагента оценивали по ингибции его связывания с лимфоцитами гомо- и гетерологичными антигенами по следующей схеме: в пробирку, содержащую 20 мкл исследуемой взвеси лимфоцитов в концентрации $4 \cdot 10^6$ м.к./мл, добавляли равный объем ингибирующего антигена (в контроле – 0,85 % раствор NaCl). Смесь выдерживали 30 мин при 37 °С. После этого в пробирку вносили F1 реагент и определяли содержание ЛфР, как описано выше. В качестве гомологичного антигена использовали убитую формалином взвесь *Y. pestis* штамма EV, содержащую $2 \cdot 10^9$ м.к./мл, в качестве гетерологичных – аналогично приготовленные взвеси штаммов: дефектного по F1 антигену штамма *Y. pestis* 3123, штаммов *Y. enterocolitica* серовара O9 H-383, *Y. pseudotuberculosis* O1 2841, а также липополисахарид (ЛПС) *Y. pestis* штамма K1.

В работе использованы 10 взрослых самцов кроликов массой 2–2,5 кг. 8 кроликов были иммунизированы внутривенным введением ЖЧВ ($3 \cdot 10^8$ м.к.) в 0,5 мл 0,85 % раствора натрия хлорида и 2 кролика – инактивированной формальдегидом этой же вакциной в той же концентрации. Кровь для исследования была взята из краевой вены уха в пробирку с гепарином (~4 мл). Лимфоциты, выделенные у двух кроликов на 15-е сутки после вакцинации, использовали в опытах по определению оптимальной сенсибилизирующей дозы антигена.

Лимфоциты от 2 кроликов, иммунизированных ЖЧВ, и 2 кроликов, иммунизированных инактивированной формальдегидом вакциной, выделенные на 4-е и 7-е сутки после вакцинации, использовали в опытах по изучению специфичности ЛфР.

Динамику ЛфР изучали на 4 кроликах и 5 здоровых взрослых людях, иммунизированных ЖЧВ. Содержание ЛфР у каждого кролика определяли до и через 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 и 42 сут после иммунизации. Работа с животными проводилась с учетом «Правил проведения работ с экспериментальными животными». Протоколы проведения опытов (№ 6–8) были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии КНЦКЗИ.

Вакцинацию людей проводили в соответствии с утвержденной инструкцией по применению ЖЧВ, скарификацией. 1 доза вакцины содержала $3 \cdot 10^9$ м.к.

Оценка специфичности лимфоцитов с рецепторами к F1

Иммунизация вакциной EV	Сроки исследования**	Содержание ЛфР, %***	Степень ингибиции (в %) при использовании***				
			<i>Y. pestis</i> EV	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pestis</i> 3123	ЛПС <i>Y. pestis</i>
Живая	4	3,21±0,15	23,6±3,6	7,1±4,9	5,4±5,2	5,2±4,5	6,5±5,0
	7	5,29±0,16	36,6±1,8	-3,2±2,2	-2,0±2,6	*7,6±2,5	*7,6±2,5
Инактивированная формалином	4	2,21±0,11	85,7±5,5	5,4±2,8	4,8±3,2	-1,2±4,4	7,1±3,8
	7	3,93±0,13	61,9±3,1	8,9±5,0	8,9±3,3	3,2±2,2	1,4±1,4

*P<0,05. **Количество дней после вакцинации. ***Средняя арифметическая и ее средняя квадратическая ошибка.

Y. pestis EV линии НИИЭГ. Кровь для исследования брали из локтевой вены до вакцинации и через 2, 6, 9, 13, 20, 27, 34, 48 и 62 сут после вакцинации. Все вакцинированные люди относились к декретируемому контингенту лиц, подлежащих вакцинации против чумы, и дали добровольное информированное согласие на использование данных их обследования в научных публикациях.

В работе применяли статистические методы частных сравнений серий. Результат считали значимым при P≤0,05.

Результаты и обсуждение

Выбор оптимальной сенсибилизирующей дозы. Для выбора дозы F1, обеспечивающей оптимальную чувствительность реагентов, фиксированные эритроциты сенсибилизировали растворами, содержащими F1 в концентрациях от 3,9 до 1000,0 мкг/мл. Приготовленные экспериментальные серии реагентов тестировали на лимфоцитах кроликов, выделенных из их крови через 15 сут после иммунизации ЖЧВ. Реагенты всех 9 экспериментальных серий и одной контрольной (эритроциты, не нагруженные антигеном) тестировали параллельно с одной и той же пробой лимфоцитов, выделенных из крови каждого из двух иммунизированных кроликов. Оптимальной сенсибилизирующей дозой считали ту дозу антигена, использование которой обеспечивало способность реагента выявлять в пробе лимфоцитов иммунизированных кроликов максимальное количество ЛфР. Такой дозой оказалась концентрация антигена 250 мкг/мл. В дальнейших исследованиях при получении реагента использовали вышеуказанную дозу антигена.

Оценка специфичности разработанного реагента. На основании экспериментальных результатов рассчитывали степень ингибиции (СИ) – относительный показатель снижения за счет экспозиции с антигеном количества ЛфР в суспензии лимфоцитов

$СИ = -100 - (исхЛфР - эксЛфР) / исхЛфР \cdot 100$,

где исхЛфР – исходное, до экспозиции с антигеном, содержание ЛфР в анализируемой пробе, эксЛфР – выявленное в пробе после экспозиции с ингибитором содержание ЛфР.

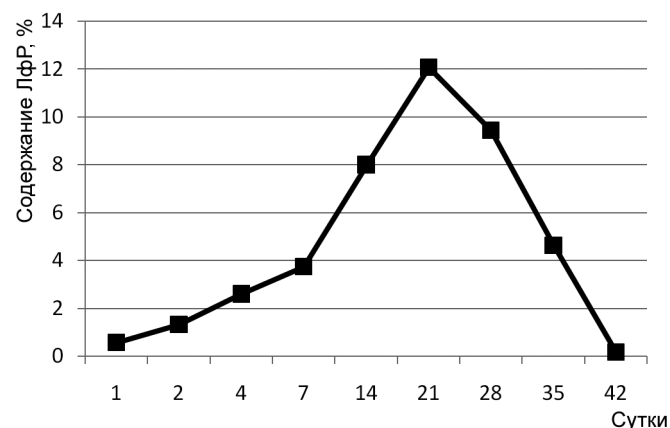
Как видно из табл. 1, при использовании гомологичного антигена (инактивированной формали-

ном взвеси *Y. pestis* EV) наблюдалось выраженное (P<0,05) снижение количества ЛфР к F1 (от 24 до 86 % от исходного уровня), причем при исследовании лимфоцитов кроликов, иммунизированных инактивированной вакциной, это снижение было относительно (P<0,05) большим, чем при исследовании лимфоцитов кроликов, иммунизированных живой вакциной. Что, по-видимому, связано с достоверно (P<0,05) более низким содержанием ЛфР к F1 при иммунизации вакциной, инактивированной формалином. Чем меньше исходное до ингибиции содержание ЛфР в суспензии, тем активнее, при прочих равных условиях, ингибиция выявления ЛфР. При использовании гетерологичных антигенов незначительное снижение (P<0,05) содержания ЛфР к F1 отмечено лишь в двух случаях: при использовании дефектного по F1 штамма *Y. pestis* 3123, и ЛПС *Y. pestis*. В остальных случаях достоверной ингибиции образования ЛфР не было.

Динамика содержания ЛфР у иммунизированных кроликов. Результаты приведены на рисунке. У всех 4 кроликов ЛфР обнаруживались со вторых по 35-е сутки после иммунизации. Максимум их содержания (12,8±0,14 %) был отмечен на 21-е сутки после иммунизации, с 42 сут после иммунизации ЛфР в периферической крови уже не было.

Динамика содержания ЛфР у вакцинированных людей (предварительные данные).

Результаты обследования вакцинированных людей приведены в табл. 2, из которой видно, что до вакцинации ЛфР к F1 не обнаружены ни у одного из



Зависимость содержания ЛфР от срока иммунизации кроликов

Таблица 2

Динамика лимфоцитов с рецепторами к F1 у вакцинированных людей

№ вакцинируемого	Вакцинация	Количество ЛфР к F1 и его средняя квадратическая ошибка, %					
		до вакцинации	после вакцинации через сут				
			2	6	9	13	20
1	Повторная	0,14±0,14	*6,43±0,30	*6,71±0,18	*19,0±0,31	0,14±0,14	0,29±0,18
2	Первичная	0,43±0,20	0,14±0,14	*11,71±0,29	*14,00±0,22	*2,29±0,18	0,43±0,20
3	Повторная	0,71±0,18	*18,29±0,47	*6,29±0,29	*5,86±0,14	*3,86±0,22	0,14±0,14
4	Первичная	0,29±0,18	*4,00±0,22	*13,57±0,37	*9,29±0,29	*3,29±0,18	0,14±0,14
5	Повторная	0,29±0,18	*15,29±0,18	*15,86±0,14	*9,71±0,36	*1,71±0,18	0±0

*Содержание ЛфР к F1 достоверно ($P<0,05$) больше содержания лимфоцитов, связавших контрольный реагент.

5 обследованных людей, хотя трое из них были вакцинированы ранее. После вакцинации ЛФР к F1 выявлены у всех вакцинированных людей. Обнаружено различие в динамике ЛфР у людей, вакцинированных впервые раз и повторно. При первичной вакцинации ЛфР на 2-е сутки после вакцинации обнаружены только у одного из вакцинированных (4,0 %), а при повторной вакцинации – у всех трех человек. Их содержание было достоверно ($P<0,05$) более высоким (от 6 до 18 %). Не исключено, что у ревакцинированных ЛфР появляются в периферической крови уже в первые сутки после иммунизации. Максимальное содержание ЛфР у повторно вакцинированных было значимо ($P<0,05$) большим (от 16 до 19 %), чем у первично вакцинированных (от 9 до 14 %). У двух из трех людей, вакцинированных вторично, и обоих лиц, вакцинированных первично, ЛфР обнаруживались до 13 сут после вакцинации. При этом содержание ЛфР у первично вакцинированных людей было больше, чем у повторно вакцинированных. На 20-е и в последующие сутки после вакцинации ЛфР в периферической крови не определялись.

Для получения реагента, обеспечивающего выявление ЛфР, характеризующих начальную стадию иммунного ответа, был выбран капсульный антиген F1 *Y. pestis*. Этот антиген присутствует в большинстве вакцин для профилактики чумы, в составе микробных клеток или в виде рекомбинантного белка [6, 9, 10]. Следовательно, данный реагент можно будет использовать для оценки начальной стадии поствакцинального ответа не только при использовании ЖЧВ. Исследования по ингибции взаимодействия разработанного реагента с лимфоцитами показали его высокую специфичность по отношению к использованному антигену (F1). Лишь в двух случаях из двадцати (табл. 1) была выявлена небольшая ингибция гетерологичными препаратами: взвесью дефектного по F1 штамма *Y. pestis* и ЛПС *Y. pestis*. Очевидно, что в этих двух продуктах сохраняются следовые количества F1. Принципиально важно, что степень ингибции гомологичным антигеном взаимодействия ЛфР с разработанным реагентом всегда существенно более высокая, чем гетерологичными.

Изучение динамики ЛфР у кроликов и людей, вакцинированных ЖЧВ, показало, что ЛфР к F1 в

периферической крови появляются очень рано, особенно при повторной вакцинации, уже на 2-е сутки после вакцинации. Эти данные соответствуют срокам выявления ЛфР на других моделях вакцинации и при различных заболеваниях [2]. При обследовании вакцинированных людей отмечено различие в динамике и содержании ЛфР при первичной и повторной вакцинации. Хотя, учитывая малочисленность обследованных групп, исследование будет продолжено. Применение разработанного реагента позволит в дальнейшем изучить влияние начального периода на эффекторный период адаптивного иммунного ответа на ЖЧВ и ее протективную активность.

Таким образом, разработан реагент для определения лимфоцитов с рецепторами к капсульному антигену F1 *Yersinia pestis*. Применение разработанного реагента в реакции адгезии позволяет определять такие лимфоциты после иммунизации живой и инактивированной чумной вакциной. В опытах ингибции гомологичным и рядом гетерологичных антигенов показана специфичность выявления лимфоцитов с рецепторами к F1 реагенту. У вакцинированных живой чумной вакциной кроликов и людей ЛфР к F1 обнаружены в периферической крови уже на 2-е сутки после иммунизации.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каральник Б.В., Денисова Т.Г. Иммуномодуляция как путь изучения иммунорегуляторных функций антигенсвязывающих лимфоцитов. *Аллергол. и иммунол.* 2011; 12(1):54–5.
2. Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Жунусова Г.Б., Березин В.Е. Антигенсвязывающие лимфоциты в динамике иммунного ответа на бактериальные, вирусные и аутоантигены. *Известия Министерства образования и науки Республики Казахстан, Национальной Академии наук Республики Казахстан. Сер. биологическая и медицинская.* 2001; 5:37–43.
3. Каральник Б.В., Лещинская Л.Ц. Способ определения е-розеткообразующих клеток. А.с. 862919 СССР, опубл. 15.09.1981, Бюл. 34. 30 с.
4. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз; 1956. 207 с.
5. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):18–24.
6. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Кутырев В.В. Современные тенденции в конструировании рекомбинантных вакцин для специфической профилактики чумы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; 3:116–26.

7. Шамардин В.А., Каральник Б.В. Сенсибилизация эритроцитов иммуноглобулинами. Методические рекомендации. Алма-Ата; 1981. 12 с.

8. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

9. Feodorova V.A., Motin V.L. Plague vaccines. In: Vaccines against bacterial biothreat pathogens. India; 2011. P. 175–233.

10. Williamson E., Flick-Smith Y., LeButt C. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and rV antigens. *Infect. Immun.* 2005; 73:3598–3608. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3598-3608.2005.

References

1. Karal'nik B.V., Denisova T.G. [Immune-modulation as a means to investigate immune-regulatory functions of antigen-binding lymphocytes]. *Allergol. Immunol.* 2011; 12(1):54–5.

2. Karal'nik B.V., Deryabin P.N., Denisova T.G., Zhunusova G.B., Berezin V.E. [Antigen-binding lymphocytes in the dynamics of immune response to bacterial, viral and auto-immune antigens]. *Bulletin of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Biological and medical Series.* 2001; 5:37–43.

3. Karal'nik B.V., Leshchinskaya L.Ts. [Method of e-rosette forming cells detection]. A.c. 862919 USSR, 15.09.1981. 30 p.

4. Korobkova E.I. [Live Plague Vaccine]. M.: Medgiz; 1956. 207 p.

5. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):18–24.

6. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Kutyrev V.V. [Current trends in development of recombinant vaccines for specific prophylaxis of plague]. *Zh.*

Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2015; 3:116–26.

7. Shamardin V.A., Karal'nik B.V. [Sensibilization of erythrocytes with the help of immunoglobulins]. Methodological recommendations. Alma-Ata; 1981. 12 p.

8. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

9. Feodorova V.A., Motin V.L. Plague vaccines. In: Vaccines against bacterial biothreat pathogens. India; 2011. P. 175–233.

10. Williamson E., Flick-Smith Y., LeButt C. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and rV antigens. *Infect. Immun.* 2005; 73:3598–3608. DOI: 10.1128/IAI.73.6.3598-3608.2005.

Authors:

Deryabin P.N., Ponomareva T.S., Atshabar B.B., Tugambaev T.I., Zakaryan S.B., Alymkulova Z.T. M.Aikimbaev Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Infections. 14, Kupalskaya St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: pderyabin@gmail.com.

Karal'nik B.V., Denisova T.G., Zhunusova G.B., Turuzhanova A.A. Kh.Zhumatov Scientific Center of Hygiene and Epidemiology. Almaty, Republic of Kazakhstan.

Об авторах:

Дерябин П.Н., Пономарева Т.С., Атишбар Б.Б., Тугамбаев Т.И., Закарян С.Б., Алымкулова З.Т. Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций имени М.Айкимбаева. Республика Казахстан, 050054, Алматы, ул. Капальская, 14. E-mail: pderyabin@gmail.com.

Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Жунусова Г.Б., Туружанова А.А. Научный центр гигиены и эпидемиологии имени Х.Жуматова. Республика Казахстан, Алматы.

Поступила 15.12.15.

Л.В.Саяпина, В.П.Бондарев, Ю.В.Олефир

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В работе рассматриваются проблемы обращения вакцинных штаммов *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА, используемых в изготовлении живых вакцин против особо опасных инфекций, в связи с отсутствием нормативно правового документа, в котором прописан алгоритм хранения и движения штаммов после их изготовления на протяжении срока годности (10 лет). Показано, что в сложившихся условиях нарушена система обращения и порядка учета движения вакцинных штаммов против особо опасных инфекций, что привело к нарушению межведомственного взаимодействия по передаче, изучению, поддержанию и хранению очередных изготовленных серий.

Ключевые слова: вакцинные штаммы *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА, нормативно-правовая база.

Корреспондирующий автор: Саяпина Лидия Васильевна, e-mail: Sayapina@expmed.ru

L.V.Sayapina, V.P.Bondarev, Yu.V.Olefir

Current State of the Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections

Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

Considered are the problems of handling of the vaccine strains *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, and *Brucella abortus* 19 ВА, utilized for manufacturing of live vaccines against particularly dangerous infections, in connection with absence of normative legal document, specifying the algorithm for storage and handling of strains after production stage throughout the shelf-life (10 years). It is indicated that under current conditions the system of handling and record keeping on the transfer of strains of vaccines against particularly dangerous infections is compromised. It has led to disruption of interdepartmental cooperation in the transfer, testing, maintenance, and storage of the latest manufactured batches.

Key words: vaccine strains *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, and *Brucella abortus* 19 ВА, legal and regulatory framework.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Lidia V. Sayapina, e-mail: Sayapina@expmed.ru.

Citation: Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. Current State of the Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 2:107–110. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110

В настоящее время специфическая профилактика особо опасных инфекций (чума, сибирская язва, туляремия, бруцеллез) в Российской Федерации осуществляется в соответствии с Национальным календарем прививок по эпидемическим показаниям.

Вакцина чумная живая производится Ставропольским НИПЧИ и 48 Центральным научно-исследовательским институтом Министерства обороны Российской Федерации (48 ЦНИИ МО РФ); вакцина сибиреязвенная живая – 48 ЦНИИ МО РФ. Производственные площадки вакцин туляреминой и бруцеллезной живых расположены в филиале НПО «Микроген» Минздрава России, Омск.

Вакцины против особо опасных инфекций (ООИ) изготавливаются по Промышленным регламентам, которые устанавливают порядок изготовления и контроля их качества, обеспечивающие получение препарата, соответствующего требованиям нормативной документации (ГФ XIII, ч. 3, 2013; Фармакопейная статья предприятия) и своему назначению.

Для изготовления живых вакцин используют-

ся вакцинные штаммы *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА, которые относятся к III группе патогенности. В системе обеспечения качества живых вакцин особое внимание уделяется сохранению жизнеспособности и стабильности основных биологических свойств вакцинных штаммов в процессе их хранения, которые должны быть типичными по культуральным, морфологическим, биохимическим, генетическим, серологическим и иммунобиологическим свойствам [4, 5, 6].

До апреля 2011 г. Промышленные регламенты на живые вакцины против ООИ утверждались руководителями учреждений-производителей и согласовались в ГИСК им. Л.А.Тарасевича. В результате реорганизации, в соответствии с Распоряжением Правительства Российской Федерации № 2058-р от 17 ноября 2010 г., ФГУН «ГИСК им. Л.А.Тарасевича» присоединен к ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и с 1 апреля 2011 г. является его структурным подразделением.

В настоящее время контроль за соблюдением ли-

цензионных требований при осуществлении деятельности по производству лекарственных средств для медицинского применения (Приказ Минпромторга России № 877 от 7 июня 2013 г.) и правил организации производства контроля качества лекарственных средств (Приказ Минпромторга России от 14 июня 2013 г. № 916) осуществляет Министерство промышленности и торговли Российской Федерации, а государственный контроль за качеством иммунобиологических лекарственных препаратов – служба Росздравнадзора.

Указанные выше штаммы с 40-х годов прошлого столетия и по настоящее время хранятся и поддерживаются в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ГИСК им. Л.А.Тарасевича, ныне ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

При производстве живых вакцин следует учитывать, что длительное использование вакцинного штамма может привести к изменению его основных свойств, что повлияет на качество вакцин, используемых для специфической профилактики, а в некоторых случаях и потере штамма. За продолжительный период времени использования живых вакцинных штаммов против ООИ ученым и производителям вакцин приходилось неоднократно восстанавливать их иммуногенную активность.

Известно, что в 1950–1960-х годах было выявлено снижение иммуногенных свойств штамма *Y. pestis* EV, использовавшегося в производстве чумной вакцины. При проведении в ВНИПЧИ «Микроб» (ныне РосНИПЧИ «Микроб») работ по восстановлению иммуногенных свойств штамма *Y. pestis* EV, наиболее стабильной и иммуногенной была признана линия НИИЭГ. Приказом Минздрава СССР № 118 от 21 марта 1960 г., для производства вакцины чумной живой используется вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ.

В начале 1950-х годов производство сибирезавенной вакцины на основе штамма *B. anthracis* СТИ-1 передано из Санитарно-технического института Министерства обороны в Министерство здравоохранения СССР. Начиная с 1962 г. сибирезавенную вакцину готовили на основе штамма *B. anthracis* СТИ-1 в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток (НИИВС, Тбилиси).

Однако в 1992 г. при освоении производства вакцины на базе 48 ЦНИИ МО РФ выявлено, что культура штамма *B. anthracis* СТИ-1, полученная из НИИВС, в процессе длительного хранения и многократных пересевов на питательные среды изменила свои культурально-морфологические и иммунобиологические свойства. Для восстановления иммуногенных свойств штамма проводились работы путем пассажа микробной культуры через организм восприимчивого животного (морские свинки) [3, 9].

В производстве живой туляремийной вакцины в 1930-х годах использовался штамм *F. tularensis* «Москва». Впоследствии данный штамм был ут-

рян. В 1940-х годах Н.А.Гайский получил штамм *F. tularensis* 15, обладающий высокой иммуногенностью [2]. Однако использование его на протяжении ряда лет без должного изучения свойств привело к практически полной утрате его иммуногенности. Для восстановления иммуногенных свойств потребовалось проводить пассирование штамма через организм животных. В дальнейшем данный штамм использовался в производстве как «штамм *F. tularensis* 15-восстановленный». На протяжении долгих лет применения штамм *F. tularensis* 15 несколько раз подвергался восстановлению иммуногенных свойств (1950, 1960, 2003 гг.) и получил название *F. tularensis* 15 НИИЭГ [7, 8]. Производство вакцины на основе штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ было разрешено приказом МЗ РСФСР от 25 мая 1963 г. на двух площадках по производству бактериальных препаратов – в Омске и Одессе, с 1992 г. – в Омске.

Производство живой бруцеллезной вакцины на основе штамма *B. abortus* 19 ВА было освоено в Санитарно-техническом институте Министерства обороны СССР в 1940-х годах, а затем передано Министерству здравоохранения СССР. Производство живой бруцеллезной вакцины налажено в 1963 г. на базе Омского предприятия по производству бактериальных препаратов (Приказ Минздрава РСФСР № 148 от 1963 г.).

В соответствии с разделом «Производственные штаммы микроорганизмов» Промышленных регламентов изготовление и изучение свойств вакцинных штаммов необходимо было проводить в учреждении-производителе вакцин и специализированной лаборатории ГИСК им. Л.А.Тарасевича. В период срока хранения (10 лет) вакцинные штаммы перед началом каждого производственного цикла изготовления вакцин изучали на двух базах. По результатам проведенных исследований составлялись Протоколы, подтверждающие возможность использования данных штаммов в производстве живых вакцин против ООИ.

В Промышленных регламентах и Фармакопейных статьях предприятия на вакцины против ООИ был прописан порядок получения вакцинных штаммов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ныне ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России), где было указано, что производители вакцин перед началом производственного цикла должны получать вакцинные штаммы по запросу в установленном порядке.

В сложившихся условиях установленная ранее система обращения и порядка учета движения производственных живых вакцинных штаммов против особо опасных инфекций перестала работать, что привело к нарушению межведомственного взаимодействия по передаче, изучению, поддержанию и хранению очередных изготовленных серий (таблица).

Вместе с тем необходимо отметить, что по истечении срока годности живых вакцинных штаммов

**Состояние вакцинных штаммов против ООИ на I кв. 2016 г.
в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России**

Наименование штамма (3 группа патогенности)	Год изготовления	Год изготовления новой серии	Количество ампул в Госколлекции микроорганизмов «НЦЭСМП»	Количество ампул у производителя вакцины	Используемый штамм при изготовлении вакцины	Год последнего изучения штамма в «НЦЭСМП»
<i>Yersinia pestis</i> EV НИИЭГ	2008	2018	9	0	«НЦЭСМП»	2011
<i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1	2004	2014	0	Приготовленная серия	«48 ЦНИИ МО РФ»	2011
<i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ	2003		25	0		2010
	2012	Брак по контаминации посторонней микрофлорой (НЦЭСМП)	Уничтожен	0		
	2013		78	Сведения отсутствуют	НПО «Микроген» (филиал в Омске)	2013
<i>Brucella abortus</i> 19 BA	2007	2017	51	0	«НЦЭСМП»	2010

вновь изготовленные серии остаются на производственной площадке и изучаются только производителями, что является неконтролируемым процессом, который может привести к потере основных свойств вакцинных штаммов и изготовлению вакцин, не соответствующих своему назначению.

В связи с окончанием срока годности и запасов вакцинного штамма, изготовленного в 2003 г., в филиале НПО «Микроген» (Омск) в 2012 г. была изготовлена очередная серия штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, которая, по данным производителей, соответствовала требованиям Промышленного регламента на вакцину туляремию живую. Однако при оценке качества в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России данная серия была забракована по показателю «Отсутствие посторонней микрофлоры и грибов».

Новая серия штамма, изготовленная в 2013 г., по данным производителей и ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по всем регламентированным показателям соответствовала установленным требованиям и была признана пригодной для производства живой туляреминой вакцины.

В современных условиях возникают трудности при решении вопроса о сохранности изготовленного штамма, о его поддержании и изучении, так как производители считают вакцинные штаммы «авторскими» и не желают передавать их в государственную коллекцию микроорганизмов III–IV групп патогенности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, где данные штаммы депонированы.

В то же время практика показывает, что для своевременного предупреждения изменения основных свойств вакцинных штаммов, использующихся в производстве вакцин против ООИ, изучение их иммунобиологических свойств необходимо проводить не только на базе учреждения-производителя, но и на базе профильного учреждения, т.е. должно быть независимым [1, 10, 11, 12].

Несмотря на большие достижения в совершенствовании профилактики инфекционных болезней и конструировании новых вакцинных штаммов против ООИ, в том числе рекомбинантных, ни один из предложенных штаммов не прошел в установленном

порядке доклинические испытания, не говоря уже о проведении клинических испытаний для их признания в качестве кандидатов в вакцинные штаммы. Восстановление же иммуногенности производственных штаммов против ООИ или разработка новых вакцинных штаммов потребует много средств и участия квалифицированного персонала.

Следует обратить внимание на то, что в сложившихся условиях из-за отсутствия нормативно-правовой базы нарушен порядок обращения вакцинных штаммов между учреждениями различных ведомств. Вместе с тем сохранность свойств вакцинных штаммов, использующихся при изготовлении вакцин против ООИ, в надлежащем состоянии обеспечивает санитарно-эпидемиологическое благополучие населения РФ как в обычных условиях, так и при террористических актах с применением биологического оружия, или при возникновении других чрезвычайных ситуаций.

Вопросы, требующие решения:

- отсутствует документ, в котором прописан алгоритм хранения и движения чумного, сибиреязвенного, туляреминого, бруцеллезного вакцинных штаммов после их изготовления и изучения на протяжении срока годности (10 лет) для производителей вакцин и контролирующих учреждений различных ведомств;

- рассматривается возможность закрытия производства туляреминой и бруцеллезной вакцин в НПО «Микроген» (филиал в Омске) и введение новой производственной площадки на базе НПО «Вирион» (филиал в Томске), в котором отсутствуют специалисты, имеющие опыт работы с туляреминым и бруцеллезным микробами;

- вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, изготовленный в 2013 г., изучается и хранится только в НПО «Микроген» (филиал в Омске) и используется для изготовления туляреминой вакцины уже на двух базах;

- вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1, изготовленный в 2014 г. и использующийся для изготовления сибиреязвенной вакцины в настоящее время, изучен и хранится только в 48 ЦНИИ Минобороны;

- в 2016 г. заканчивается запас штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и планируется изготовление новой серии. Какова будет его дальнейшая судьба на сегодняшний день не известно.

- в связи с отсутствием лицензии на осуществление деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, с 2011 г. в ФГБУ «НЦЭСМП» не проводится оценка качества вакцин и вакцинных штаммов против ООИ по показателю «Иммуногенность».

- несовершенство нормативно-правовой базы по обеспечению сохранности вакцинных штаммов и недопустимости производства одного наименования препарата на основе различных линий вакцинных штаммов может привести к снижению основных иммуногенных свойств штаммов, а в худшем случае – их утрате.

Для улучшения обращения живых вакцинных штаммов в нормативно-правовом поле необходимо:

- разработать нормативно-правовую базу по обращению и контролю вакцинных штаммов для учреждений различных ведомств;

- установить порядок передачи и хранения вакцинных штаммов, который следует закрепить в соответствующих руководящих документах;

- прописать алгоритм использования вакцинных штаммов при изготовлении вакцин против ООИ, выпускающихся разными производителями и учреждением, осуществляющим их хранение и поддержание.

- утвердить на федеральном уровне разработанные методические рекомендации «Порядок изготовления, изучения, хранения и поддержания вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ», (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФБУН «ГНЦ ПМБ»).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Опыт использования антигенов *Yersinia pestis* для разработки чумной химической вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106): 47–50.
2. Олсуфьев Н.Г., Емельянова О.С., Угловой Г.П., Салтыков Р.А., Сиротюк Л.В., Сильченко В.С., Капцын М.С., Левачева З.А., Кочуркова С.А., Бобылкова Т.В., Баранчиков В.Д., Веденева Е.В., Егорова Л.С., Иванов В.С., Баранова Н.К., Денисова В.Д., Шельмовер Р.С., Хомутова Н.В., Куперыб Г.Г., Панышева М.Д., Пелехова К.И., Красицкая З.И., Назарова М.Г., Красникова Е.И., Штучная А.А., Владимирова А.И., Коржева В.С. Сравнительные испытания на людях вариантов вакцинного туляремийного штамма 15 Гайского. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 1971; 5:55–7.
3. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., Васильев Н.Т., Бондарев В.П., Борисевич И.В., Дармов И.В., Горин О.В., Воробьев А.А., Пятков В.А., Шевцов А.Н., Сероглазов В.В., Крючков А.В., Луб М.Ю. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты: руководство для врачей. М.: Медицина; 2010.
4. Основные требования к вакцинным штаммам сибирезавенного микроба для иммунизации людей: МУ 3.3.1.1112-02. М.: Минздрав России; 2002. С. 47.
5. Основные требования к вакцинным штаммам туляремийного микроба: МУ 3.3.1.2161-07. М.: Минздрав России; 2007. С. 51.
6. Основные требования к вакцинным штаммам чумного

микроба: МУ 3.3.1.1113-02. М.: Минздрав России; 2002. С. 65.

7. Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горьев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:87–91.

8. Соловьев Е.А., Саяпина Л.В., Давыдов Д.С., Осина Н.А., Бондарев В.П. Изучение фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 4:83–7.

9. Супотницкий М.В., Борисевич И.В., Климов В.И., Шевцов А.Н., Луб М.Ю., Туманов А.С. Роль российских и советских ученых в разработке сибирезавенных вакцин. *Биопрепараты.* 2015; 2(54): 46–52.

10. Mann B.J., Ark N.M. Rationally designed tularemia vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8(7):877–85. DOI: 10.1586/erv.09.51.

11. Hall J.D., Woolard M.D., Gunn B.M., Craven R.R., Taft-Benz S., Frelinger J.A., Kawula T.H. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect. Immun.* 2008; 76:5843–52. DOI: 10.1128/IAI.01176-08.

12. Thomas R.M., Titball R.W., Oyston P.C., Griffin K., Waters E., Hitchen P.G., Michell S.L., Grice I.D., Wilson J.C., Prior J.L. The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies tularensis and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect. Immun.* 2007; 75:371–8. DOI: 10.1128/IAI.01241-06.

References

1. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. [The experience of application of *Yersinia pestis* antigens for plague chemical vaccine development]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4:47–50.
2. Olsuf'ev N.G., Emel'yanova O.S., Uglovoy G.P., Saltykov R.A., Sirotyuk L.V., Sil'chenko V.S., Kaptsyn M.S., Levacheva Z.A., Kochurkova S.A., Bobylkova T.V., Baranchikov V.D., Vedeneva E.V., Egorova L.S., Ivanov V.S., Baranova N.K., Denisova V.D., Shel'mover R.S., Khomutova N.V., Kutseryb G.G., Panyшева M.D., Pelekhova K.I., Krasitskaya Z.I., Nazarova M.G., Krasnikova E.I., Shtuchnaya A.A., Vladimirova A.I., Korzheva V.S. [Comparative tests of the vaccine tularemia strain 15 NIEG in humans]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1971; 5:55–7.
3. Onishchenko G.G., Kozhukhov V.V., Vasil'ev N.T., Bondarev V.P., Borisevich I.V., Darmov I.V., Gorin O.V., Vorob'ev A.A., Pyatkov V.A., Shevtsov A.N., Seroglazov V.V., Kryuchkov A.V., Lub M.Yu. [Anthrax: Topical Issues of Development and Introduction of Medical Protectors: Guidelines for Medical Officers]. M.: Meditsina; 2010.
4. [Essential requirements to vaccine strains of anthrax agent for immunization of humans]. MR 3.3.1.1112-02. M.: RF Ministry of Health; 2002. P. 47.
5. [Essential requirements to vaccine strains of tularemia microbe]. MR 3.3.1.2161-07. M.: RF Ministry of Health; 2007. P. 51.
6. [Essential requirements to vaccine strains of plague microbe]. MR 3.3.1.1113-02. M.: RF Ministry of Health; 2002. P. 65.
7. Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. [Studies of immunobiological properties in *Francisella tularensis* vaccine strain 15 NIEG under extended storage conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:87–91.
8. Solov'ev E.A., Sayapina L.V., Osina N.A., Davydov D.S., Bondarev V.P. [Characteristics of phenotypic and genetic properties of *Francisella tularensis* 15 NIEG vaccine strain with an extended storage period]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 4:91–5.
9. Supotnitsky M.V., Borisevich I.V., Klimov V.I., Shevtsov A.N., Lub M.Yu., Tumanov A.S. [The role of the Russian and Soviet researchers in the development of anthrax vaccines]. *Biopreparaty.* 2015; 2(54):46–52.
10. Mann B.J., Ark N.M. Rationally designed tularemia vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2009; 8(7):877–85. DOI: 10.1586/erv.09.51.
11. Hall J.D., Woolard M.D., Gunn B.M., Craven R.R., Taft-Benz S., Frelinger J.A., Kawula T.H. Infected-host-cell repertoire and cellular response in the lung following inhalation of *Francisella tularensis* Schu S4, LVS, or U112. *Infect. Immun.* 2008; 76:5843–52. DOI: 10.1128/IAI.01176-08.
12. Thomas R.M., Titball R.W., Oyston P.C., Griffin K., Waters E., Hitchen P.G., Michell S.L., Grice I.D., Wilson J.C., Prior J.L. The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies tularensis and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect. Immun.* 2007; 75:371–8. DOI: 10.1128/IAI.01241-06.

Authors:

Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: Sayapina@expmed.ru.

Об авторах:

Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8. E-mail: Sayapina@expmed.ru.

Поступила 08.04.16.