

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

Главный редактор член-корреспондент РАМН,
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 1(107)

март · 2011

САРАТОВ

Адрес редакции:

410005, Саратов,
ул. Университетская, 46
Тел. (845-2) 51-82-22
Факс (845-2) 51-52-12
E-mail: microbe@san.ru
www.microbe.ru

Зав. редакцией Л.С.Пронина

Тел. (845-2) 51-82-22

Редактор *Т.А.Докалина*

Технический редактор
Т.К.Меркулова

Перевод на английский
*Т.Б.Караваевой,
Н.А.Лушиной,
А.Ю.Мощиной*

Подписано в печать 09.03.11
Формат 60×88 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 10,29
Гарнитура Таймс
Заказ 257

Подписной индекс – 24687

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

ISSN 0370-1069. Пробл. особо
опасных инф. 2011. Вып. 107. 1–84

Журнал отпечатан
в ООО «ИППОЛит-XXI век»
410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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,
М.Н.Ляпин, канд. мед. наук,
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор,
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор,
Л.В.Самойлова, докт. мед. наук, профессор,
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук,
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор,
Т.М.Тараненко, докт. биол. наук, профессор,
В.П.Топорков, докт. мед. наук,
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.В.Алексеев, докт. мед. наук, профессор (Волгоград),
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва),
С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск),
И.В.Борисевич, докт. мед. наук, профессор (Москва),
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, профессор (Оболensk),
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь),
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Саратов),
Ю.М.Ломов, докт. мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону),
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад),
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной
справочной системе по периодическим и продолжающимся
изданиям «Ulrich's Periodicals Directory»*

*Электронные версии статей размещены на сайте
Научной электронной библиотеки (www.e-library.ru)*

© Федеральное государственное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2011

**Problemy
osobo opasnyh infekcij**

ISSN 0370-1069

**Problems
of Particularly Dangerous Infections**

СОДЕРЖАНИЕ

Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях

5

Обзоры, прогнозы

Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Харченко Т.В., Ермаков А.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по Крымской геморрагической лихорадке на юге России в 2010 г. и прогноз на 2011 г.

13

Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Арешина О.А., Адаменко О.Л. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз

16

Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнева С.И., Рusanова Д.В., Куличенко А.Н. Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г.

20

Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Андаев Е.И., Чеснокова М.В. Заболеваемость населения Сибирского и Дальневосточного федеральных округов инфекциями, передающимися клещами, в 2009–2010 гг. и прогноз на 2011 г.

24

Окунев Л.П., Мазепа А.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в природных очагах туляремии Сибирского и Дальневосточного федеральных округов в 2010 г. и прогноз на 2011 г.

29

Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержущий Д.Б., Малецкая О.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Горшенко В.В., Попов В.П., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г.

31

Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Мананков В.В., Погасий Н.И., Злепко А.В., Чайка А.Н., Крючкова Т.П., Савченко С.Т., Жуков К.В. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 г.

38

Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Аксенова Л.Ю., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Российской Федерации: анализ заболеваемости в 2010 г., прогноз на 2011 г.

42

Микробиология

Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера

46

Горяев А.А., Заднова С.П., Шубина А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Измененные варианты возбудителя холеры, выделенные на территории Российской Федерации

49

CONTENTS

Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. Cholera Specific Prophylaxis in Modern Conditions

Reviews, Prognoses

Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Tokhov Yu.M., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A., Kharchenko T.V., Ermakov A.V., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) in the South of Russia in 2010 and Prognosis for the Year of 2011

Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Areshina O.A., Adamenko O.L. Assessment of Cholera Epidemiological Situation in the World in the Present Period. Prognosis

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Epizootiological and Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2010 and Prognosis for 2011

Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Andaev E.I., Chesnokova M.V. Tick-Borne Infections Incidence among the Population of Siberian and Far East Federal Districts in 2009 and 2010 and Prognosis for 2011

Okunev L.P., Mazepa A.V. Epizootiological and Epidemiological Situation in the Tularemia Natural Foci of Siberian and Far East Federal Districts in 2010 and Prognosis for 2011

Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Maletskaya O.V., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Gorshenko V.V., Popov V.P., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kuttyrev V.V. Epizootic Activity of Plague Natural Foci in the Russian Federation in 2010 and Prognosis for 2011

Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V., Smelyansky V.P., Antonov V.A., Manankov V.V., Pogasiy N.I., Zlepko A.V., Chaika A.N., Kryuchkova T.P., Savchenko S.T., Zhukov K.V. Dissemination of the West Nile Fever in the Russian Federation and in the World in 2010

Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Akseanova L.Yu., Golovinskaya T.M., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation on Anthrax in the Russian Federation: Analysis of Morbidity in 2010, Prognosis for 2011

Microbiology

Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. PCR Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies Using One Primer

Goryaev A.A., Zadnova S.P., Shubina A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Altered Variants of Cholera Agent Isolated in the Territory of the Russian Federation

Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции

53

Осин А.В., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма MLST-типирования пандемических и предпандемических штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор

58

Диагностика

Топорков А.В., Кологоров А.И., Топорков В.П., Щербак С.А., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Осина Н.А., Кутырев В.В. Принципы стандартизации эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, новых и возвращающихся инфекционных болезней

62

Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхолдери

66

Иммунология

Агеев С.А., Шайхутдинова Р.З., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Конструирование кандидата в вакцинные штаммы *Yersinia pestis* с пониженной реактогенностью

70

Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Кравцов А.Л., Кузнецова Е.М., Волох О.А., Никифоров А.К. ДНК-цитометрия иммунокомпетентных клеток биомоделей в условиях иммунизации препаратами С-комплекса туляремийного микроба различных подвидов

74

Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека

77

Краткие сообщения

Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В., Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Колосова Н.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф. Применение методов латекс-агглютинации и иммунохроматографии для ускоренной идентификации культур *Bacillus anthracis* при эпидемиологических расследованиях вспышек

81

Информация

О Всероссийском семинаре зоологов по вопросам совершенствования эпизоотологического обеспечения эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации

83

Памяти коллеги

Памяти Бориса Федоровича Семенова (1929–2010)

84

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. Antibiotic-Resistant Strains of Plague Agent and Development of Procedure for Their Detection by PCR Method

Ossin A.V., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Smirnova N.I. Elaboration of the Algorithm of MLST-Typing of Pandemic and Pre-Pandemic *V. cholerae* El Tor strains

Diagnostics

Toporkov A.V., Kologorov A.I., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Sharova I.N., Osina N.A., Kutyrev V.V. Principles of Standardization of Epidemiological and Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous, Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases

Khrapova N.P., Alekseev V.V., Korsakova I.I., Drefs N.M., Lomova L.V., Bulatova T.V., Napalkova G.M. Application of Glanders and Melioidosis Monoclonal Antibodies of Different Epitope Specificity for Pathogenic Burcholderia Detection and Identification

Immunology

Ageev S.A., Shaikhutdinova R.Z., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Construction of Candidate *Yersinia pestis* Vaccine Strains with Reduced Reactogenicity

Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Kravtsov A.L., Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Nikiforov A.K. DNA Cytometry of Immunocompetent Cells of Biomodels under Conditions of Immunization by S-Complex Preparations of Different Tularemia Microbe Subspecies

Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Shchukovskaya T.N. Influence of the Anti-Plague Vaccination on the Functional Activity of Human Innate Immunity Cells

Brief Communications

Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Rodzikovsky A.V., Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Kolosova N.V., Rudnitsky S.Yu., Solov'ev P.V., Baranova E.V., Biketov S.F. Application of Latex Agglutination and Immune Chromatography Methods for Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Cultures in the Epidemiological Investigation of Outbreaks

Information

About the All-Russian Workshop of Zoologists on the Questions of Improving of Epizootologic Provision of Epidemiological Surveillance of Natural-Focal Infectious Diseases in the Territory of the Russian Federation

Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Boris Feodorovich Semenov (1929–2010)

Г.Г.Онищенко¹, В.В.Кутырев², Т.Н.Щуковская², Н.И.Смирнова², А.К.Никифоров²,
С.А.Еремин², В.П.Топорков²

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ХОЛЕРЫ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Описана эпидемиологическая ситуация по холере в мире и Российской Федерации. Отмечено, что одной из причин ее осложнения является возникновение в современный период измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара eltor с повышенной вирулентностью, которые вытеснили типичные штаммы во многих странах Азии и Африки. Описаны лицензированные оральные холерные вакцины и их профилактическая эффективность. Рассмотрена стратегия ВОЗ относительно применения оральных холерных вакцин при чрезвычайных ситуациях различного характера. Представлены перспективы разработки вакцин нового поколения.

Ключевые слова: холера, измененный вариант биовара eltor, специфическая профилактика, холерные вакцины.

На современном этапе холера продолжает оставаться одной из актуальных, социально-значимых и имеющих международное значение особо опасных инфекционных болезней, единичные случаи и вспышки которой в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и Санитарно-эпидемиологическими правилами «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (2008 г.) рассматриваются как чрезвычайная ситуация.

Холера (cholera) относится к группе антропонозов и является опасной острой кишечной инфекцией с фекально-оральным механизмом заражения, пищевым, водным и контактно-бытовым путями распространения, возбудители которой токсигенные холерные вибрионы O1 и O139 серологических групп (*V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139) отнесены к микроорганизмам II группы патогенности (опасности) [6].

Ведущими клиническими симптомами холеры являются диарея и рвота, которые очень быстро приводят к развитию токсикоза с эксикозом вплоть до тяжелого обезвоживания, угрожающего жизни больного. Выраженная гипокалиемия, метаболический ацидоз и микроциркуляторные нарушения приводят к развитию осложнений: нарушений функции миокарда, пареза кишечника и острой почечной недостаточности, результатом которых становятся летальные исходы при холере [5, 8].

В настоящее время продолжается 7-я пандемия холеры, в течение которой (с 1961 по 2010 год) можно выделить три периода, свидетельствующие о тенденции расширения территориального распространения этой болезни в странах мирового сообщества, росте числа общего количества больных и заносных случаев болезни. На рис. 1 показано, что на начальном этапе 7-й пандемии (1961–1969 гг.) холера имела ограниченное распространение преимущественно в странах Азии (21 страна). В следующий период (1970–1990 гг.), наряду со странами Азии, в процесс распространения холеры были вовлечены страны Африканского континента. Заболевания отмече-

ны также в странах Европы, Австралии, Океании и Северной Америки (всего 109 стран). В современный период, начавшийся с 1991 г., холера поразила также страны Америки.

В этот период количество больных и заносов болезни по сравнению с начальным периодом 7-й пандемии холеры превысило соответственно более чем в 10 и 16 раз. Приведенная на рис. 1 динамика числа пораженных стран, числа больных, количества заносных случаев холеры косвенно свидетельствуют о том, что каждый из периодов пандемии холеры был обусловлен определенным клоном возбудителя при тенденции возрастания его вирулентности. Такой ход пандемии является эпидемиологическим обоснованием необходимости усиления контроля холеры – применяемого комплекса экстренных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по локализации и ликвидации эпидемических очагов холеры и санитарной охраны территорий мерами специфической профилактики этой болезни, т.е. вакцинацией контингентов риска.

Одним из важных моментов 7-й пандемии холеры является формирование стойких и временных вторичных эндемичных очагов с ежегодными сезонными подъемами заболеваемости и выносами на другие территории. К 2007 г. в 5 странах Южной, Юго-Западной и Центральной Азии (Индия, Бангладеш, Иран, Афганистан, Китай), 20 странах Восточного (Бурунди, Замбия, Малави, Мозамбик, Танзания, Уганда, Кения, Руанда, Зимбабве), Центрального (Заир, Камерун) и Западного (Гана, Гвинея, Либерия, Нигер, Нигерия, Того, Сенегал, Кот-д'Ивуар, Мавритания) регионов Африки сформировались временные и стойкие эндемичные очаги, где холера ежегодно регистрируется от пяти до десяти и свыше десяти лет соответственно [3].

Ситуация по холере осложняется происходящими в мире природными и техногенными катастрофами. В настоящее время продолжается крупная вспышка холеры на пострадавшей от землетрясения территории Гаити, где только в г. Порт-о-Пренс, сто-

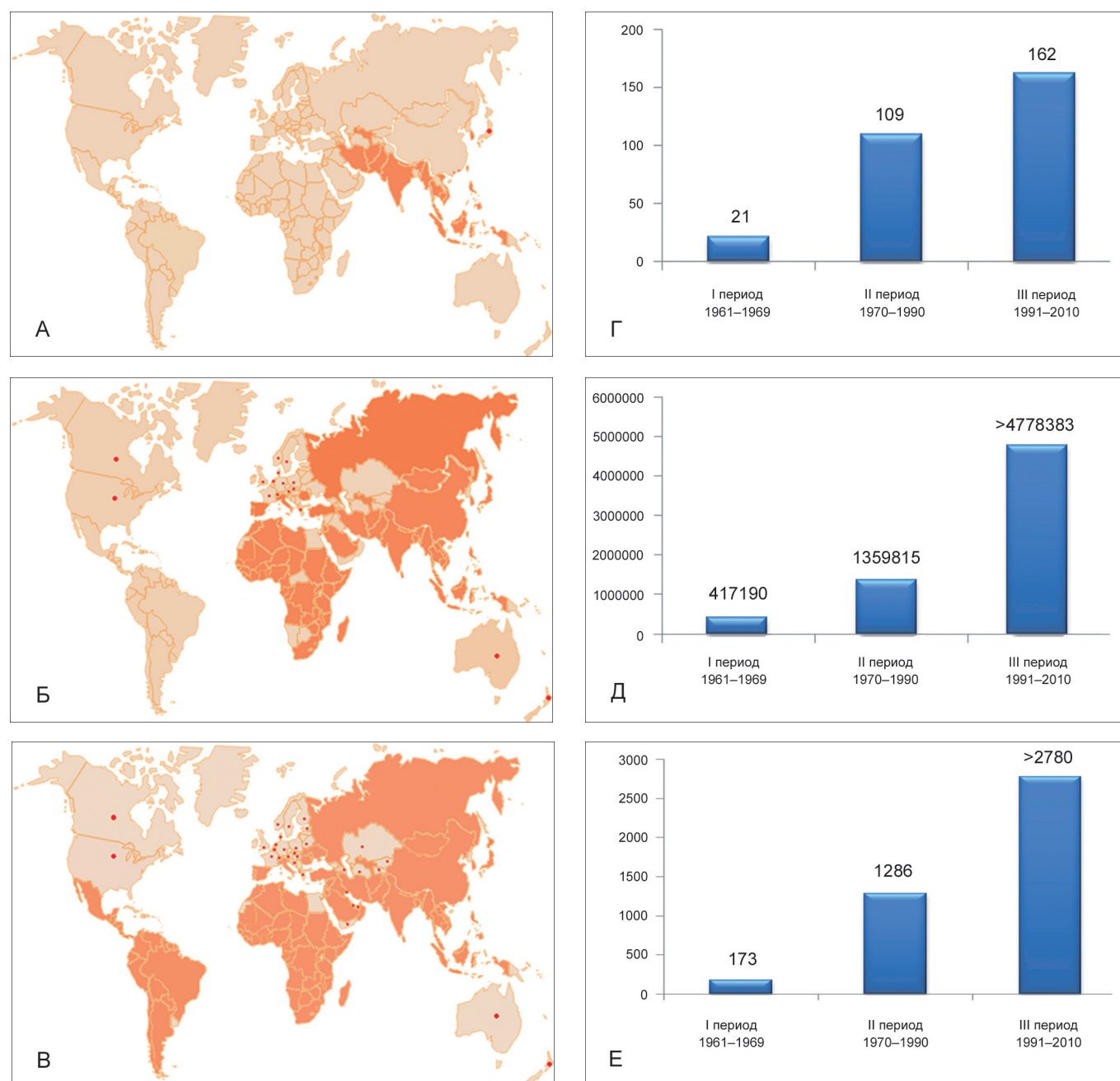


Рис. 1. Характеристика трех периодов распространения седьмой пандемии холеры:

А – I период (1961–1969), Б – II период (1970–1990), В – III период (1991–2010), розовым цветом выделены пораженные территории, точки красного цвета – заносные случаи.

Г – динамика числа стран, где были зарегистрированы вспышки и завозные случаи холеры,

Д – динамика числа больных холерой по периодам 7-й пандемии, Е – динамика числа завозных случаев холеры по периодам 7-й пандемии

лице Гаити, 1,3 млн людей проживают в лагерях для беженцев в антисанитарных условиях [17, 39, 40].

На 09.03.2011 г. здесь зарегистрировано 248442 случая холеры, из них – 4627 летальных исходов. Высокий темп роста заболеваемости холерой на Гаити и распространение эпидемии этой болезни в Доминиканскую республику (1300 случаев) и Венесуэлу (452 случая), заносы ее в США (9 случаев) и Канаду (1 случай) при установленном измененном варианте возбудителя холеры с повышенной вирулентностью, не позволяют исключить возможность начала восьмой пандемии холеры. С другой стороны, указанные события на Гаити можно трактовать эпи-

демиологическими особенностями третьего периода ее 7-й пандемии.

С 1992 г. в Индии и Бангладеш постоянно имеют место вспышки холеры, обусловленные *V. cholerae* O139 серогруппы (Бенгал) [1]. Зарегистрированы завозы холеры Бенгал в страны Европы: Эстонию, Германию, Великобританию, Данию, Францию, Россию; Азии: Японию Китай, Шри-Ланку, Казахстан, Кыргызстан, Узбекистан, а также США. Однако прогноз о возможном начале 8-й пандемии холеры, обусловленной *V. cholerae* O139 серогруппы (Бенгал), в настоящее время не подтверждается [1, 30].

В современный период в эндемичных очагах хо-

лерной инфекции (Юго-Восточная Азия и Африка) возникли атипичные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор с повышенной вирулентностью [12, 28]. Такие штаммы были обозначены как измененные варианты [7, 18, 19].

Различия между типичными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор и измененными вариантами состоят в разной нуклеотидной последовательности СТХ и связанного с продукцией холерного токсина (ХТ) [16]. Геном типичных вирулентных штаммов содержит гены $ctxB^{Eltor}$, тогда как у измененных вариантов присутствует ген $ctxB^{Class}$. Разная нуклеотидная последовательность генов $ctxB^{Class}$ и $ctxB^{Eltor}$ определяет неодинаковую аминокислотную последовательность В-субъединиц их токсинов. Вследствие этого различают ХТ классического (или 1-го) типа, продуцируемый классическими вибрионами, и ХТ эльтор (или 2-го) типа, характерный для вибрионов эльтор. Показано, что измененные варианты, не отличаясь по диагностически значимым фенотипическим и генетическим признакам от типичных изолятов, продуцируют ХТ классического типа. При этом уровень биосинтеза ХТ у них заметно выше по сравнению с типичными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор, что, в свою очередь, приводит к повышению их вирулентности. Повышенная вирулентность выражается в том, что они вызывают более тяжелые клинические формы холеры и определяют более высокие показатели смертности, достигающие до 20 % от числа заболевших [19, 35].

Измененные варианты имеют высокий пандемический потенциал, вследствие чего к настоящему времени они вытеснили типичный возбудитель холеры эльтор во многих странах Азии и Африки [7, 18, 35]. Более того, установлено, что начиная с 1993 г. эпидемические осложнения на территории Российской Федерации (эпидемические вспышки и единичные случаи заболеваний) были вызваны измененными вариантами *V. cholerae* O1 биовара эльтор, продуцирующими холерный классический токсин [7].

Следует особо отметить тот факт, что штамм *V. cholerae* O1 серовара Огава биовара эльтор, вызвавший эпидемию холеры на Гаити в 2010–2011 гг., также является измененным вариантом, завезенным, видимо, на территорию этой страны из Южной Азии [11, 18, 21]. Проведенные исследования показали, что для генома гаитянского штамма характерны три следующие особенности. Во-первых, в гене $ctxB$, кодирующем В-субъединицу ХТ, присутствуют три мутации, две из которых определяют продукцию этим штаммом холерного токсина классического типа. Третья мутация характерна для штаммов возбудителя холеры, циркулирующих на территории Южной Азии. Во-вторых, в его хромосоме имеются дополнительные гены устойчивости к антибиотикам в составе СТХ-генетического элемента. В-третьих, его остров пандемичности VSP-2 является дефектным из-за делеции ряда генов [10, 11, 26]. В связи с

этим высказано предположение, что за счет возникших мутаций в геноме новые штаммы возбудителя холеры могут вытеснить резидентные эпидемически опасные штаммы *V. cholerae* O1 биовара эльтор в Латинской Америке, а также могут быть занесены в любую страну мира, включая и Российскую Федерацию. Таким образом, вполне очевидно, что сложившаяся ситуация требует совершенствования профилактических препаратов.

В настоящее время заболеваемость холерой в мире продолжает оставаться на высоком уровне и может приводить к значительным социальным и экономическим потерям, поглощая ресурсы здравоохранения. Согласно официальным данным, переданным в ВОЗ, за последние 3 года ежегодно регистрировалось 178000–237000 случаев холеры и 4000–6300 летальных исходов. Однако с учетом большого числа не представленных, по тем или иным причинам, во Всемирную организацию здравоохранения официальных сведений, реальная заболеваемость холерой, по оценке ВОЗ, составляет 3–5 млн случаев в год, от которой ежегодно умирает более 120000 человек [13]. Несмотря на большие усилия, направленные на обеспечение в эндемичных регионах населения чистой водой, и улучшение санитарно-эпидемиологической обстановки, тенденция к уменьшению заболеваемости холерой не прослеживается [36, 39].

Эпидемиологическая обстановка по холере в России на период 7-й пандемии обусловлена завозом инфекции из-за рубежа, что связано с миграцией населения, установлением регулярных туристических, экономических связей с зарубежными странами, неблагоприятными по этой инфекции [3, 4].

Все вышеизложенное диктует необходимость оценить с новых позиций потребность в проведении массовой вакцинации против холеры и её обеспечение в современных условиях. Последние эпидемии холеры показали, что продолжает оставаться существенная потребность в эффективной экономической вакцине против холеры. По мере накопления знаний, понимания роли и важности мукозального иммунитета в формировании защиты против холеры приоритетную позицию заняли оральные холерные вакцины. Анализ эпидемиологической эффективности убитых холерных вакцин при парентеральном введении показал, что она составляла не более 50 % [9]. На данном этапе применение парентеральных холерных вакцин не рекомендовано ВОЗ [33].

В настоящее время за рубежом лицензированными являются только три вакцины. Все они относительно дешевы и просты в применении.

Первая из них – оральная холерная вакцина WC-rBS (**Dukoral**® SBL, Швеция) – убитая цельноклеточная обогащенная рекомбинантной В-субъединицей холерного энтеротоксина. Начиная с 1991 г. вакцина **Dukoral** была лицензирована более чем в 60 странах и прошла предварительную оценку ВОЗ для возможной ее закупки Организацией объединенных наций (ООН) [39].

Вакцина **Dukoral** состоит из убитых формалином или нагреванием клеток *V. cholerae* O1 группы обоих биоваров и сероваров и В-субъединицы холерного токсина, полученной с использованием генетической рекомбинантной технологии. Пероральная вакцинация для возрастных групп от 6 лет и выше проводится по двукратной схеме с интервалом в 7–14 дней, но не превышающим 6 недель. Вакцинация детей от 2 до 5 лет осуществляется по трехкратной схеме с интервалом ≥ 7 дней, но менее чем 6 недель между приемом вакцины. Исключают употребление пищи и воды за 1 ч до и после вакцинации. В случае превышения интервала между 2-й и 3-й дозами свыше 6 недель схему вакцинации повторяют полностью, начиная с 1-й дозы. Для предотвращения разрушения В-субъединицы при низких значениях pH (кислая среда желудка) вакцину разводят в 150 мл воды в смеси с бикарбонатным буфером, для детей от 2 до 5 лет – в 75 мл. Развитие напряженного иммунитета наблюдается уже через неделю после последнего введения препарата.

Вакцина **Dukoral** остается стабильной в течение 3–4 лет хранения при 2–8 °C и в течение 1 мес. при 37 °C [13].

Еще две лицензированные бивалентные вакцины: **Shanchol** (Shantha Biotechnics), **mORCVAX** (VaBiotech) состоят только из убитых клеток *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп без В-субъединицы холерного токсина. Оригинальная вакцина ORCVAX была разработана и лицензирована только во Вьетнаме в 1997 г. За период с 1998 по 2009 год более 20 млн доз данной вакцины были применены для иммунизации детей во Вьетнаме на территориях с повышенным риском возникновения холеры, тем самым подтверждая право первенства массового применения убитой оральной холерной вакцины в качестве средства специфической профилактики холеры на эндемичных территориях [13]. В рамках сотрудничества с Международным институтом вакцин (Сеул, Республика Корея), Фондом Билла и Мелинды Гейтс, Правительствами Швеции и Республики Корея, препарат ORCVAX в 2004 г. был доработан в соответствии с требованиями ВОЗ и правилами GMP. Изначально применявшийся для изготовления вакцины высокотоксигенный штамм *V. cholerae* O1 был заменен двумя штаммами *V. cholerae*, используемыми в производстве вакцины **Dukoral**. По успешным результатам 2-й фазы клинических испытаний в Индии и Вьетнаме данная вакцина в 2009 г. была лицензирована как **mORCVAX** только для Вьетнама и как **Shanchol** для Индии с выходом на международный рынок. Обе вакцины остаются стабильными в течение 2 лет хранения при 2–8 °C [13, 14, 31, 42].

Shanchol выпускается в жидком виде во флаконах, содержащих 1 и 5 доз вакцины. Пероральная вакцинация для возрастных групп от 1 года и выше проводится по двукратной схеме с интервалом в 14 дней.

Выпуск ранее лицензированной оральной жи-

вой холерной вакцины CVD 103-HgR (**Orochol** или **Mutacol**) был прекращен в 2004 г., а ее производитель Berna Biotech (Switzerland) перешел на выпуск WC-rBS (**Dukoral**) [22, 29].

На состоявшемся в Каире 14–16 декабря 2005 г. совещании ВОЗ по вопросам современной стратегии применения оральных холерных вакцин при чрезвычайных ситуациях, стихийных бедствиях и катастрофах, а также в эндемичных очагах холеры был проанализирован опыт проведенных компаний массовой вакцинации населения в Дарфуре (Судан, 2004), Асех (Индонезия, 2005), Бейре (Мозамбик, 2004) [41].

Профилактическая эффективность оральной холерной вакциной WC-rBS (**Dukoral**® SBL, Швеция) как среди взрослого населения, так и детей младше 5 лет в эндемичном очаге холеры в Бейре (Мозамбик) составила 78 %. Отмечено, что данная вакцина была высокоэффективна у ВИЧ-инфицированных [24]. Установлена взаимосвязь массовой вакцинации населения оральной холерной вакциной WC-rBS (**Dukoral**)® на определенной территории со значительным снижением заболеваемости холерой на территориях, вокруг зоны вакцинации [15].

С применением математического моделирования I.M.Longini и др. [23] была обоснована возможность применения массовой вакцинации населения оральными холерными вакцинами на эндемичных территориях в системе контроля за холерой. По их данным, снижение уровня заболеваемости холерой на эндемичных территориях до ≤ 1 случая на 1000 населения может быть достигнуто вакцинацией с применением оральных холерных вакцин 50–70 % населения, проживающего на данных территориях, с периодичностью в 2 года и учетом восприимчивости его к холерной инфекции.

Профилактическая эффективность выпускаемых лицензированных вакцин WC-rBS (**Dukoral**® SBL, Швеция) и **Shanchol** (Shantha Biotechnics)/**mORCVAX** (VaBiotech) через 4–6 мес., 1 и 2 года после вакцинации составляет 86–66, 62–45 и 77–58 % соответственно.

В Российской Федерации на базе ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» лицензировано производство вакцины холерной бивалентной химической, которая представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* O1 классического биовара штаммов 569 В или KM-76 (569 pCO107-2) серовара Инаба и М-41 серовара Огава, путем выделения, очистки и концентрирования серно-кислым аммонием.

Препарат представляет собой таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой. Вакцинацию проводят перорально однократно. Одна прививочная доза для взрослых составляет 3 таблетки, для детей в возрасте от 2 до 10 лет – 1 таблетку, от 11 до 17 лет – 2 таблетки, которые принимают за 1 ч до еды. Препарат слабореактогенен. Вакцина обеспечивает у привитых выработку противохолерного антибак-

териального и антитоксического иммунитета длительностью до 6 мес. Ревакцинацию проводят через 6–7 мес. после вакцинации; доза для взрослых и подростков составляет 2 таблетки, для детей 2–10 лет – 1 таблетку.

Вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

Согласно разработанным ВОЗ рекомендациям, применение оральных холерных вакцин требует дифференцированного подхода в зависимости от конкретной ситуации. При чрезвычайных ситуациях различного характера целесообразность проведения противохолерной вакцинации основывается на оценке риска первоочередности возникновения вспышки холеры, имеющихся социально-экономических условий для ее ликвидации и возможности осуществления кампании массовой иммунизации. Рекомендован трехступенчатый алгоритм принятия решений о применении оральных холерных вакцин (ОХВ) в чрезвычайных ситуациях (рис. 2) [41].

Предлагаемые ВОЗ рекомендации по использованию оральных холерных вакцин в эндемичных очагах холеры предполагают их применение в комплексе с мероприятиями, предусмотренными существующей в мире системой контроля за холерой [27]. На территориях, где регистрируются заболевания холерой, вызванные *V. cholerae* O139, в состав холерной вакцины для массовой иммунизации должен входить O139 компонент. В качестве одного из вариантов стратегии вакцинации в эндемичных по холере странах предложено включение оральных холерных вакцин в Глобальную программу по иммунизации (Expanded Programme on Immunization – EPI) [34, 41].

Опыт применения оральных холерных вакцин при чрезвычайных ситуациях в Индонезии (2005 г.), Пакистане (2005 г.) показал сложности материально-технического обеспечения кампаний массовой вакцинации населения (доставка питьевой воды, соблюдение холодовой цепи, вес и габариты необходимого

количества вакцины, двукратная схема иммунизации). В этой связи ВОЗ рекомендовано создание холерной вакцины, удовлетворяющей ее использование в различных чрезвычайных ситуациях: однократное введение, не требующее питьевой воды или буфера; отсутствие холодовой цепи; возможность введения детям младше 2 лет, создание продолжительного напряженного иммунитета [41].

Неблагоприятное развитие вспышки холеры на Гаити в условиях социально-экономического коллапса, вызванного произошедшими в начале 2010 г. стихийными бедствиями (землетрясением, тропическим ураганом) поставило на повестку дня вопрос о необходимости и возможности проведения кампании массовой вакцинации населения против холеры, особенно на территориях, еще не охваченных данной инфекцией. По данным экспертов ВОЗ, в настоящее время в наличии имеется всего 400000 доз оральной холерной вакцины, которые могут быть поставлены с заводов-производителей. В результате этого крупномасштабная вакцинация населения, находящегося в группе риска, просто невозможна, т.к. согласно схеме приема, необходимо вводить 2–3 дозы вакцины каждому. Глобальное сокращение числа холерных вакцин усиливает необходимость срочного создания их резерва и расширения производства дешевых и простых в применении эффективных оральных холерных вакцин [13, 17, 39].

Перспективы разработки холерных вакцин.

С внедрением в практику достижений современной молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии появилась возможность конструирования эффективных безопасных холерных вакцин нового поколения для перорального применения. Выделяются два ведущих направления, в рамках которых проводятся основные исследования. Первое из них связано с созданием живых вакцин, второе ориентировано на разработку безопасных высокоэффективных неживых вакцин (химических, конъюгированных, вакцин на основе технологии получения так называемых «те-ней», то есть пустых клеток грамотрицательных бак-

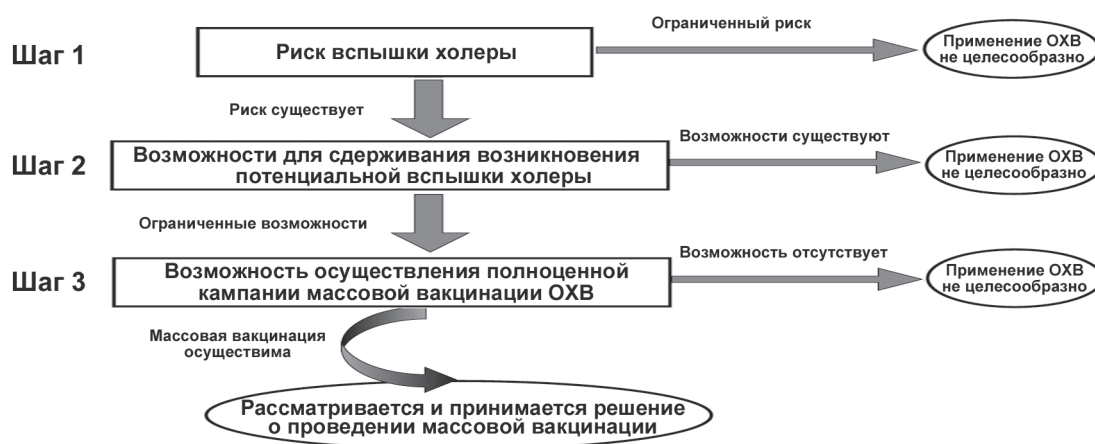


Рис. 2. Алгоритм принятия решений о применении оральных холерных вакцин (ОХВ) в чрезвычайных ситуациях [41]

терий; трансгенных вакцин и др.).

Ряд кандидатов в живые вакцины разработан в США (Peru-15, CVD-111,112), на Кубе (*V. cholerae* 638, Cuban Finley Institute), в Китае (*V. cholerae* JEM 109) и находятся на стадии доклинических и клинических прелицензионных испытаний [30, 34]. Проведенный М.М.Левине [22] анализ иммуногенности и эффективности живых холерных вакцин у населения развивающихся странах, проживающего в низких социально-экономических условиях и использующего для своего жизнеобеспечения контаминированные сопутствующей микрофлорой воду и пищу, выявил связь имеющейся флогенной активации иммунной системы, ассоциированной с желудочно-кишечным трактом, с формированием слабого иммунного ответа или отсутствием такового, что ведет к повышению прививочной дозы и вероятности развития побочных реакций.

В процессе производства, транспортировки, хранения, применения живых вакцин необходимо строгое соблюдение мер, предохраняющих микроорганизмы от отмирания и гарантирующих сохранение активности препаратов, в первую очередь холодовой цепи, что ограничивает их применение в странах с жарким климатом [34]. Полностью не исключена потенциальная возможность реверсии их вирулентности за счет горизонтального переноса генов и генетической рекомбинации [43]. Кроме того, возрастание удельного веса людей с проявлениями иммуносупрессии делает использование живых вакцин менее привлекательным [26].

В настоящее время актуальными являются исследования, направленные на разработку высокоэффективных неживых холерных вакцин.

На основе конъюгата капсульного полисахарида *V. cholerae* O139 с рекомбинантным мутантом дифтерийного токсина CRMH21G создана холерная вакцина, эффективность которой подтверждена лабораторными исследованиями [20]. Т. Wade и др. [38] получен вакцинирующий препарат, представляющий собой конъюгат *V. cholerae* O1 (серовара Огава и Инаба) специфических полисахаридов (моно-, ди- и гексасахаридов) с рекомбинантным экзотоксином А (rEPA) *Pseudomonas aeruginosa*.

Ведутся работы по созданию нового поколения холерных убитых вакцин на основе генно-инженерных штаммов. Сконструирован штамм *V. cholerae* O1 – гиперпродукент В-субъединицы холерного токсина, у которого в результате разрушения *epsE* гена вместо секреции в культуральную среду происходит аккумуляция продуцируемой В-субъединицы холерного токсина в периплазматическом пространстве. Инактивация таких клеток формалином или путем нагревания позволит получить вакцинирующий препарат, аналогичный холерной вакцине WC-rBS (Dukoral®, SBL, Швеция), убитой цельноклеточной обогащенной рекомбинантной В-субъединицей холерного токсина [32].

Перспективным в современной вакцинологии

является создание вакцин на основе трансгенных растений. Немаловажное значение имеет высокая экономичность растительных вакцин. В Японии создана трансгенная мукозальная холерная вакцина для перорального применения на основе риса, экспрессирующего В-субъединицу холерного токсина, которая не требует соблюдения холодовой цепи и остается стабильной в течение 1,5 лет в условиях хранения при комнатной температуре [25]. Иммунизация данной вакциной экспериментальных биомоделей индуцирует высокий уровень продукции антигенспецифического секреторного IgA и формирование напряженного протективного иммунитета [37].

В условиях напряженной эпидемиологической обстановки в мире одним из приоритетных направлений деятельности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека является совершенствование профилактики инфекционных болезней, санитарной охраны территории Российской Федерации для обеспечения эпидемиологического благополучия населения путем повышения эффективности организационных, профилактических и противоэпидемических мероприятий. Научное обеспечение профилактики инфекционных болезней предусматривает создание новых и усовершенствование существующих отечественных вакцин против инфекционных болезней, включая особо опасные. В этой связи разработка и усовершенствование современных безопасных химических вакцин против холеры, вызванной *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, для перорального способа введения и создание универсальной технологии их производства является важным и перспективным направлением научных исследований.

Кроме того, конструирование холерных вакцин нового поколения диктует необходимость разработки новых и усовершенствования существующих критериев оценки их качества и безопасности.

Проводимая во ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» модернизация производства холерной химической таблетированной вакцины на основе внедрения новейших производственных биотехнологий с применением сконструированных в РосНИПЧИ «Микроб» и запатентованных авирулентных генно-инженерных штаммов-продуцентов основных протективных антигенов холерного вибриона (соматического O1-антигена сероваров Инаба и Огава, O139 антигена, В-субъединицы холерного токсина) позволит в полном объеме обеспечить биологическую безопасность технологических процессов, увеличить объем производства холерной таблетированной вакцины, повысить эффективность и качество выпускаемого для специфической профилактики холеры препарата, способного инициировать у привитых формирование протективного иммунитета против заражения всеми известными эпидемически опасными штаммами возбудителя холеры.

Работа выполнена в рамках реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации

от 2 октября 2009 г. № 1426-р по осуществлению мер по борьбе и профилактике тропических болезней по направлению «Разработка современных безопасных химических вакцин против холеры и создание универсальной технологии их производства».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Безмертвый В.Е. и др. Холера в мире, странах СНГ и России: эпидемиологическая обстановка (1998–2007). Холера и патогенные для человека вибрионы. 2008; 21:13–5.
2. Международные медико-санитарные правила. Женева: ВОЗ; 2005.
3. Москвитина Э.А. Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):22–6.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д. и др. Санитарная охрана территории Российской Федерации: современное нормативно-методическое, организационное и научное обеспечение. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):5–11.
5. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 816 с.
6. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)»: СП 1.3.1285-03. Бюлл. нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
7. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2010; 4:11–9.
8. Учайкин В.Ф., Шамиева О.В. Руководство по клинической вакцинологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006. 592 с.
9. Щуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. 2009; 2(45):62–7.
10. Burrus V., Marrero J., Waldor M.K. The current ICE age: biology and evolution of STX-related integrating conjugative elements. Plasmid. 2006; 55:173–83.
11. Chin C.S., Sorenson J., Jason B. et al. The Origin of the Haitian cholera outbreak strain. N. Engl. J. Med. 2011; 364:33–42.
12. Cholera, 2009. Wkly Epidemiol Rec. 2010; 85(13):117–28.
13. Cholera vaccines: WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2010; 85(31):293–308.
14. Cholera vaccines: WHO position paper – Recommendations. Vaccine. 2010; 28:4687–88.
15. Emch M., Ali M., Park J.K. et al. Relationship between neighbourhood-level killed oral cholera vaccine coverage and protective efficacy: evidence for herd immunity. Int. J. Epidemiol. 2006; 35:1044–50.
16. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.
17. Harris J.B., LaRocque R.C., Charles R.C., Mazumder R.N., Khan A.I., Bardhan P.K. Cholera's western front. Lancet. 2010; 376(9757):1961–5.
18. Goel A.K., Jain M., Kumar P. et al. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor causing cholera in India. J. Infect. 2008; 57:280–1.
19. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E. et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. J. Bacteriol. 2010; 192:3524–33.
20. Kossaczka Z., Shiloach J., Jonson V. et al. *Vibrio cholerae* O139 conjugate vaccines: synthesis and immunogenicity of *V. cholerae* O139 capsular polysaccharide conjugates with recombinant diphtheria toxin mutant in mice. Infect. Immun. 2000; 68(9):5037–43.
21. Lam C., Octavia S., Reeves P., Wang L., Lan R. Evolution of seventh cholera pandemic and origin of 1991 epidemic, Latin America. Emerg. Infect. Dis. 2010; 16:1130–2.
22. Levine M.M. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. BMC Biol. 2010; 8:129.
23. Longini I.M., Nizam A., Ali M. et al. Controlling endemic cholera with oral vaccines. PLoS Medicine. 2007; 4(11):e336.
24. Lucas M.E.S., Deen J.L., von Seidlein L. et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. N. Engl. J. Med. 2005; 352:757–67.
25. Nochi T., Takagi H., Yuki Y. et al. Rice-based mucosal vaccine as global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007; 104:10986–91.
26. Novel vaccination strategies. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2004. 628 p.
27. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on immunization, October 2009 – conclusions and recommendations. Wkly Epidemiol Rec. 2009; 84(50):517–32.
28. Nair G.B., Faruque S.M., Shuiyan N.A. et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3296–9.
29. Olsson L., Parment P.A. Present and future cholera vaccines. Expert Rev. Vaccines. 2006; 5(6):751–2.
30. Qadri F., Chowdhury M.I., Faruque S.M. et al. Randomized, controlled study of the safety and immunogenicity of Peru-15, a live attenuated oral vaccine candidate for cholera, in adult volunteers in Bangladesh. J. Infect. Diseases. 2005; 192:573–9.
31. Ramamurthy T., Wagoner D., Chowdhury G., Majumder P.P. A large study on immunological response to a whole-cell killed oral vaccine reveals that there are significant geographical differences in response and that of O blood group individuals do not elicit a higher response. Clin. Vaccine Immunol. 2010; 17(8):1232–7.
32. Rhie G., Jung H., Park J. et al. Construction of cholera toxin B subunit-producing *Vibrio cholerae* strains using the *Mariner*-FRT transposon delivery system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008; 52:23–8.
33. Tacket C.O., Sack D.A. Cholera vaccines. Ch. 9. In: Plotkin S.A., Orenstein W.A., Offit P.A., editors. Vaccines. Elsevier; 2008. P. 127–38.
34. Seidlein L. Vaccines for cholera control: does herd immunity play a role? PLoS Medicine. 2007; 4(11):e331.
35. Siddique A.K., Nair G.B., Alam M. et al. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. Epidem. Infect. 2010; 138:347–52.
36. Sur D., Nair B.G., Lopez A.N., Clemens J.D., Katoch V., Ganguly N.R. Oral cholera vaccines – a call for action. Indian J. Med. Res. 2010; 131:1–3.
37. Tokuhara D., Yuki Y., Nochi T. et al. Secretory IgA-mediated protection against *V. cholerae* and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* by rice-based vaccine Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010; 107(19):8794–9.
38. Wade T., Sacksena R., Shiloach J. et al. Immunogenicity of synthetic saccharide fragments of *V. cholerae* O1 (Ogawa and Inaba) bound to Exotoxin A. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006; 48:237–51.
39. Waldor M.K., Hotez P.J., Clemens J.D. A national cholera vaccine stockpile – a new humanitarian and diplomatic resource. N. Engl. J. Med. 2010; 363(24):2279–82.
40. WHO/CDS/NTD/IDM/2006.1. Use of the two-dose oral cholera vaccine in the context of a major natural disaster. Report of a mass vaccination campaign in Aceh Province, Indonesia, 2005. WHO; 2005. 36 p.
41. WHO/CDS/NTD/IDM/2006.2. Oral cholera vaccine use in complex emergencies: what next? Report of a WHO meeting. Cairo, Egypt, 14–16 December. WHO; 2005. 14 p.
42. Widdow R. Vaccine innovation done differently. Bull. World Health Organ. 2010; 88:880.
43. Wu J.-Y., Wade W.F., Taylor R.K. Evaluation of cholera vaccines formulated with toxin-correlated pilin peptide plus polymer adjuvant in mice. Infect. Immun. 2001; 69(12):7695–702.

G.G. Onishchenko, V.V. Kutyrev, T.N. Shchukovskaya, N.I. Smirnova,
A.K. Nikiforov, S.A. Eremin, V.P. Toporkov

Cholera Specific Prophylaxis in Modern Conditions

Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights
Protection and Human Welfare, Moscow; Russian Research Anti-Plague
Institute "Microbe", Saratov

Described is cholera epidemiological situation in the world and in the Russian Federation. One of the causes of its deterioration is pointed out to be the emergence, in the modern period, of altered *Vibrio cholerae* eltor variants with increased virulence, which displaced typical strains in many countries of Asia and Africa. Described are licensed oral cholera vaccines and their prophylactic efficiency. Considered is the WHO strategy in regard with oral cholera vaccines application in emergencies of different character. The prospects of new generation vaccines development are presented.

Key words: cholera, altered eltor variant, specific prophylaxis, cholera vaccines.

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

1. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Безмертвый В.Е. et al. [Cholera in the World, CIS countries and Russia: Epidemiological Situation (1998–2007)]. Cholera and Human Pathogenic Vibrios. 2008; 21:13–5.
2. [International Health Regulations]. Geneva: WHO; 2005.

3. *Moskvitina E.A.* [Current Trends in the Evolution of the Seventh Cholera Pandemics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):22–6.
4. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Krivulya S.D. et al.* [Sanitary Protection of the Territories of the Russian Federation: Up-Dated Normative and Methodological, Organizational and Scientific Support]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 93:5–11.
5. *Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K.* [Infectious Diseases and Epidemiology]. M.: GEOTAR-Media, 2007. 816 p.
6. [Sanitary and Epidemiological Regulations “Safety of Work with the Microorganisms of I–II Pathogenicity (Hazard) Groups”: SR 1.3.1285-03]. *Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor*, 2003; 3(13):61–144.
7. *Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V.* [The Evolution of the *Vibrio cholerae* Genome in the Modern Period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.
8. *Uchaikin V.F., Shamsheva O.V.* [Manual of Clinical Vaccinology]. M.: GEOTAR-Media; 2006. 592 p.
9. *Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V.* [Vaccine Prophylaxis of Cholera: Modern Condition of the Problem]. *Epidemiol. Vaktynoprof.* 2009; 2(45):62–7.

Authors:

Onishchenko G.G. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow. Russia.
Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.
Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 21.02.11.

**Н.Ф.Василенко¹, О.В.Малецкая¹, Ю.М.Тохов¹, Н.Г.Варфоломеева¹,
О.А.Кирейцева¹, Т.В.Харченко¹, А.В.Ермаков², А.Н.Куличенко¹**

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА
ПО КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ
НА ЮГЕ РОССИИ В 2010 г. И ПРОГНОЗ НА 2011 г.**

¹ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»;

²Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю

Представлены сведения об эпидемиологической обстановке и заболеваемости Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ) в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2010 г. Дан анализ эпизоотической обстановки в Ставропольском крае. На основании эпизоотологического мониторинга представлен прогноз по КГЛ на 2011 г. на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, заболеваемость, природный очаг, мониторинг, иксодовые клещи, индекс обилия, вирусофорность, *Hyalomma marginatum*.

Единый природный очаг Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) занимает обширную территорию юга России, находится в границах амплитуды тепловых условий от 3000 до 5000 °С (по сумме эффективных температур) в зоне сухих степей восточно-европейского типа и примыкающих к ним полупустынных ландшафтах казахстанского типа, лесостепей и предгорий [1, 2, 4, 8, 9]. Активность природного очага поддерживается за счет циркуляции вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) между иксодовыми клещами и их теплокровными прокормителями (крупный и мелкий рогатый скот, зайцы, ежи и т.п.). Установлена ведущая роль птиц семейства врановых, в первую очередь, грачей как прокормителей личиночных и нимфальных фаз клещей и их участие в распространении переносчиков на большие расстояния [3, 5, 6, 7].

Эпидемические проявления КГЛ в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах (ЮФО, СКФО) с 1999 по 2010 год (с начала активизации очага) зарегистрированы в 7 из 13 субъектов: Астраханской, Волгоградской, Ростовской областях, в Республиках Калмыкия, Дагестан, Ингушетия, Ставропольском крае. Два заносных случая заболевания КГЛ (из Ставропольского края) отмечены в Карачаево-Черкесской республике. За 12 лет в ЮФО и СКФО выявлено 1402 больных, из них у 63 (4,5 %) заболевание закончилось летальным исходом. Наибольшее количество зарегистрировано в Ставропольском крае, где за указанные годы заболело 522 человека, что составило 37 % от числа всех больных, выявленных в ЮФО и СКФО. Кроме того, напряженная эпидемическая ситуация сложилась в Ростовской области, где зарегистрированы 21,7 % от всех случаев заболевания КГЛ, имевших место в ЮФО и СКФО, и в Республике Калмыкия – 20,4 %.

В 2010 г. отмечено снижение заболеваемости КГЛ в субъектах ЮФО и СКФО по сравнению с 2009 г. на 40,5 %. Всего было зарегистрировано 69 больных (2009 г. – 116 чел.), в том числе 3 детей (2009 г. – 5 чел.). По отдельным субъектам заболеваемость снизилась: в Ставропольском крае – на 54,5 % (30 случаев), в Республике Калмыкия – на 41,2 % (10 случаев), в Ростовской области – на 41 % (16 случаев). В Астраханской области заболело 7 человек с 1 летальным исходом (2009 г. – 3 чел.). По три случая заболевания выявлено в Республике Дагестан (2009 г. – 1 случай) и Волгоградской области.

Сезонность заболевания во всех субъектах ЮФО и СКФО, эндемичных по КГЛ, соответствовала многолетней. Первый больной (по дате заболевания) был зарегистрирован в первой декаде апреля в Зимовниковском районе Ростовской области. Заболеваемость КГЛ нарастала с апреля, пик пришелся на май-июнь, спад – на август. Последний случай заболевания был отмечен во второй декаде августа в Апанасенковском районе Ставропольского края.

Количество лиц, обратившихся в лечебно-профилактические учреждения по поводу укусов клещами, в 2010 г. снизилось до 22192, в том числе детей 6728 (2009 г. – 24838 и 7963 соответственно).

Наиболее высокий процент больных КГЛ составляют жители сельской местности (84 %), трудовая деятельность которых связана с животноводством, полевыми работами или работами на личных подворьях. Заражение городских жителей происходит при выездах на дачные участки или во время отдыха на природе.

Заражению подвергаются люди всех возрастов, однако чаще происходило инфицирование людей трудоспособного возраста от 30 до 60 лет. Наиболее

высокий уровень заболеваемости выявлен в возрастной группе 40–49 лет (23 %).

В профессиональном составе больных КГЛ по-прежнему значительную долю составляют неработающие лица (в 2010 г. – 45 %, в 2009 г. – 34,5 %), как правило, являющиеся владельцами домашнего поголовья сельскохозяйственных животных.

В основном инфицирование людей происходило при укусах клещами (51 %), а также в результате снятия клещей незащищенными руками (20 %). В 40 % случаев укусы клещей отмечены при уходе за сельскохозяйственными животными и в 26 % случаев – при выполнении сельскохозяйственных работ. По-прежнему ведущим остается трансмиссивный механизм передачи инфекции.

Анализ клинических проявлений КГЛ показал, что у больных преобладала клиническая форма без геморрагического синдрома (в 2009 г. – у 63,3 %, 2010 г. – 62 %). По тяжести течения более высокий процент составили больные КГЛ средней степени тяжести (74 %), на тяжелую степень болезни пришлось 26 %, легкой степени течения не зарегистрировано.

Количество случаев позднего обращения за медицинской помощью осталось на уровне 2009 г., но относительно заболеваемости, которая в 2010 г. снизилась более чем в 1,5 раза, этот показатель вырос и составил: в Ставропольском крае 27 % (2009 г. – 22,3 %), в Ростовской области 31 % (2009 г. – 19,2 %), в Республике Калмыкия 40 % (2009 г. – 17,6 %), в Астраханской области 29 %. Факты поздней госпитализации выявлены у 16 % зарегистрированных больных КГЛ, обратившихся в стационары инфекционного профиля, наиболее высокий процент поздней госпитализации зафиксирован в Ростовской области. Доля несвоевременной предварительной диагностики КГЛ по сравнению с 2009 г. (57 %) снизилась до 23 %.

По результатам эпизоотологического мониторинга за природным очагом КГЛ на территории Ставропольского края установлено, что ареал иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* – основного резервуара и переносчика возбудителя КГЛ – не изменился, и они, как в предыдущие годы, встречаются практически на всей территории края (26 районов), за исключением городов Кавказских Минеральных Вод.

В 2010 г. активизация клещей *H. marginatum* произошла в третьей декаде марта, что соответствует аналогичному периоду 2009 г. Индексы обилия *H. marginatum* на крупном рогатом скоте в марте 2010 г. достигали 0,3 (в степной зоне), в апреле – 4,3 и 14,4 в степной и полупустынной зоне, соответственно, и находились на уровне 2009 г.

Максимальные показатели численности имаго *H. marginatum* на крупном рогатом скоте зарегистрированы в степных ландшафтах края во второй и третьей декадах мая, когда индексы обилия составили 16,1 (в 2009 г. – 19,4).

При эпизоотологическом обследовании уста-

новлено паразитирование личинок и нимф *H. marginatum* на грачах в июне и в начале июля, при индексе обилия личинок – 1,3. Массовая активность нимф отмечалась в начале третьей декады июля, индекс обилия составил 4,3 экз. на грачах и 65,6 экз. на домашней птице (в 2009 г. индекс обилия на грачах составлял 37,2 экз., на домашней птице – 100). Следует отметить, что индекс обилия преимагинальных фаз *H. marginatum* на птицах семейства врановых оказался почти в 9 раз ниже, чем в 2009 г.

Основными факторами, оказавшими негативное воздействие на показатели численности клещей в 2010 г., явились сложившиеся неблагоприятные погодноклиматические условия летних месяцев (длительная высокая температура и засуха), а также комплекс широкомасштабных противоклещевых мероприятий, проведенных в течение всего эпидсезона текущего года и предшествующих лет.

Результаты лабораторного исследования клещей показали, что их вирусофорность по отдельным районам Ставропольского края осталась на уровне прошлого года: в Александровском – 9,3 %, в Нефтекумском – 2,7 %, в Изобильненском – 1,1 %. Однако в Курском районе наблюдалось увеличение вирусофорности клещей до 11,1 % (2009 г. – 4,6 %), в Красногвардейском – до 8,9 % (2009 г. – 0), в Степновском – до 4,5 % (2009 г. – 2,3 %). Большинство положительных проб относятся к периоду ранней активности имаго (март – май) и преимагинальных фаз (июль).

Таким образом, на основании данных эпизоотологического мониторинга, проведенного на территории природного очага КГЛ в Ставропольском крае, можно предположить, что показатели численности иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* весной 2011 г. в большинстве районов края останутся на уровне средних многолетних значений (0,5–15), а при продолжительной холодной и малоснежной зиме 2010–2011 гг. их индексы обилия не превысят 3–8. Повышение заболеваемости Крымской геморрагической лихорадкой на юге Российской Федерации маловероятно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю. Экология Крымской-Конго геморрагической лихорадки и особенности ее клиники на территории России и сопредельных стран. *Вопр. вирусол.* 2001; 4:7–15.
2. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: 2001.
3. Бирюля Н.Б., Залуцкая Л.И., Перелатов В.Д. Ареал природных очагов КГЛ. Вирусные геморрагические лихорадки: Тр. ИПВЭ АМН СССР. М., 1971; 19:180–5.
4. Бутенко А.М., Лещинская Е.В., Львов Д.К. Крымская геморрагическая лихорадка. *Вестн. РАЕН.* 2002; 2(2):41–9.
5. Дятлов А.И., Котти Б.К. Теоретические аспекты природной очаговости Крымской геморрагической лихорадки на Юге России. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 4(Приложение):98–102.
6. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Крымская геморрагическая лихорадка. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций. М.: 1979.
7. Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Пичурина Н.Л. и др.

Изучение современного состояния природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Ростовской области. Пробл. особо опасных инф. 2004; 87:34–7.

8. Ониищенко Г.Г., Ефременко В.И. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка на Юге России. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 4:86–90.

9. Шchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Moskvitina T.M. и др. Выявление циркуляции вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в предгорных степях Северного Кавказа. Вopr. вирусол. 2005; 5:9–15.

N.F.Vasilenko, O.V.Maletskaia, Yu.M.Tokhov, N.G.Varfolomeeva,
O.A.Kireitseva, T.V.Kharchenko, A.V.Ermakov, A.N.Kulichenko

**Epidemiological Situation
of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF)
in the South of Russia in 2010
and Prognosis for the Year of 2011**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute,
Rosпотребнадзор Administration in the Stavropol Region*

Presented are the data on Crimean hemorrhagic fever epidemiological situation and morbidity in the South and North-Caucasian Federal Districts of the Russian Federation in 2010. Epizootic situation in the Stavropol region has been analyzed. The prognosis as regards CHF for the year of 2011 in the territory of the South and North-Caucasian Federal Districts is presented, based on epizootiological monitoring.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, morbidity, natural focus, monitoring, ixodic ticks, index of abundance, viral infection rate, *Hyalomma marginatum*.

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

1. Aristova V.A., Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., L'vov D.K. [Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Ecology and Peculiarities of Its Clinical

Picture in the Territory of Russia and Neighboring Countries]. Vopr. Virusol. 2001; 4:7–15.

2. [The Atlas of Prevalence of Natural-Focal Viral Infections Agents in the Territory of the Russian Federation]. Moscow: 2001.

3. Birulya N. B., Zalutskaya L. I., Perelato V.D. [Areal of the CHF Natural Foci, Viral Hemorrhagic Fevers]. Tr. Inst. Poliomei. i Virus. Entsefal. Moscow; 1971; 19:180–5.

4. Butenko A.M., Leshchinskaya E.V., L'vov D.K. [Crimean Hemorrhagic Fever]. Vestn. Ross. Akad. Est. Nauk. 2002; 2(2):41–9.

5. Dyatlov A.I., Kotti B.K. [Theoretical Aspects of Crimean Hemorrhagic Fever in the South of Russia]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 4 (prilozh.):98–102.

6. L'vov D.K., Il'ichev V.D. [Crimean Hemorrhagic Fever. Avian Migrations and Transportation of Infections' Agents]. Moscow: Nauka; 1979.

7. Moskvitina E.A., Vodyanitskaya S.Yu., Pichurina N.L. et. al. [A Study of the Present Status of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Natural Focus in Rostov Region]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; 87:34–7.

8. Onishchenko G.G., Efremenko V.I. [Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in the South of Russia]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 4:86–90.

9. Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Moskvitina T.M. et al. [Detection of the Circulation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the Piedmont Steppes of the North Caucasus]. Vopr. Virusol. 2005; 5:9–15.

Authors:

Vasilenko N.F., Maletskaia O.V., Tokhov Yu.M., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A., Kharchenko T.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ermakov A.V. Rosпотребнадзор Administration in the Stavropol Region. Stavropol.

Об авторах:

Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Харченко Т.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ермаков А.В. Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю. Ставрополь.

Поступила 10.12.10.

Ю.М.Ломов, Э.А.Москвитина, О.А.Арешина, О.Л.Адаменко

**ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО ХОЛЕРЕ В МИРЕ
В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД. ПРОГНОЗ**

ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт»

Первое десятилетие XXI века характеризуется крупными эпидемиями и вспышками холеры в странах Африки и Азии, а также Северной Америки с заносами инфекции из эндемичных очагов практически ежегодно на все континенты, с тенденцией к росту мировой заболеваемости, что определяет неблагоприятный прогноз на глобальном уровне. Эпидемия холеры в регионе Карибского бассейна, в Гаити, обусловленная *V. cholerae eltor* с геном *ctxB* холерного токсина классического биовара, вероятно, определит начало нового периода в развитии седьмой пандемии холеры или начало новой пандемии.

Ключевые слова: холера, холерные вибрионы, эпидемиологическая обстановка, заносы, прогноз.

События по холере, произошедшие в 2010 г. в регионе Карибского бассейна, в Гаити, еще раз напомнили нам о социальной значимости этой опасной инфекционной болезни, которая может быть занесена на любой континент, в любую страну мира и при наличии предпосылок для распространения возбудителя инфекции, каковыми являются социальные и природные условия, наносить значительный экономический ущерб.

Следует отметить, что холера в Гаити зарегистрирована впервые за период 7-й пандемии. Предшествующее эпидемии разрушительное январское землетрясение повлекло за собой бедственное состояние более миллиона гаитян, вынужденных проживать в лагерях беженцев. Наводнение в прибрежных городах из-за пронесшегося в период эпидемического неблагополучия урагана «Томас» привело к ухудшению качества воды и санитарных условий в стране. Эти катастрофические события явились альтернативными источниками и рисками в возникновении и распространении эпидемии во времени и пространстве [7, 8, 10, 11]. К этому следует добавить также отсутствие системы эпидемиологического надзора за холерой, настороженности у медицинских работников и невозможности оказания квалифицированной медицинской помощи больным из-за непредсказуемого их количества, отсутствие необходимых препаратов, прежде всего для патогенетической терапии. Положение усугублялось политической обстановкой в стране, когда невозможно было своевременно начать лечение из-за царивших гражданских беспорядков.

По данным Pan American Health Organization/WHO, с 18.10.2010 г. зарегистрировано 194095 больных холерой, поражены все провинции страны [5, 15]. Беспрецедентная по своим масштабам эпидемия, унесшая более двух тысяч человеческих жизней, продолжается. В провинции Grand'Anse, на юге страны, летальность составила 58,1 % [13], в целом по стране – 2,7 % [5].

Установлено, что эпидемия в Гаити обусловлена матлабским восточно-азиатским вариантом *V. cholerae eltor*, продуцирующим токсин холерного вибрио-

на классического биовара [2, 9].

Ранее было установлено наличие у матлабских вариантов (Бангладеш) в геноме классического профага *CTXφ*, а также острова патогенности *VPI-1* с генами патогенности *tcpA*, а также *rstR* и *ctxB*. У других матлабских вариантов обнаружено присутствие на малой хромосоме tandemных повторов двух копий классического профага *CTXφ*. В геноме этих вариантов штаммов присутствуют специфичные для *V. cholerae eltor* острова пандемичности *VSP-1* и *VSP-2*, обеспечивающие высокий уровень адаптации к условиям внешней среды, его пандемический потенциал, а наличие гена *ctxB* холерного токсина способно вызывать более тяжелое клиническое течение с высокими показателями летальности [17, 19]. Анализ антибиотикограмм штаммов *V. cholerae eltor* серовара Огава, содержащих *ctxB* классического биовара, из Индии (штат Орисса) показал множественную устойчивость к антибиотикам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, котримоксазолу, налидиксовой кислоте, неомицину и фуразолидону), подтвержденную также присутствием генов резистентности в геноме [16, 18].

По прогнозам экспертов РАНО/WHO, начавшаяся в Гаити эпидемия холеры «распространяется с взрывоопасной скоростью» и может поразить 400 тысяч человек [4]. Зарегистрированы заносы холеры в Доминиканскую Республику с последующим распространением инфекции в провинции Rio Ozama, где люди влачат нищенское существование и лишены адекватных санитарных условий, а также в США (Флориду и Майами) из Гаити [11, 13].

Таким образом, в современный период продолжается вовлечение в пандемию новых стран, при этом не только в Карибском бассейне, но, как мы указывали ранее, в странах Африки, Азии и Европы [1].

В структуре заболеваемости холерой по континентам (данные ВОЗ на 16 января 2011 г.) впервые за последнее десятилетие наибольший удельный вес больных холерой приходится на Америку – 71,006 % (194238 больных холерой), в Африке он составил 23,592 % (64538), Азии – 3,888 % (10637), Австралии с Океанией – 1,512 % (4136) и в Европе –

0,002 % (0,002).

Использование проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Мир. Эпидемиологический анализ заболеваемости» для слежения за динамикой заболеваемости на глобальном уровне позволил установить, что в мире сохраняется тенденция роста мировой заболеваемости в 2010 г. относительно 2001 г. (по прямолинейной линии тренда относительно эмпирической динамики заболеваемости) со средним ежегодным темпом прироста – 4,475 %. Прогнозирование холеры на 2011–2012 гг. по прямолинейной линии тренда показывает также сохранение тенденции роста заболеваемости (рис. 1).

Здесь уместно привести мнение экспертов ВОЗ о том, что «динамика возникновения холеры, начиная с 2005 г., в сочетании с появлением новых штаммов, приводящих к заболеванию с более тяжелым клиническим течением и обладающих повышенным уровнем антибиотикорезистентности, и с изменениями климата выводят холеру на центральное место в повестке дня проблем глобального здравоохранения» [3]. Летальность при холере в мире варьировала от 1,43 % (2001 г.) до 3,06 % (2008 г.).

Ежегодно информируют ВОЗ о холере до 58 стран мира (2001 и 2008 гг.), из которых до 50,0 и 62,7 % соответственно приходится на Африку. На континенте сохраняется неблагоприятная эпидемиологическая обстановка за счет крупных вспышек и эпидемий в ранее пораженных странах различных регионов, то есть повторного «рецидивирующего» возникновения и распространения холеры в периоды сезонной активизации эндемичных очагов или заносов на территории с нарушениями в инфраструктуре, недостаточной работой систем здравоохранения, критической нехваткой необходимых медикаментов и квалифицированного персонала. В 2010 г. поступили сообщения в ВОЗ о 64538 (неуточненные данные) больных холерой в 14 странах Африки, преимущественно в Западном – 40235 больных (показатель заболеваемости на 100 тыс. населения – $22,248_{0/0000}$), Центральном – 16695 больных ($26,091_{0/0000}$), а также Восточном – 7596 больных ($4,306_{0/0000}$) регионах, в ряде стран которых сформировались эндемичные

очаги. В 2010 г. зарегистрирован завоз холеры африканским паломником в Саудовскую Аравию [6]. Летальность в Африке за последнее десятилетие составила от 1,45 (2001 г.) до 3,98 % (2010 г.).

В Азии выявлена тенденция роста заболеваемости со средним ежегодным темпом прироста – 0,315 %. Это связано с ежегодными эпидемиями и вспышками, в том числе заносного происхождения, в 30 странах различных регионов континента. Так, в 2010 г. в Индии зарегистрировано 4892 больных холерой (показатель заболеваемости – $0,650_{0/0000}$), в 2008 г. в Афганистане – 4384 ($22950_{0/0000}$), в 2007 г. в Таиланде и Вьетнаме – 1428 ($2,660_{0/0000}$) и 1946 ($3,100_{0/0000}$), в 2005 г. в Китае – 980 больных ($0,090_{0/0000}$). Отмечена периодическая регистрация холеры в Индонезии, Камбодже, Лаосе, Ираке, Малайзии, Йемене и других странах. В 2010 г. крупная вспышка (1400 больных холерой) имела место в Непале. Летальность в Азии – от 0,25 % (2002 г.) до 2,69 % (2010 г.).

События по холере в Гаити продемонстрировали значимость заносов инфекции. С 2001 по 2010 год в мире имели место 1030 межконтинентальных, меж- и внутригосударственных заносов инфекции, в том числе 273 в страны Европы (Великобританию, Германию, Испанию, Италию, Швейцарию, Швецию, Норвегию, Францию, Словению и другие), в США и Канаду – 40 и 28 соответственно.

По данным ВОЗ, холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O139, выявлена в 2009 г. в Китае у 37 (48,68 %) из 76 лабораторно подтвержденных больных холерой по сравнению с 2008 г., когда доля их составила 31,78 % (48 из 151). В 2009 г. имел место завоз холеры Бенгал в США [3].

2010 г. войдет в историю пандемического распространения холеры, когда впервые имела место крупнейшая по своим масштабам эпидемия заносного происхождения в Карибском бассейне, в Гаити, с высокими показателями летальности. Эпидемия обусловлена новым гибридным вариантом холерных вибрионов O1 биовара эльтор, несущим ген *ctxB* холерного вибриона классического биовара. Учитывая, что в 2000-е годы имели место вспышки холеры, обусловленные так называемыми матлабскими и мозамбикскими вариантами холерных вибрионов O1 в странах Азии и Африки, завоз матлабского варианта в страны Северной Америки с распространением инфекции, нельзя исключить, что экспертами ВОЗ будет в очередной раз поставлен вопрос о возможном начале восьмой пандемии холеры или мы будем констатировать эволюцию и изменчивость холерных вибрионов O1. Безусловно одно – использование молекулярно-биологических методов будет способствовать более углубленной идентификации штаммов и решению задач эпидемиологического анализа на современном методическом уровне. Множественная резистентность к антибиотикам у гибридных штаммов холерных вибрионов O1 указывает на необходимость мониторинга чувствительности/резистентности таких штаммов к антибактериальным препаратам и

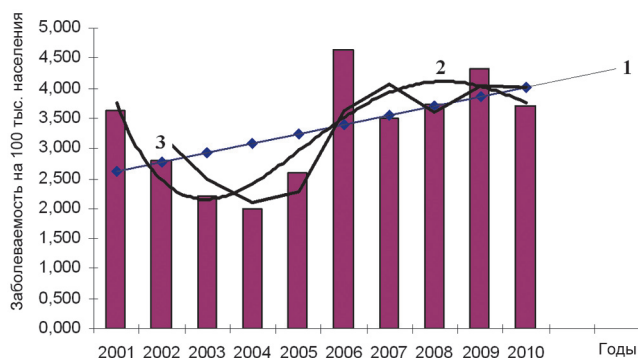


Рис. 1. Динамика заболеваемости холерой в мире в 2001–2010 гг.:

1 – тенденция прямолинейная; 2 – степенная кривая;
3 – полиномиальная кривая

отслеживания их распространения для обеспечения соответствующей тактики этиотропной терапии и экстренной профилактики холеры.

В странах СНГ вспышки и спорадические случаи отмечены на Украине (2001, 2003 г.), в Казахстане (2005, 2008 гг.) и Азербайджане (2001г.). Изоляция в указанных и других странах СНГ различных по эпидемической значимости холерных вибрионов O1 из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды позволяет в целом оценить ситуацию как неустойчивую и нестабильную.

Имевшие место эпидемические осложнения в России за анализируемый период (Республика Татарстан, 2001 г.; Ростовская область, 2005 г.), заносы инфекции в Башкортостан (2004, 2008 гг.), в Мурманскую область (2006 г.) и в Москву (2010 г.) из Индии; в Тверскую область, а также в Москву из Таджикистана (2005 г.) определяют в целом неустойчивую эпидемиологическую обстановку в стране.

В 2010 г. Роспотребнадзор сообщил о трех заносах холеры российскими гражданами, прибывшими из Индии авиатранспортом, что еще раз подтвердило ведущую роль этого вида международного транспорта в возможности завоза холеры в Россию. Действующая в стране система эпидемиологического надзора позволила своевременно выявить больных холерой, не допустив последующего распространения инфекции.

Необходимо отметить, что одно из ключевых мест при оценке и прогнозировании эпидемиологической обстановки по холере занимают сведения о выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды в Российской Федерации. С 2001 по 2010 год из 36 субъектов поступили сведения о выделении 623 штаммов *V. cholerae* O1 и 20 *V. cholerae* O139 серогрупп, в том числе 613 *V. cholerae* O1, не содержащих *ctxA* и *tcpA* генов. Токсигенные, эпидемически значимые холерные вибрионы обнаружены в пробах из воды поверхностного водоема, используемого при неорганизованном рекреационном водопользовании, при вспышке холеры в Республике Татарстан (2001 г.), в Ростовской области (2001 г.) и Санкт-Петербурге (2005 г.). Анализ динамики выделения холерных вибрионов из объектов окружающей среды свидетельствует о росте их

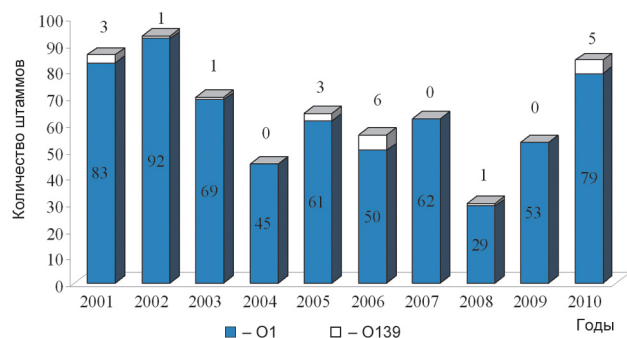


Рис. 2. Динамика выделения холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды в Российской Федерации в 2001–2010 гг.

числа в 2010 г. (относительно 2008 г.), рис. 2.

При этом не содержащие гена холерного токсина штаммы холерных вибрионов O1 и O139 были изолированы из проб воды поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды на территориях субъектов I, II типов и III типа подтипов А и Б по эпидемическим проявлениям холеры (рис. 3) с преимущественным выделением 306 штаммов холерных вибрионов O1 на территориях II типа (Республика Калмыкия и Приморский край) и 150 – на территориях III типа подтипа А (Иркутская, Кировская, Новгородская, Новосибирская, Рязанская, Саратовская области, Алтайский край, Москва, Санкт-Петербург и другие).

В 2008–2010 гг. холерные вибрионы O1 были обнаружены преимущественно в местах неорганизованного рекреационного и хозяйственно-бытового водопользования – в 43,3 % проб (Республика Калмыкия, Приморский край, Иркутская и Свердловская области), в местах сброса сточных вод и ниже по течению – в 27,8 % проб (Ростовская область, Республики Калмыкия, Татарстан, Саха (Якутия), Алтайский край, Челябинская, Иркутская и Тюменская области), а также в точках, определенных по санитарно-гигиеническим показаниям, – в местах впадения малых рек, загрязняемых сточными водами, аварийных сбросов и других (Ростовская область, Республика Калмыкия, Приморский и Забайкальский край, Иркутская область). Единичные штаммы изолированы в местах водозаборов для хозяйственно-питьевого водоснабжения и технических водозаборов (Приморский край), а также в местах организованного рекреационного водопользования (Санкт-Петербург, Свердловская область, Забайкальский край). Холерные вибрионы O139 серогруппы обнаружены в местах сброса сточных вод (Челябинская область, 2010 г.) и в местах рекреационного водопользования (Москва, 2008 г.).

Выделение холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из водных объектов I и II категорий, используемых в качестве источников воды для централизованного хозяйственно-бытового водоснабжения и рекреационного водопользования, на фоне выявления

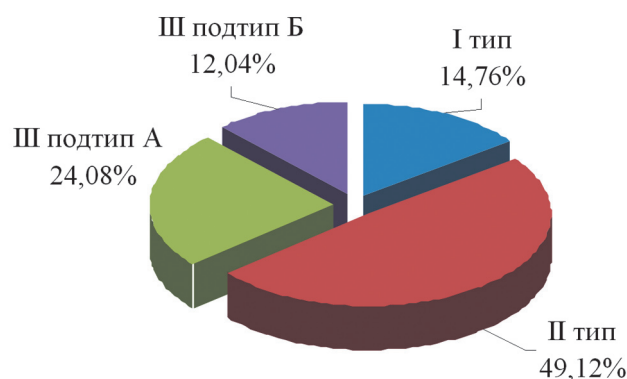


Рис. 3. Удельный вес холерных вибрионов O1 серогрупп, выделенных в субъектах Российской Федерации, различных по типам эпидемических проявлений холеры

нестандартных проб по микробиологическим показателям на соответствие действующим СанПиН из водных объектов указывает на высокую степень потенциальной эпидемической опасности реализации водного пути распространения возбудителя холеры при заносе инфекции, а также возбудителей других инфекционных болезней с водным характером вспышек и является неблагоприятным прогностическим признаком.

Таким образом, первое десятилетие XXI века характеризуется крупными эпидемиями и вспышками холеры в странах Африки и Азии, а также Северной Америки с заносами инфекции из эндемичных очагов практически ежегодно на все континенты, с тенденцией к росту мировой заболеваемости, что определяет неблагоприятный прогноз на глобальном уровне. Эпидемия холеры в регионе Карибского бассейна, в Гаити, обусловленная *V. cholerae* eltor с геном *ctxB* холерного токсина классического биовара, вероятно определит начало нового периода в развитии 7-й пандемии холеры или начало новой пандемии.

Прогноз для России, где обстановка по холере оценивается как неустойчивая, является неблагоприятным из-за возможных заносов инфекции всеми видами международного транспорта, а также высокого и повышенного эпидпотенциала административных территорий с наличием рисков для распространения инфекции.

Приносим благодарность Т.В.Ковалёвой и Д.А.Козиной, сотрудникам лаборатории эпидемиологии ООИ РостНИПЧИ, за помощь при подготовке материалов для статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире, странах СНГ и России. Прогноз. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):11–3.
2. Chin Ch-Sh., Sorenson J., Harris J.B. et al. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. N. Engl. J. 2011; 364:33–42.
3. Cholera, 2009. Wkly Epidem. Rec. 2010; 85(31):293–308.
4. <http://www.bio.su/news/6528> (дата обращения 29.11.2010).
5. <http://www.who.int/en/new/paho.org/hai> (дата обращения 20.01.2011).
6. Cholera, diarrhea & dysentery update 2010 (28). ProMED-mail [Internet]. 11 Nov 2010 [cited 11 Nov 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85789
7. Cholera – Haiti (03): (AR) Port-au-Prince. ProMED-mail [Internet]. 24 Oct 2010 [cited 24 Oct 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85471
8. Cholera – Haiti (05): (AR). ProMED-mail [Internet]. 27 Oct 2010 [cited 27 Oct 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85526
9. Cholera – Haiti (07): strain analysis. ProMED-mail [Internet]. 30 Oct 2010 [cited 30 Oct 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85575
10. Cholera – Haiti (11): update pre-tropical storm. ProMED-mail [Internet]. 07 Nov 2010 [cited 7 Nov 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85696
11. Cholera – Haiti (12): further spread. ProMED-mail

- [Internet]. 08 Nov 2010 [cited 08 Nov 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85726
12. Cholera – Haiti (21):USA (Florida). ProMED-mail [Internet]. 17 Nov 2010 [cited 17 Nov 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85881
 13. Cholera – Haiti (23): update. ProMED-mail [Internet]. 22 Nov 2010 [cited 07 Dec 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85949
 14. Cholera – Haiti (24): update. WHO. ProMED-mail [Internet]. 25 Nov 2010 [cited 26 Nov 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,85991
 15. Cholera – Haiti (30): Haiti, Dominican Rep. PAHO. ProMED-mail [Internet]. 24 Dec 2010 [cited 25 Dec 2010]. Available from: http://apex.oracle.com/pls/otn/f?p=2400:1202:3646688937573603::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,86348
 16. Goel A.K., Jain M., Kumar P., Jiang S.C. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. World J. Microbiol. Biotechnol. 2010; 26(2):281–7.
 17. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(9):3296–9.
 18. Pal B.B., Khuntia H.K., Samal S.K., Kar S.K., Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa possessing the *ctxB* gene of the classical biotype in Orissa, India. Int. J. Infect. Dis. 2009; 14(5):384–9.
 19. Safa A., Bhyian N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T. et al. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. J. Med. Microbiol. 2006; 55(Pt 11):1563–9.

Yu.M.Lomov, E.A.Moskvitina, O.A.Areshina, O.L.Adamenko

Assessment of Cholera Epidemiological Situation in the World in the Present Period. Prognosis

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute

In the first decade of the XXI century large-scale cholera epidemics and outbreaks were registered in African, Asian, and North American countries. Importation of infection from endemic foci to all continents took place almost every year, and the tendency of global cholera morbidity growth was observed. All that determined unfavorable prognosis on cholera at the global level. Cholera epidemic in the Caribbean Basin region, Haiti, caused by *V. cholerae* El Tor harboring cholera toxin *ctxB* gene of classical biovar is expected to predetermine either the beginning of a new period of the seventh pandemic or the onset of new pandemic.

Key words: cholera, cholera vibrios, epidemiological situation, importation, prognosis.

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

1. Lomov Yu.M., Moskvitina E.A. [Epidemiologic Situation on Cholera in the World, CIS Countries and Russia. Prognosis]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:11–3.

Authors:

Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Areshina O.A., Adamenko O.L. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Арешина О.А., Адаменко О.Л. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 21.01.11.

Г.И.Лямкин, Н.И.Тихенко, Е.А.Манин, С.В.Вилинская, С.И.Головнева,
Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко

ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2010 г. И ПРОГНОЗ НА 2011 г.

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Представлен анализ динамики заболеваемости людей и животных бруцеллезом в Российской Федерации, дана оценка эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации за 2006–2010 гг. Показано, что в ряде Федеральных округов России сложилась неблагоприятная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу, что дает основание прогнозировать увеличение заболеваемости этой инфекцией среди сельскохозяйственных животных и людей.

Ключевые слова: бруцеллез, эпизоотический процесс, заболеваемость, эпидемиологическая обстановка.

Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в России на протяжении последних лет не имеет тенденции к улучшению. В ряде регионов Российской Федерации (Северо-Кавказский федеральный округ, Южный федеральный округ, Сибирский федеральный округ) вследствие эпизоотического неблагополучия по бруцеллезу и нарушений санитарно-гигиенических норм и правил при ведении животноводства бруцеллез остается широко распространенной инфекцией и основной причиной экономических потерь в животноводческой отрасли сельского хозяйства, что усугубляется заболеванием людей, которое нередко приводит к потере трудоспособности и инвалидности.

Первостепенное значение проблема заболеваемости бруцеллезом приобретает в условиях проводимых преобразований в животноводстве, направленных на увеличение поголовья сельскохозяйственных животных (крупного, мелкого рогатого скота). Создание акционерных, фермерских, индивидуальных хозяйств, на долю которых в последние годы приходится до 60 % производства сельскохозяйственной продукции, повлекло за собой ослабление ветеринарного надзора и, как следствие, способствовало активизации старых, а также возникновению новых очагов бруцеллеза и увеличению заболеваемости бруцеллезом людей [5].

В сложившейся ситуации требуется принятие действенных мер по ликвидации бруцеллеза сре-

ди сельскохозяйственных животных, недопущению завоза и распространения больных животных во вновь создаваемые и действующие животноводческие комплексы, соблюдению санитарно-противоэпидемического режима при производстве животноводческой продукции.

В качестве источников информации использовались статистические данные Управлений Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации, Россельхознадзора за 2006–2010 гг. Эпидемиологические и эпизоотологические проявления бруцеллезной инфекции оценивали на основе общепринятых методов ретроспективного эпидемиологического и эпизоотологического анализа [6].

Целью настоящего исследования являлся комплексный анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации за 2006–2010 гг. и прогноз на 2011 г.

В последние 5 лет ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации остается неблагоприятной. Ежегодно регистрируется увеличение количества новых очагов инфекции среди сельскохозяйственных животных – крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота. Тренды по неблагополучию – возрастающие (рис. 1, 2).

Из приведенных данных следует, что ситуация по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных в России ежегодно ухудшается, в том числе за счет мелкого рогатого скота, представляющего наи-



Рис. 1. Динамика регистрации неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС в 2006–2010 гг.



Рис. 2. Динамика регистрации неблагополучных пунктов по бруцеллезу МРС в 2006–2010 гг.

большую опасность для здоровья населения, ввиду носительства наиболее вирулентных штаммов бруцелл вида *Brucella melitensis*. Очаги бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных регистрируются преимущественно в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах, на долю которых приходится до 90 % всех регистрируемых в России случаев заболевания бруцеллезом. В этих же округах находится около 80 % общероссийского поголовья КРС и МРС, где большая часть мелкого (более 80 %) и крупного рогатого скота (около 50 %) содержится в индивидуальных и крестьянско-фермерских хозяйствах. Основными причинами возникновения и распространения бруцеллезной инфекции среди сельскохозяйственных животных являются: несанкционированное приобретение и ввод больных животных из других регионов без проведения регламентированных противобруцеллезных мероприятий; отсутствие должного контроля со стороны муниципальных органов за перемещением и регистрацией поголовья скота; совместное содержание животных различных видов (КРС, МРС) в личных подсобных хозяйствах; несвоевременная сдача больных животных на убой; совместный выпас и использование общих мест водопоя животными из благополучных и неблагополучных по бруцеллезу хозяйств. Распространению бруцеллезной инфекции среди животных способствует также наличие скрытых бруцеллоносителей среди МРС, выявить которых с помощью существующих диагностических методов затруднительно из-за длительно сохраняющихся поствакцинальных реакций, не подлежащих надежной дифференциации.

При мелкотоварном производстве в зоне повышенного риска по заболеваемости бруцеллезом находится население, имеющее непосредственное отношение к разведению и содержанию животных в индивидуальных и в крестьянско-фермерских хозяйствах и употребляющее животноводческую продукцию [1–4].

На фоне продолжительного эпизоотического неблагополучия заболеваемость людей бруцеллезом в Российской Федерации стабилизировалась на уровне 380–410 случаев впервые выявленного бруцеллеза: 2006 г. – 418 (показатель на 100 тыс. населения – 0,29), 2007 г. – 296 (показатель на 100 тыс. населения – 0,21), 2008 г. – 410 (показатель на 100 тыс. населения – 0,29), 2009 г. – 409 (показатель на 100 тыс. населения – 0,29), за 11 месяцев 2010 г. – 372 (показатель на 100 тыс. населения – 0,26), рис. 3.

Наибольшее число случаев зарегистрировано в Северо-Кавказском федеральном округе (Республика Дагестан – 143, Ставропольский край – 59), Южном федеральном округе (Республика Калмыкия – 38, Волгоградская область – 20), Сибирском федеральном округе (Республика Тыва – 34, Омская область – 14, Томская область – 9), Центральном федеральном округе (Воронежская область – 6).

Обращает на себя внимание тот факт, что в Воронежской области эпидемиологическая ситуа-

ция продолжает оставаться напряженной в связи с тем, что очаг бруцеллеза, возникший в 2009 г., после завоза неблагополучного по бруцеллезу КРС не был своевременно локализован и ликвидирован. За 9 месяцев 2010 г. в области зарегистрировано 6 новых случаев заболевания бруцеллезом.

Как и в прошлые годы, заболевания регистрируются, как правило, в хозяйствах индивидуального сектора, при этом основным источником инфекции является КРС, основными путями передачи – контактный и алиментарный. Заражение людей происходит при употреблении в пищу контаминированной бруцеллами мясо-молочной продукции, уходе за больными сельскохозяйственными животными, участии в окотных компаниях. Основными контингентами населения, подвергающимися риску заболевания бруцеллезом, остаются ветеринарные работники, чабаны, сакманщики. На высоком уровне остается заболеваемость детей в возрасте до 14 лет.

Наличие личных подсобных хозяйств, в которых содержится неучтенный крупный и мелкий рогатый скот, дестабилизирует эпизоотическую ситуацию, усложняет проведение плановых диагностических исследований на бруцеллез в полном объеме, а также проведение профилактических мероприятий.

Показатели заболеваемости людей бруцеллезом с впервые выявленным диагнозом в Российской Федерации в последние годы нельзя считать достоверными из-за неудовлетворительного состояния лабораторной диагностики. Продолжает сохраняться тенденция к снижению числа диагностических лабораторных исследований на бруцеллез в лечебно-профилактических учреждениях и бактериологических исследованиях материала от больных людей.

В 2010 г. в Российской Федерации предпринят ряд организационных мер в направлении качественного изменения ситуации по бруцеллезу. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 26.04.2010 г. № 39 введены в действие СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза». Референс-центр мониторинга возбудителей бруцеллеза, действующий на базе ФГУЗ «Ставропольский НИПЧИ» Роспотребнадзора аккредитован на соответствие требованиям национального стандарта ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025.

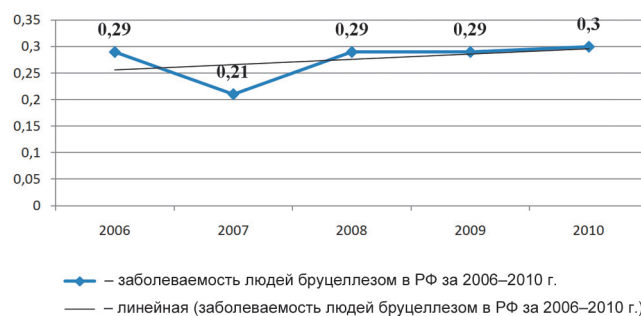


Рис. 3. Заболеваемость людей бруцеллезом в Российской Федерации в 2006–2010 гг. (показатель на 100 тыс. населения)

Перечень диагностических препаратов, зарегистрированных и разрешенных к применению на территории Российской Федерации, пополнился разработанной в ФГУЗ «Ставропольский НИПЧИ» Роспотребнадзора новой диагностической тест-системой «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе (ИФА)».

На уровне субъектов Российской Федерации проводится работа в направлении усиления взаимодействия органов и учреждений Роспотребнадзора, Россельхознадзора, Управлений ветеринарии и учреждений здравоохранения, органов управления муниципальных образований по профилактике бруцеллеза. Так, в Ставропольском крае разработан «Комплексный план мероприятий по профилактике бруцеллеза на территории Ставропольского края на 2010–2014 гг.», в реализации которого участвуют Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю, ФГУЗ «Ставропольский НИПЧИ», Управление Россельхознадзора по Ставропольскому краю, ФГУЗ «ЦГиЭ» в Ставропольском крае, краевое Министерство здравоохранения и Министерство сельского хозяйства, Управление ветеринарии по Ставропольскому краю.

Прогноз развития эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в 2011 г. будет определяться сохраняющимся неблагоприятным по бруцеллезу среди КРС и МРС в эндемичных по бруцеллезу административных территориях Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов, интенсивностью миграционных процессов среди животных этих видов по хозяйственным и другим причинам между административными субъектами Российской Федерации, уровнем эффективности проведения оздоровительных мероприятий в хозяйствах КРС и МРС, неблагоприятных по бруцеллезу.

В 2011 г., как и в предыдущие годы, сохранение эпидемиологического неблагоприятия по бруцеллезу ожидается в субъектах Северо-Кавказского федерального округа (Республика Дагестан, Ставропольский край, Карачаево-Черкесская республика, Республика Северная Осетия – Алания), Южном Федеральном округе (Республика Калмыкия, Астраханская и Волгоградская области), Сибирском федеральном округе (Республика Тыва, Омская, Тюменская области). Возможно увеличение заболеваемости бруцеллезом в административных субъектах Российской Федерации, в которые будет завозиться для откорма и разведения поголовья КРС и МРС из субъектов, где сохраняется эпизоотическое неблагоприятие по бруцеллезу.

В связи с созданием Таможенного союза между Российской Федерацией, Республикой Беларусь и Республикой Казахстан возрастает риск завоза большого бруцеллезом поголовья КРС и МРС, а так-

же инфицированных продуктов животноводства из Республики Казахстан, являющейся эндемичной по бруцеллезу.

В целях повышения эффективности противо-бруцеллезных мероприятий, направленных на профилактику заболеваемости людей бруцеллезом целесообразна разработка региональных финансово-обеспеченных комплексных программ ликвидации бруцеллеза на эндемичных территориях, важным разделом которых должна быть разработка и реализация финансовых механизмов и стимулов, побуждающих владельцев большого поголовья КРС и МРС к сдаче его на убой, принятию региональных законодательных актов по повышению ответственности владельцев за преднамеренную передержку и реализацию большого поголовья и инфицированных продуктов животноводства.

Необходимым условием профилактики бруцеллеза среди людей и животных является безусловное выполнение мероприятий предусмотренных Санитарно-эпидемиологическими правилами «Профилактика бруцеллеза» СП 3.1.7.2613-10 и Ветеринарными правилами ВП 13.3.1302-96.

Таким образом, результаты анализа эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2010 г. свидетельствуют о сохраняющейся негативной динамике эпизоотического процесса по бруцеллезу. Количество неблагоприятных пунктов в 2010 г. возросло до 182 – КРС и 32 – МРС. Следствием эпизоотологического неблагоприятия по бруцеллезу является сохранение заболеваемости бруцеллезом среди людей на уровне 372 случаев (11 месяцев 2010 г., в 2009 г. – 364 случая). С учетом негативной тенденции в развитии эпизоотического и эпидемического процессов можно прогнозировать увеличение заболеваемости людей бруцеллезом в 2011 г. на 5–10 % от средних многолетних величин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Хадарцев О.С. и др. Состояние заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации. Дез. дело. 2009; 2:38–40.
2. Лямкин Г.И., Таран И.Ф., Бутаев Т.М. и др. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Северокавказском регионе Российской Федерации. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы; 2001; 3:313–5.
3. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации в 2009 г. и прогноз на 2010 г. Здоровье населения и среда обитания. Бюллетень. 2010; 5:20–2.
4. Онищенко Г.Г. Об эпизоотической ситуации и заболеваемости природно-очаговыми инфекциями на территории ЮФО. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 3:22–8.
5. Русанова Д.В., Лямкин Г.И. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Ставропольском крае. Пробл. особо опасных инф. 2009; 3(101):27–30.
6. Шаханина И.А., Кучеровская Т.В., Черкова Т.П. Применение различных статистических методов эпидемиологического анализа при оценке сезонности и территориального распространения инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1990; 5:43–7.

G.I.Lyamkin, N.I.Tikhenko, E.A.Manin, S.V.Vilinskaya, S.I.Golovneva,
D.V.Rusanova, A.N.Kulichenko

Epizootiological and Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2010 and Prognosis for 2011

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Analysis of dynamics of brucellosis incidence among humans and animals in the Russian Federation is presented. Evaluation of epizootiological and epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2006–2010 is given. Epizootiological and epidemiological situation on brucellosis was demonstrated to be unfavorable in a number of Federal Districts that allows to predict the increase of its incidence among farm animals and humans.

Key words: brucellosis, epizootic process, incidence, epidemiological situation.

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

1. Zheludkov M.M., Tsirel'son L.E., Khadartsev O.S. et al. [Situation on Brucellosis Morbidity in the Russian Federation]. *Dez. Delo*. 2009; 2:38–40.
2. Lyamkin G.I., Taran I.F., Butaev T.M. et al. [Epidemiological Characteristics of Brucellosis in the North Caucasian Region of the Russian

Federation]. *Karantin. Zoonoz. Infek. Kazakhst.* 2001; 3:313–5.

3. Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Kulichenko A.N. [Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2009 and Prognosis for 2010]. *Zd. Nas. Sreda Obit.* 2010; 5:20–2.

4. Onishchenko G.G. [Infectious Diseases in Natural Reservoirs: Epidemic Situation and Morbidity in the Russian Federation and Prophylactic Measures]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001; 3:22–8.

5. Rusanova D.V., Lyamkin G.I. [Epidemiologic Features of Brucellosis in Stavropol Region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 101:27–30.

6. Shakhnina I.L., Kucherovskaia T.V., Chernova T.P. [The Use of Different Statistical Methods in Epidemiological Analysis to Assess the Seasonality and Territorial Spread of Infectious Diseases]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1990; 5:43–7.

Authors:

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

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

Поступила 26.01.11.

А.Я.Никитин, Е.А.Сидорова, Е.И.Андаев, М.В.Чеснокова

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ СИБИРСКОГО И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОКРУГОВ ИНФЕКЦИЯМИ, ПЕРЕДАЮЩИМИСЯ КЛЕЩАМИ, В 2009–2010 гг. И ПРОГНОЗ НА 2011 г.

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Представлены сведения о заболеваемости населения субъектов Сибирского и Дальневосточного федерального округов в 2009–2010 гг. инфекциями, передающимися клещами (клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы и риккетсиозы). Для клещевого энцефалита и клещевых боррелиозов дан прогноз заболеваемости населения округов на 2011 г. Приведены обобщенные материалы по объемам профилактических мероприятий и обсуждены пути их совершенствования.

Ключевые слова: Клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы и риккетсиозы, заболеваемость, прогноз.

Анализ заболеваемости населения природно-очаговыми инфекциями в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (СФО и ДФО) за 2009–2010 гг. свидетельствует о сохранении на их территории напряженной эпидемиологической ситуации. В общей структуре заболеваемости наиболее неблагоприятна обстановка по инфекциям, передающимся клещами: клещевой энцефалит (КЭ), иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) и риккетсиозы (КР) [1]. Учреждениями Роспотребнадзора особое внимание уделяется КЭ. Это заболевание, хотя и относится к управляемым, продолжает ежегодно регистрироваться на всей территории субъектов СФО и до шести субъектов ДФО, в том числе и с летальными исходами. Удельный вес КЭ в этих округах составляет более 50 % от общероссийской заболеваемости.

Ранее нами дан прогноз изменения уровня заболеваемости КЭ населения СФО на 2008–2012 гг. [8, 9]. В данной работе анализируется его точность и проводится необходимая коррекция ожидаемых показателей на сезон 2011 г. В работу включены и материалы о заболеваемости населения ИКБ и КР, в том числе по ДФО.

В работе использованы ранее опубликованные материалы [1, 8, 9], а также данные Референс-центра ФГУЗ Иркутск НИПЧИ Сибири и ДВ по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней за 2010 г., представленные управлениями Роспотребнадзора субъектов. Статистическая обработка проведена стандартными методами биометрии и анализа временных рядов [4].

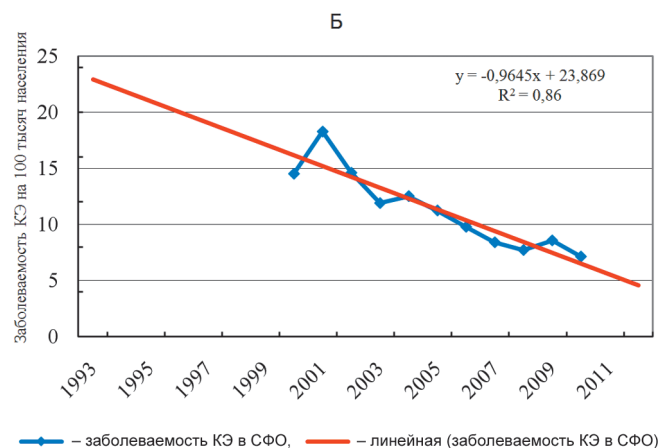
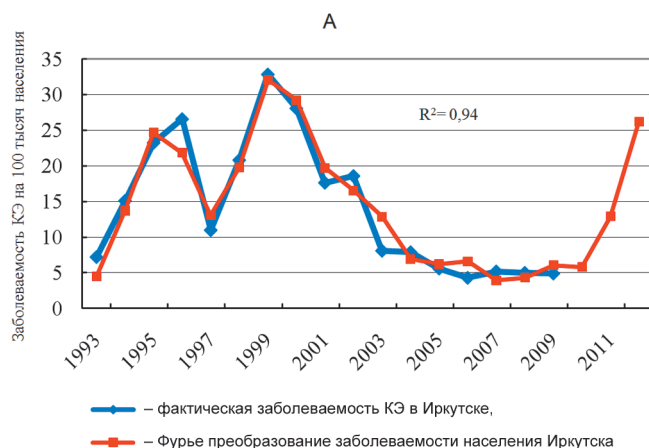
Наиболее часто при прогнозе заболеваемости населения КЭ применяют два подхода: факторный и на основе экстраполяции тенденций временных рядов [2, 3, 7–11]. Каждый способ имеет свои достоинства и недостатки. Сформулированная нами задача краткосрочного прогноза изменения уровня заболеваемости населения КЭ и ИКБ в СФО и ДФО в настоящее время не может быть решена в рамках факторного подхода, т.к. отдельные эндемичные территории географически удалены и будут иметь собственные не исследованные предикторы. В одних случаях это мо-

жет быть температура или влажность в определенный месяц, в других – численность клещей или солнечная активность. Интегрированным показателем может служить уравнение, описывающее тенденцию изменения уровня заболеваемости для всего округа или отдельного его субъекта. Учитывая, что динамика КЭ и ИКБ включает циклические составляющие, логично для их прогноза использовать полиномы или в случае экстраполяции данных одной фазы цикла – регрессионные уравнения (рисунок).

Вместе с тем, применение полинома осложнено тем, что, пока мы не можем предсказать точно время начала новой волны изменения заболеваемости, а также уровня, которого она может достичь в следующем цикле. Предшествующие материалы при этом часто малоинформативны. Так, например, на рисунке (А) отражены данные по фактической заболеваемости населения Иркутска КЭ за 1993–2009 гг. и их аппроксимация рядом Фурье с пятью гармониками. Очень высокий коэффициент детерминации (94 %), казалось бы, должен гарантировать надежность прогноза, судя по которому в 2011–2012 гг. ожидается резкий рост заболеваемости КЭ. Однако здравый смысл и отсутствие в настоящее время явных биологических и эпидемиологических предпосылок для подобного роста заболеваемости заставляет усомниться в верности подобной модели.

Регрессионное уравнение, построенное на основе материалов изменения заболеваемости КЭ в СФО за последние десять лет (рисунок, Б – коэффициент детерминации 86 %), предсказывает продолжение падения ее уровня, причем к 2017 г. практически до нуля. Как бы успешно не развивались в ближайшие годы меры профилактики КЭ, подобный прогноз не представляется реалистичным. Более того, наблюдающееся снижение заболеваемости населения КЭ связывают с самыми разными причинами [5, 6, 10], в большинстве случаев не отводя главной роли совершенствованию мер профилактики.

Как выход из ситуации, когда и циклические, и регрессионные модели прогноза не надежны, прежде всего в силу неясности фундаментальных причин



Два метода прогнозирования заболеваемости населения клещевым энцефалитом:

А – в Иркутске с применением аппроксимации данных рядом Фурье с пятью гармониками;

Б – в СФО с применением аппроксимации данных уравнением линейной регрессии

трендовых изменений заболеваемости населения КЭ, мы использовали для расчета ожидаемых показателей среднюю арифметическую и доверительный интервал [9]. Среднюю вычисляли по данным за несколько ближайших визуально однородных по изменчивости лет. Доверительный интервал рассчитывали для 90 % вероятности, которую обычно применяют при прогнозе биологических явлений.

Сибирский федеральный округ. В 2009 г. в округе зарегистрировано 1676 (8,6 на 100 тыс. населения – $\frac{0}{0000}$) случаев КЭ, 1488 (7,6 $\frac{0}{0000}$) ИКБ, 1726 (8,8 $\frac{0}{0000}$) КР. Эндемичные по КЭ территории есть во всех 12 субъектах СФО. В сочетанных природных очагах одновременное инфицирование таежного клеща (*Ixodes persulcatus*) – основного переносчика КЭ несколькими патогенами приводит к возникновению микст-инфекций.

Обращаемость населения в медицинские учреждения после присасывания клещей составила в 2009 г. 151614 человек. Площадь акарицидных обработок – 15081 га. Уровень заболеваемости населения КЭ в 2009 г. значительно превысил этот показатель в остальных округах РФ (показатель по РФ в 2009 г. составил 2,62 $\frac{0}{0000}$). Кроме того, в округе он был выше в предшествующие два года, что подтвердило сделанный нами ранее прогноз [8].

Данные для каждого субъекта СФО по трем нозологическим формам приведены в табл. 1. Наибольшая заболеваемость КЭ зарегистрирована в Республиках Алтай, Хакасия, Тыва, в Красноярском крае и Томской области. В среднем по этим субъектам в 2009 г. относительный показатель заболеваемости составил 19,1 $\frac{0}{0000}$, что в два раза выше, чем по СФО в целом. Очевидно, что для снижения заболеваемости КЭ, прежде всего, необходимо добиться этого на территориях с наибольшим риском заражения.

За 9 мес. 2010 г. зарегистрировано 1395 (7,1 $\frac{0}{0000}$) случаев КЭ, 1264 (6,5 $\frac{0}{0000}$) ИКБ и 1062 (5,4 $\frac{0}{0000}$) КР (табл. 1). Впервые за многие годы в большинстве субъектов СФО существенно снизилась заболеваемость

одновременно по КЭ, ИКБ и КР.

В период, предшествующий эпидсезону 2010 г., на территории СФО привито от КЭ (вакцинация+ревакцинация) 1020180 человек. Вместе с тем, планы иммунизации населения в большинстве субъектов не выполнены. Акарицидные обработки проводятся преимущественно лишь на территории эпидемиологически значимых объектов. Центров диагностики и профилактики клещевых инфекций более 30, но они работают еще не во всех крупных городах эндемичных территорий СФО. Таким образом, хотя количество зарегистрированных в 2010 г. больных КЭ снизилось до абсолютного минимума последнего десятилетия (рисунок, Б), это связано, прежде всего, с неблагоприятными погодными условиями, сложившимися весной – в начале лета на значительной части территории округа, что привело к ограничению контактов населения с природными биотопами. Именно поэтому наблюдается идентичность характера изменения по всем болезням, передающимися клещами. Корректировка прогноза заболеваемости КЭ на 2010 г., учитывающая особые погодные условия начала сезона, была нами своевременно сделана [9], и в настоящее время ее оправданность подтверждена фактическими данными (табл. 1).

Следовательно, при отсутствии погодных аномалий весной–летом 2011 г., нарушающих контакты людей с природными биотопами, и при сохранении существующих объемов и направленности мер профилактики КЭ следует ожидать на следующий год повышения заболеваемости населения по сравнению с 2010 г.

Количественный прогноз уровня заболеваемости населения СФО КЭ на 2011 г., сделанный на основе среднесноголетнего уровня (2006–2010 гг.) предполагает $(8,2 \pm 0,48) \frac{0}{0000}$. С 90 % вероятностью этот показатель будет находиться в 2011 г. в диапазоне от 5,9 до 10,5 $\frac{0}{0000}$.

В отношении ИКБ наиболее высокая заболеваемость, более чем в два раза превышающая феде-

Заболеваемость населения СФО инфекциями, передающимися клещами, за 2009–2010 гг.

Субъект СФО	Время регистрации	КЭ		ИКБ		КР	
		Абс. число	‰ 0000	Абс. число	‰ 0000	Абс. число	‰ 0000
Республика Алтай	2009 г.	53	25,3	21	10,1	133	63,6
	за 9 мес. 2010 г.	45	21,3	15	7,2	92	44,2
Алтайский край	2009 г.	82	3,3	73	2,9	732	29,1
	за 9 мес. 2010 г.	57	2,3	48	1,9	637	25,5
Республика Бурятия	2009 г.	62	6,4	31	3,2	17	1,8
	за 9 мес. 2010 г.	15	1,6	27	2,8	14	1,5
Забайкальский край	2009 г.	37	3,3	18	1,6	22	2,2
	за 9 мес. 2010 г.	43	3,5	21	1,9	18	1,6
Иркутская область	2009 г.	108	4,3	153	6,1	59	2,4
	за 9 мес. 2010 г.	112	4,5	168	6,7	43	1,7
Кемеровская область	2009 г.	200	7,1	184	6,5	14	0,5
	за 9 мес. 2010 г.	186	6,6	200	7,1	8	0,3
Красноярский край	2009 г.	594	20,6	423	14,6	135	4,7
	за 9 мес. 2010 г.	452	15,6	321	11,1	67	2,3
Новосибирская область	2009 г.	171	6,5	258	9,8	102	3,8
	за 9 мес. 2010 г.	159	6,0	188	7,1	79	3,0
Омская область	2009 г.	63	3,1	51	2,5	1	0,1
	за 9 мес. 2010 г.	20	1,0	20	1,0	6	0,3
Томская область	2009 г.	158	15,2	181	17,8	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	164	15,8	123	11,9	0	0
Республика Тыва	2009 г.	48	15,4	8	2,6	41	13,2
	за 9 мес. 2010 г.	30	9,6	66	21,0	32	10,2
Республика Хакасия	2009 г.	100	18,6	86	16,0	106	19,4
	за 9 мес. 2010 г.	56	10,6	67	12,5	66	12,3

ральный показатель (6,82 ‰₀₀₀₀), отмечена в 2009 г. в Томской области (17,8 ‰₀₀₀₀), Республике Хакасия (16,0 ‰₀₀₀₀) и Красноярском крае (14,6 ‰₀₀₀₀). Резкий рост числа случаев ИКБ в Республике Тыва в 2010 г. (табл. 1), по-видимому, связан с гиподиагностикой болезни в предшествующие годы. Ожидаемое число случаев ИКБ на территории СФО в 2011 г. составит (7,2±0,30) ‰₀₀₀₀, с 90 % вероятностью изменения будут от 5,8 до 8,6 ‰₀₀₀₀.

В 2009 г. зарегистрировано 1726 случаев КР, в том числе 396 (22,9 %) у детей до 14 лет. Наибольшая заболеваемость отмечена в Республике Алтай – 133 случая (63,6 ‰₀₀₀₀) и Алтайском крае – 732 (29,1 ‰₀₀₀₀). В 2010 г. заболеваемость КР в СФО снизилась до 1062 случаев, при сохранении наибольшей напряженности природных очагов в тех же самых субъектах (табл. 1).

Таким образом, эпидемиологическая обстановка по инфекциям, передающимся клещами, осталась в СФО в 2010 г. неблагоприятной. Как и прежде, наибольшее число случаев КЭ характерно для Республик Алтай, Хакасия, Тыва, Красноярского края и Томской области (в 2010 г. средняя по этим субъектам 14,6 ‰₀₀₀₀). Однако во всех этих субъектах, кроме Томской области, проводимый комплекс мероприятий по защите населения, с учетом благоприятствования внешних причин, позволил в значительной мере снизить заболеваемость, что положительно

отразилось на статистике всего округа (табл. 1). Для сохранения достигнутых результатов в 2011 г. считаем необходимым:

1. Проводить вакцинацию населения против клещевого энцефалита с учетом уровня напряженности эпидемического процесса на отдельных территориях, 95 % вакцинация населения от КЭ необходима в муниципальных районах субъектов с высоким риском заболеваемости. На остальных территориях достаточно прививать людей, связанных с лесом (трудовая деятельность и/или отдых). Во всех крупных городах на эндемичных по клещевому энцефалиту территориях необходимо открытие Центров или кабинетов исследования клещей и крови пострадавших с целью экстренной специфической профилактики. Комплекс мер профилактики планировать и проводить дифференцированно, с учетом эпизоотических и эпидемических особенностей проявления клещевых инфекций.

2. Увеличить площади акарицидных обработок, с целью их оптимизации концентрировать усилия на наиболее опасных территориях, создать региональные схемы сроков и кратности проведения работ. В муниципальных образованиях с преобладающим сельским населением целесообразно бороться с клещами путем обработки пестицидами крупного рогатого скота, коз, овец, что должно привести к снижению заболеваемости всеми инфекциями, передаю-

щимися клещами.

3. Обучать население правилам безопасности в условиях жизни на эндемичных по клещевым инфекциям территориях, разъяснять необходимость мер индивидуальной профилактики (вакцинация за счет собственных средств, применение при нахождении в лесу акарицидов, репеллентов, специальной защитной одежды), а также быстрого обращения в Центры экстренной профилактики в случае присасывания клеща.

Дальневосточный федеральный округ. В 2009 г. в ДФО зарегистрировано 57 ($0,9 \text{ ‰}$) случаев КЭ, 300 ($4,6 \text{ ‰}$) – ИКБ и 249 ($3,8 \text{ ‰}$) – КР. За 9 месяцев 2010 г. – 68 ($1,0 \text{ ‰}$) КЭ, 267 ($4,1 \text{ ‰}$) – ИКБ, 215 ($3,3 \text{ ‰}$) – КР.

Очевидно, риск заболеть инфекциями, передающимися при укусе клещей, для населения этого округа значительно меньше чем в СФО. Особенно существенны различия в уровне заболеваемости КЭ (табл. 2). В ряде субъектов ДФО болезнь не регистрируется или наблюдаются спорадические случаи. Связано это с тем, что территории многих субъектов ДФО выходят за пределы ареалов иксодовых клещей, или заселены ими крайне незначительно ввиду неблагоприятных для переносчиков климатических условий.

При отсутствии продолжительных погодных аномалий весной следующего сезона и при сохранении существующих объемов и направленности мер профилактики КЭ и ИКБ, заболеваемость населения ДФО КЭ в 2011 г. составит ($0,97 \pm 0,096 \text{ ‰}$) (прогноз сделан на основе нахождения среднепогодных показателей за 2004–2010 гг.). С 90 % вероятностью

число зарегистрированных случаев КЭ на территории ДФО в 2011 г. будет находиться в диапазоне от 0,5 до $1,5 \text{ ‰}$.

Количественный прогноз уровня заболеваемости населения ДФО ИКБ на 2011 г., предполагает значение ($4,2 \pm 0,26 \text{ ‰}$) при 90 % вероятности изменения фактических значений этого показателя от 2,7 до $5,7 \text{ ‰}$.

Ситуация, сложившаяся в Приморском крае, где на КЭ приходится 78 % от региональной заболеваемости, регистрация тяжелых форм болезни с летальными исходами, подготовка к проведению саммита стран АТЭС в 2012 г. в г. Владивостоке и на острове Русском требуют усиления профилактических мер. Считаем необходимым проведение следующих мероприятий: обязательное выполнение планов вакцинации, особенно среди контингента «групп риска»; активизация работы по пропаганде населению знаний о правильном поведении в лесу в период активности клещей, необходимости быстрого обращения пострадавших от укусов клещей в Центры или кабинеты экстренной профилактики; проведение не менее двух акарицидных обработок территорий эпидемиологически значимых объектов, с учетом времени активности переносчика и сроков распада в окружающей среде применяемых пестицидов.

Для снижения уровня заболеваемости населения ИКБ и КР необходимы неспецифическая профилактика и совершенствование работы Центров диагностики и профилактики клещевых инфекций в Сахалинской и Амурской областях, Хабаровском крае, Еврейской автономной области (табл. 2). Не ре-

Таблица 2

Заболеваемость населения ДФО инфекциями, передающимися клещами, за 2009–2010 гг.

Субъект ДФО	Время регистрации	КЭ		ИКБ		КР	
		Абс. число	‰	Абс. число	‰	Абс. число	‰
Амурская область	2009 г.	2	0,23	5	0,6	112	13,0
	за 9 мес. 2010 г.	3	0,35	13	1,5	19	2,2
Еврейская автономная область	2009 г.	1	0,5	3	1,6	11	5,9
	за 9 мес. 2010 г.	3	1,6	1	0,5	16	8,6
Камчатская область	2009 г.	0	0	0	0	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	0	0	0	0
Корякский автономный округ	2009 г.	0	0	0	0	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	0	0	0	0
Магаданская область	2009 г.	0	0	0	0	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	0	0	0	0
Приморский край	2009 г.	44	2,2	173	8,7	126	6,6
	за 9 мес. 2010 г.	54	2,7	148	7,4	115	5,8
Республика Саха (Якутия)	2009 г.	1	0,2	0	0	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	0	0	0	0
Сахалинская область	2009 г.	1	0,2	69	13,4	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	69	13,4	0	0
Хабаровский край	2009 г.	9	0,6	50	3,6	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	8	0,6	36	2,6	65	4,6
Чукотский автономный округ	2009 г.	0	0	0	0	0	0
	за 9 мес. 2010 г.	0	0	0	0	0	0

ализованным остается проведение неспецифической профилактики всех клещевых инфекций, в особенности КР, путем обработки пестицидами свободно выпасаемого общественного и частного скота.

Итак, в 2011 г. следует ожидать подъема заболеваемости населения КЭ и ИКБ на территории СФО и в меньшей степени ДФО. Предпринимаемые меры профилактики очень важны. Но их объем обеспечивает сдерживание эпидемического процесса на среднемноголетнем уровне. Снижения заболеваемости можно добиться при расширении и комплексном использовании всех приемов профилактики, причем дифференцированно, с учетом эпидемиологической обстановки в каждом муниципальном образовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Бренева Н.В. Деятельность Референс-центра по природно-очаговым инфекционным болезням ФГУЗ Иркутск НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора по обеспечению эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока. Дальневост. журн. инф. патол. 2010; 17:160–6.
2. Болотин Е.И., Цициашвили Г.Ш., Голычева И.В., Бурухина И.Г. Возможности факторного прогнозирования заболеваемости клещевым энцефалитом в Приморском крае. Паразитология. 2002; 36(4):280–5.
3. Верета Л.А. Принципы прогнозирования заболеваемости клещевым энцефалитом. М.; 1975. 135 с.
4. Дуброва Т.А. Статистические методы прогнозирования. Уч. пособие для вузов. М.: ЮНИТИ-ДАНА; 2003. 206 с.
5. Коренберг Э.И. Природная очаговость инфекций: современные проблемы и перспективы исследований. Зоол. журн. 2010; 89(1):5–18.
6. Львов Д.К., Злобин В.И. Стратегия и тактика профилактики клещевого энцефалита на современном этапе. Вопр. вирусол. 2007; 5:26–30.
7. Наумов Р.Л., Гутова В.П., Фонарева К.С. Степень совпадения долгосрочного экстраполяционного экспертного прогноза с реальной заболеваемостью клещевым энцефалитом в СССР. Мед. паразитол. 1990; 5:40–3.
8. Никитин А.Я., Балахонов С.В., Андаев Е.И., Хазова Т.Г., Евтушок Г.А., Козловский Л.И. и др. Эпидемиологическая обстановка по клещевому энцефалиту, ее прогноз и основные направления профилактических мероприятий в регионах Сибири. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):21–4.
9. Никитин А.Я., Балахонов С.В., Андаев Е.И., Чеснокова М.В. Прогноз заболеваемости населения клещевым энцефалитом в Сибирском федеральном округе в 2010–2012 гг. Журн. инф. патол. 2010; 17(3):103–5.
10. Пенъевская Н.А. Оценка эффективности этиотропной профилактики инфекций, передающихся иксодовыми клещами (проблемы теории и практики). Омск: «ИЦ Омский научный вестник»; 2010. 232 с.
11. Хазова Т.Г., Козарь Е.В., Данчук Г.М., Замятина Е.П. Современная эколого-паразитологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям, переносимым клещами, в Красноярском крае. Эпидемиол.и вакцинопрофилактик. 2010; 2:41–6.

A.Ya.Nikitin, E.A.Sidorova, E.I.Andaev, M.V.Chesnokova

Tick-Borne Infections Incidence among the Population of Siberian and Far East Federal Districts in 2009 and 2010 and Prognosis for 2011

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

Presented are the data on tick-borne infections (tick-borne encephalitis, tick-borne borreliosis and rickettsiosis) incidence among the population of the constituent entities of Siberian and Far East Federal Districts in 2009 and 2010. Given is the prognosis on tick-borne encephalitis and tick-borne borreliosis incidence among the population of the Districts for 2011. Generalized information on the amount of preventive measures is presented and the ways of their improvement are discussed.

Key words: tick-borne encephalitis, tick-borne borreliosis and rickettsiosis, morbidity, prognosis.

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

1. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Breneva N.V. [The Work of the Reference Center of Natural Focal Infectious Diseases of Irkutsk RAPI of Siberia and Far East on Provision of Epidemiological Well-Being of the Population of Siberia and Far East]. Dal'nevost. Zh. Infekts. Patol. 2010; 17:160–6.
2. Bolotin E.I., Tsitsiashvili G.Sh., Golycheva I.V., Burukhina I.G. [Possibilities of Factor Prognostication of Tick-Borne Encephalitis Morbidity in the Primorski Krai]. Parazitol. 2002; 36(4):280–5.
3. Vereta L.A. [The Principles of Prognostication of Tick-Borne Encephalitis Morbidity]. Moscow; 1975. 135 p.
4. Dubrova T.A. [Statistic Methods of Prognostication]. Moscow: YUNITI-DANA; 2003. 206 p.
5. Korenberg E.I. [Natural Focality of Infections: Modern Problems and Perspectives of Investigations]. Zool. Zh. 2010; 89(1):5–18.
6. L'vov D.K., Zlobin V.I. [Prevention of Tick-Borne Encephalitis at the Present Stage: Strategy and Tactics]. Vopr. Virusol. 2007; 52(5):26–30.
7. Naumov R.L., Gutova V.P., Fonareva K.S. [The Degree of Coincidence of the Long-Term Extrapolated Expert Prognosis with the Real Morbidity of Tick-Borne Encephalitis in the USSR]. Med. Parazitol. 1990; 5:40–3.
8. Nikitin A.Ya., Balakhonov S.V., Andaev E.I., Khazova T.G., Evtushok G.A., Kozlovsky L.I., Ivanova E.V. [Tick-Borne Encephalitis Epidemiological Situation, its Prognostication and Main Trends of Preventive Measures in Siberian Regions]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 98:21–4.
9. Nikitin A.Ya., Balakhonov S.V., Andaev E.I., Chesnokova M.V. [Prognosis of Tick-Borne Encephalitis Morbidity in Population of Siberian Federal District in 2010–2012]. Zh. Infek. Patol. 2010; 17(3):103–5.
10. Pen'evskaya N.A. [Assessment of the Efficiency of Etiotropic Prophylaxis of Infections Transmitted by Ticks (Problems of Theory and Prophylaxis)]. Omsk: Omsky Nauchny Vestnik; 2010. 232 p.
11. Khazova T.G., Kozar' E.V., Danchuk G.M., Zamyatina E.P. [Current Ecological-Parasitological Situation on Natural Focal Tick-Borne Infections in the Krasnoyarsk Krai]. Epidem. Vakcinoprof. 2010; 2:41–6.

Authors:

Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Andaev E.I., Chesnokova M.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Андаев Е.И., Чеснокова М.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 20.01.11.

Л.П.Окунев, А.В.Мазепа

**ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ
В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ СИБИРСКОГО И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО
ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОКРУГОВ В 2010 г. И ПРОГНОЗ НА 2011 г.***ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»*

Представлена обработанная информация о состоянии природных очагов туляремии на территории Сибири и Дальнего Востока за 10 месяцев 2010 г. и сведения по заболеваемости людей за этот период. Дается прогноз эпизоотологической ситуации на 2011 г.

Ключевые слова: эпизоотологическая ситуация, природные очаги туляремии, заболеваемость, серологические исследования, антитела, антиген.

Настоящее сообщение основывается на материалах, поступивших в ФГУЗ Иркутск НИПЧИ Сибири и ДВ Роспотребнадзора, из противочумных станций, управлений Роспотребнадзора и ФГУЗ ЦГиЭ в субъектах Сибири и Дальнего Востока, содержащих сведения об эпизоотологическом состоянии и численности основных носителей и переносчиков туляремии в различных очагах этой инфекции.

Эпизоотии разной степени активности зарегистрированы в 2010 г. на большей части рассматриваемой территории. В Сибирском федеральном округе наиболее активные эпизоотии отмечены на территории Западной Сибири. В Новосибирской области, где за девять месяцев 2010 г. выявлено 19 случаев туляремии у людей, в околородных биотопах Присалаирской и Приобской ландшафтных зон зарегистрирована самая интенсивная за последние 20 лет эпизоотия туляремии. В Новосибирском районе из органов водяной полевки, проб воды, из водоемов и от слепней выделено восемь культур возбудителя туляремии. При исследовании органов грызунов, воды, погадок хищных птиц и гнездового материала из различных районов области получено 400 положительных серологических результатов.

По-прежнему активны природные очаги туляремии в Алтайском крае и Республике Алтай, где зарегистрированы случаи заболевания людей (2 и 3 соответственно). В Алтайском крае от клещей *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor reticulatus*, *D. silvarum*, *D. marginatus*, *Ixodes persulcatus*, собранных в очагах предгорно-ручьевого и пойменно-болотного типов, изолировано 11 культур возбудителя туляремии. Циркуляция возбудителя подтверждена серологически – 179 позитивных проб с 29 территорий края (титры в РНАт, РНГА от 1:20 до 1:80). В Чойском и Майминском районах Республики Алтай выделено семь культур туляремийного микроба от клещей *H. concinna* и органов мелких млекопитающих, получено также серологическое подтверждение эпизоотий в предгорной зоне, выявлен антиген в трех пробах иловых отложений в окрестностях Горно-Алтайска. В Кемеровской области зарегистрирован один случай заболевания туляремией. При серологи-

ческом исследовании крови мелких млекопитающих выявлены антитела в 77 (8 %) пробах в титрах от 1:20 до 1:80, в 27 (2,8 %) пробах – антиген в разведениях от 1:20 до 1:60, в 8 (16,3 %) пробах от погадок хищных птиц – от 1:20 до 1:80. Три случая заболевания людей зарегистрировано в Красноярском крае. На территории края выявлены вялотекущие эпизоотии в природных биотопах 12 районов. При серологическом исследовании методом РНАт 1179 проб погадок хищных птиц и гнездового материала получено 233 (19,8 %) положительных результата в разведениях от 1:10 до 1:320.

Снижение эпизоотической активности очагов туляремии отмечено в Омской и Томской областях. В Омской области серологическими методами исследовано 935 проб млекопитающих, в реакции РНГА – 525, из них положительных 27 (5,1 %), в РНАт – 406, из них положительных 32 (7,9 %). В Томской области в РНГА исследовано 50 мелких млекопитающих весной (положительный результат – 24,0 %) и 150 осенью (положительный результат – 14,0 %). При серологическом исследовании 160 иксодовых клещей получен один положительный результат (0,6 %).

Локальные эпизоотии зарегистрированы в республиках Тыва и Бурятия, Иркутской области и Забайкальском крае. В Республике Тыва эпизоотические проявления зарегистрированы в четырех козулах – 13 положительных серологических результатов от клещей *D. nuttalli*, 3 – мелких млекопитающих и 14 – погадок хищных птиц. В Иркутской области при серологическом исследовании полевого материала в РНГА получено четыре положительных результата от трупов грызунов, обнаруженных в Заларинском районе, и два от погадок хищных птиц в Нукутском районе. В Республике Бурятия при исследовании 134 погадок хищных птиц, собранных в трех районах, методом ИФА на антиген выявлено 66 (49,3 %) серопозитивных проб. От клещей *D. nuttalli* (60 проб), собранных в Джидинском районе, в РНГА серопозитивные результаты определены в 24 (40 %) пробах в разведениях от 1:20 до 1:280.

В Забайкальском крае «следы» прошедших эпизоотий подтверждены небольшим количеством серо-

логических находок антител к туляремийному микробу у мелких млекопитающих, отловленных в пойме р. Ингода и на Южном склоне Яблоневого хребта.

В Хабаровском крае Дальневосточного федерального округа установлена инфицированность водоемов в лесных биотопах южных районов. Выделено пять культур возбудителя туляремии в разных точках забора воды. Обнаружена ДНК *Franciscella tularensis* в трех из 50 исследованных клещей *I. persulcatus*. В лугово-полевом очаге обнаружен туляремийный антиген в субстратах четырех гнезд и двух погадках (в РНАт от 1:20 до 1:60). В двух из трех исследованных гнезд грызунов обнаружен туляремийный антиген в низких концентрациях. В Камчатском крае положительные результаты серологических исследований крови кунных, отловленных в шести районах, дают основание говорить об эпизоотиях среди мелких млекопитающих в зимний период 2009–2010 гг.

Проявления туляремии зарегистрированы в Амурской области, где при серологическом исследовании мелких млекопитающих, субстратов гнезд, погадок хищных птиц и помета животных положительные находки обнаружены в 1,8 %; в Приморском крае на наличие специфических антител исследовались мышевидные грызуны, в девяти случаях получен положительный результат; в Сахалинской области выявлена ДНК туляремийного микроба у одного экземпляра исследованных мелких млекопитающих.

Отрицательные результаты лабораторных исследований на территории СФО и ДФО получены в Тюменской области, Еврейской автономной области и Республике Саха (Якутия).

В 2011 г. активные эпизоотии ожидаются в Тавризском, Знаменском и Тарском районах Омской области. Сохранится эпизоотическая напряженность в очагах туляремии Новосибирской области и в очагах предгорно-ручьевого типа Алтайского края. Активизация очагов туляремии прогнозируется в Республике Алтай. Возможны локальные эпизоотии туляремии в зонах северной тайги, низкогорно-лесной, лесостепной западной, Западно-Саянской горно-таежной и лесостепной восточной Красноярского края. При благоприятных условиях зимнего периода 2010–2011 гг. локальные эпизоотические проявления этой болезни возможны в Кемеровской, Тюменской, Томской областях,

Республике Бурятия, Забайкальском крае, Амурской области, Хабаровском и Приморском краях.

Снижение эпизоотической активности ожидается в природных очагах Республики Тыва, Иркутской области и Камчатского края. Маловероятны проявления туляремии в Республике Саха (Якутия) и Еврейской автономной области

Высокая заболеваемость людей в Новосибирской области и спорадические случаи заболевания в Республике Алтай, Алтайском и Красноярском краях, а также в Кемеровской области связаны с активизацией природных очагов туляремии на этих территориях. Эпизоотические проявления этой инфекции отмечались на территории большинства субъектов Российской Федерации, однако они носили локальный характер. Наличие высоких показателей инфицированности объектов окружающей среды возбудителем туляремии в Новосибирской и Кемеровской областях, Красноярском и Алтайском краях, республиках Алтай и Бурятия требует дальнейшего мониторинга эпизоотологической и эпидемиологической ситуации на неблагополучных по этой болезни территориях с привлечением дополнительных методов лабораторной диагностики и усилением профилактических мероприятий.

L.P.Okunev, A.V.Mazepa

Epizootiological and Epidemiological Situation in the Tularemia Natural Foci of Siberian and Far East Federal Districts in 2010 and Prognosis for 2011

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

Summarized data on the condition of tularemia natural foci in the territory of Siberia and Far East for 10 months of 2010 are presented in brief. Information on human morbidity during this period is given. The prognosis of epizootiological situation for 2011 is presented.

Key words: epizootologic situation, tularemia natural foci, morbidity, serologic examination, antibodies, antigen.

Authors:

Okunev L.P., Mazepa A.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Окунев Л.П., Мазепа А.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 20.01.11

Н.В.Попов¹, В.Е.Безсмертный², А.Н.Матросов¹, Л.С.Немченко³, Д.Б.Вержуцкий³, О.В.Малецкая⁴,
А.И.Удовиков¹, А.А.Кузнецов¹, Т.В.Князева¹, Л.Д.Шилова¹, В.В.Горшенко², В.П.Попов², В.П.Топорков¹,
А.В.Топорков¹, В.В.Кутырев¹

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2010 г. И ПРОГНОЗ НА 2011 г.

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²ФГУЗ «Противочумный центр Роспотребнадзора», Москва;

³ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,

⁴ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

В обзоре приведены результаты эпизоотологических наблюдений в 11 природных очагах чумы на территории Российской Федерации в 2010 г. На основании анализа материалов об эпизоотической активности, состоянии популяций носителей и переносчиков чумы, влияния на условия их существования абиотических факторов представлен краткосрочный прогноз эпизоотической активности очагов.

Ключевые слова: природные очаги чумы, носители и переносчики чумы, эпизоотии чумы, прогноз эпизоотической активности.

На территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья в 2000–2010 гг. из 45 природных очагов чумы в 19 отмечалась высокая, в 12 – средняя эпизоотическая активность. В 14 очагах проявления чумы не зарегистрированы. Наблюдались изменения ареалов носителей и переносчиков чумы, динамика численности которых определяет сезонные и многолетние особенности проявлений этой опасной зоонозной инфекции [1, 5, 10]. Отмечается распространение и увеличение численности синантропных грызунов [2, 8], появление в населенных пунктах блох – активных переносчиков чумы [3, 4]. Интенсивная хозяйственная деятельность человека, увеличение численности постоянного и временного населения на энзоотичной территории обуславливают высокую эпидемиологическую напряженность по чуме в современных условиях. Не исключена опасность заноса возбудителя больными людьми и с зараженными чумой животными из стран дальнего зарубежья, неблагополучными по этой инфекции [6, 7, 9, 12].

Общая площадь энзоотичной по чуме террито-

рии Российской Федерации и стран ближнего зарубежья оценивается в настоящее время в 2123660 км². В границах России она составляет 253590 км² (12 %), а большая часть приходится на долю Республики Казахстан (50 %), где эти очаги занимают огромные площади зональных пустынь и полупустынь. В таблице и на рис. 1 приведены данные об эпизоотической обстановке по чуме в 2000–2010 гг. Обращает на себя внимание некоторый подъем эпизоотической активности, обусловленный многолетним ритмом динамики этого явления.

Следует отметить, что краткосрочный прогноз эпизоотической активности на территории природных очагов чумы Российской Федерации, данный на 2010 г. [11], в целом оправдался. Недостаточно точными оказались оценки показателей динамики численности носителей и переносчиков чумы в некоторых очагах, что объясняется аномальными погодными явлениями на территории России в прошедшем году.

В 2010 г. эпизоотии чумы на территории России зарегистрированы в 3 природных очагах: было вы-

Эпизоотическая обстановка по чуме на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья в 2000–2010 гг.

Год	Число культур чумы			Площадь эпизоотий, км ²		
	Россия	Казахстан	Все страны	Россия	Казахстан	Все страны
2000	66	259	376	1334	25106	28740
2001	128	309	470	2314	35017	38331
2002	156	603	791	2688	38903	43301
2003	145	432	613	2168	35861	39830
2004	151	631	959	1577	46122	53399
2005	104	318	466	1233	32883	39316
2006	161	146	325	1257	27187	31144
2007	102	197	308	1161	20474	21675
2008	157	344	501	1339	36900	39959
2009	77	255	332	1602	29000	30892
2010	85	465	550	2042	35000	37042

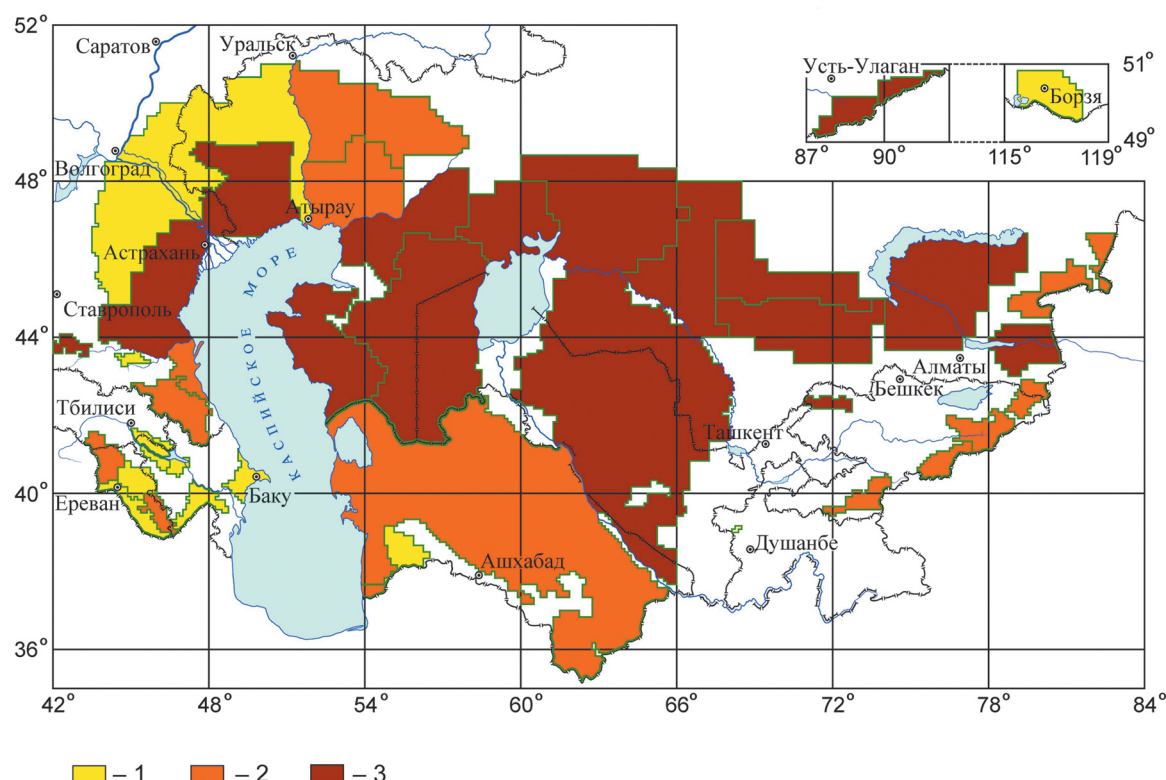


Рис. 1. Эпизоотическая активность природных очагов чумы на территории России и стран ближнего зарубежья в 2000–2010 гг.:

1 – низкая, 2 – средняя, 3 – высокая

делено 85 штаммов чумного микроба на общей площади 2042 км². Достаточно высокая эпизоотическая активность отмечена, как и в предыдущие годы, в Алтайском горном очаге (71 штамм с территории 7 секторов). Локальные эпизоотии весной и осенью выявлялись в Прикаспийском песчаном (11 штаммов, 6 секторов), летом – в Восточно-Кавказском горном (3 штамма, 2 сектора) очагах. Только серологически была подтверждена циркуляция микроба чумы в Центрально-Кавказском высокогорном и Тувинском горном очагах.

Центрально-Кавказский высокогорный очаг (01). Очаг является одним из наиболее эпизоотически активных, однако на протяжении трех последних лет возбудителя чумы на территории очага выделить не удается. В 2010 г. серологическим методом обнаружено 49 положительных проб зверьков с низкими титрами антител (до 1:160 в РНАг, до 1:320 в РПГа).

Площадь поселений основного носителя чумы – горного суслика продолжает сокращаться и в настоящее время оценивается в 50 тыс. га. Средняя численность зверьков в поселениях составила 20,4 ос./га, что соответствует многолетней норме (20–25 ос./га). Повсеместно наблюдаются расширение ареалов и повышение численности обыкновенной и водяной полевых, в то время как распространение и численность лесной и домовых мышей сокращаются. Средний показатель численности мышевидных грызунов составил 5,5 % попадания. Достаточно высокой регистри-

руется численность домовых мышей в населенных пунктах – 10,5 % (до дератизации).

Численность основных переносчиков чумы – блох сусликов *Citellophilus tesquorum* характеризуется средними показателями: 450 экз./га. Достаточно выраженной была миграция блох во входах нор сусликов: общий индекс обилия (ИО) мигрирующих блох колебался от 0,1 до 0,7. Относительно высокими оказались ИО на полевках: от 3 до 22 блох. Блох в населенных пунктах не обнаружено.

С учетом наметившейся тенденции повышения плотности горного суслика в его поселениях в 2011 г., по-видимому, можно ожидать стабилизации ареала в существующих границах. Численность мышевидных грызунов, в первую очередь обыкновенной и водяной полевых, может превысить многолетнюю норму. Численность блох грызунов ожидается на уровне средней многолетней величины. В этих условиях на территории очага в 2011 г. не исключены локальные проявления эпизоотий чумы в ее микроочагах.

Терско-Сунженский низкогорный очаг (02). С 1992 г. на территории очага регулярное эпизоотологическое обследование не проводится. В 2000 г. в Малгобекском районе Республики Ингушетия в поселениях малого суслика было выделено 3 штамма чумного микроба. В последующем, вплоть до 2010 г., очаг не обследовался. На основании визуальной оценки состояния популяций животных – носителей и переносчиков чумы в этом очаге – развитие эпизоо-

тий чумы маловероятно.

Дагестанский равнинно-предгорный очаг (03). Последняя эпизоотия выявлена в 2003 г. на территории Бабаюртовского района Республики Дагестан. В 2006–2007 гг. отмечены находки переболевших чумой грызунов. В 2008–2010 гг. инфицированных животных и серопозитивных зверьков не обнаружено.

В 2010 г. отмечался некоторый рост численности основного носителя чумы – малого суслика. В равнинной части средняя плотность его составила 2,6 ос./га, что выше многолетней нормы (0,8), в предгорной – 8,1 ос./га, что также превышает средний многолетний показатель (6,8). Численность гребенщиковой песчанки отмечена на низком уровне: весной – 1,6 ос./га (норма 6,4), осенью – 2,7 ос./га (норма 7,6). Также низкими оказались показатели численности мышевидных грызунов: в равнинной части весной попадание в ловушки составило 0,8 % (норма 2,1), в предгорной – 3,6 % (норма 3,4), осенью – в равнинной части 3,3 (норма 8,3), в предгорной – 9,1 % (норма 10,3). Численность мышевидных грызунов в населенных пунктах также остается низкой – до 2,2 %.

Численность блох малого суслика – основных переносчиков чумы в очаге повсеместно увеличилась. Общий запас их блох в равнинной части очага в 2010 г. составил 48,0 экз./га (норма 18,0), в предгорной части повысился до 510 экз./га (норма 156). Вместе с тем значительно сократилась численность блох второстепенных носителей. В поселениях гребенщиковой песчанки она составила 2,5 экз./га (норма 23,5). На общественной полевке ИО на зверьках в равнинной части составил 0,6, в предгорной – 1,2 блохи, что несколько выше многолетних показателей, но объясняется перераспределением паразитов в результате снижения численности прокормителей. Индексы обилия блох на других мышевидных грызунах были очень низкими: 0,01–0,06. Блох в населенных пунктах не обнаружено.

В 2011 г. будет сохраняться тенденция некоторого роста численности малого суслика и его блох. К весне следует ожидать сокращения численности гребенщиковой песчанки, мышевидных грызунов и их специфических блох. Учитывая сложившуюся ситуацию, маловероятно возникновение угрожающих человеку эпизоотий чумы на территории очага, однако не исключаются единичные находки зараженных чумой животных на локальных участках.

Прикаспийский Северо-Западный степной очаг (14). С 1991 г. и до настоящего времени очаг находится в состоянии межэпизоотического покоя.

Численность малого суслика в разных частях очага отличалась. В Кумо-Манычской степи в настоящее время поселения этого вида сохранились в виде микроочагов на суммарной площади, оцениваемой в несколько сотен гектар, плотность зверьков составляла 2,6 ос./га. На Ергенях и в ложине Даван численность суслика не превышала 5,0 ос./га, а на территории Низменно-солонцеватых степей и Волго-Сарпинской низины – 9,6 ос./га, что соответствует многолетней

норме (9,4). Численность гребенщиковой и полуденной песчанок в Приволжских песках весной составила 4,3, осенью – 5,7 ос./га. В островных песках на Черных землях плотность песчанок приближалась к средней многолетней: весной 8,8, но к осени сократилась до 5,5 ос./га. Достаточно высокой была численность мышевидных грызунов: на Черных землях весенний показатель составил 13,2 %, осенний – 12,7, в Низменно-солонцеватых степях соответственно 9,9 и 12,3 %, в то время как на Ергенях численность была заметно ниже: весной – 0,9, осенью – 3,7 %. Численность домовых мышей в населенных пунктах отмечена на уровне средней многолетней величины весной – 5,4 %, но ниже нормы осенью – 6,9 %.

Численность блох малого суслика повсеместно оказалась ниже многолетних значений или приближалась к ним. Общий их запас составил 296 экз./га, что ниже нормы (371). Показатели численности блох второстепенных носителей невелики: на общественной полевке ИО составил 1,3, на обыкновенной – 1,1, сером хомячке – 1,2, малой лесной мыши – 0,9, домовой мыши – 0,1. В Кумо-Манычском междуречье при обследовании населенных пунктов на клеевые листы была собрана 1 блоха *Pulex irritans*.

К весне 2011 г. численность малого суслика будет мало отличаться от показателей последних лет и в целом по очагу не превысит средней многолетней нормы. Численность малых песчанок и мышевидных грызунов окажется ниже нормы. Общий запас блох малого суслика также останется на низком уровне. В этих условиях трудно ожидать эпизоотических проявлений чумы на территории очага.

Волго-Уральский степной очаг (15). В очаге на территории России последние эпизоотии чумы регистрировались в Харабалинском районе Астраханской области (ур. Тугай-Худук) в 1975 г., на территории Казахстана (Урало-Кушумское междуречье) – в 1995 г.

На российской территории очага продолжается глубокая депрессия численности популяции малого суслика. Средняя плотность его составила 2,9 ос./га, что почти втрое ниже нормы (8,8). В зональных степных биотопах численность мышевидных грызунов даже осенью была низкой. Лишь в аazonальной Волго-Ахтубинской пойме весной процент попадания в дилки составил 14,8, увеличившись к осени до 17,0, что близко к многолетней норме. Невысокими отмечались показатели численности домовых мышей в населенных пунктах: весной – 4,0, осенью – 5,4 %.

Очень низкой была численность специфических блох малого суслика: общее их обилие оценивалось в среднем 67 экз./га, что более чем в 5 раз меньше нормы (368). Блохи на второстепенных носителях встречались в небольших количествах.

В 2011 г. популяции малого суслика и их специфических эктопаразитов будут оставаться в состоянии депрессии. Численность мышевидных грызунов весной в аazonальных и интразональных биотопах окажется на уровне средней многолетней, а в степи

будет значительно ниже нормы. В этих условиях на российской территории очага маловероятно развитие эпизоотий чумы.

Тувинский горный природный очаг (37). В 2010 г. на территории Тувинского очага культур возбудителя чумы не выделено. Получено лишь 20 сероположительных проб от длиннохвостого суслика в низких титрах РПГА (1:40 – 1:160) на территории Монгун-Тайгинского участка очаговости.

Численность основного носителя чумы – длиннохвостого суслика продолжает сокращаться. В 2010 г. весной средняя плотность его в поселениях снизилась до 2,1 ос./га, что в полтора раза ниже нормы (3,0). К лету численность суслика возросла лишь в 1,9 раз – 4,0 ос./га (в норме увеличивается в 3–5 раз). На низком уровне также регистрируется численность второстепенных носителей чумы: монгольской и даурской пищух – 0,23 и 0,33 жилых колоний на 1 га соответственно, монгольского сурка (тарбагана) – 0,95 жилых бутанов на га, мышевидных грызунов – 3,7 % попадания в давилки. Показатели численности грызунов в населенных пунктах сократились и составили осенью на стоянках животноводов 4,7 %, в поселках – лишь 2,4 %.

Более высокой в сравнении с прошлыми годами отмечалась численность блох – основных переносчиков чумы. Так, ИО блох длиннохвостого суслика в шерсти составил 5,0, во входах нор – 0,37, в гнездах – 60,0. Эти показатели, однако, отражают особенности их перераспределения в результате снижения поголовья прокормителей. Общий запас блох суслика в пересчете на 1 га остается невысоким – 140 экз./га. На второстепенных носителях ИО были несколько выше прошлогодних, но с учетом низкой численности хозяев общий их запас оставался очень низким. В населенных пунктах регистрировались блохи диких грызунов.

Весной 2011 г. можно ожидать сохранения низкого уровня численности носителей и переносчиков чумы на территории очага. При благоприятных условиях к лету возможно увеличение поголовья зверьков, но численность их эктопаразитов сократится. В создавшейся ситуации маловероятно развитие эпизоотического процесса, но возможны единичные находки зараженных грызунов и инфицированных блох на участке стойкого проявления чумы.

Забайкальский степной очаг (38). В прошлом один из наиболее активных очагов чумы с 1971 г. находится в состоянии межэпизоотического покоя. В 2010 г. на фоне низкой численности носителей и переносчиков возбудитель чумы при бактериологическом и серологическом обследовании также не выявлен.

Состояние популяций основного носителя – даурского суслика крайне неудовлетворительное. Поселения его малочисленны и разобщены. В 2010 г. плотность этого вида в поселениях составила всего 0,3 ос./га, что вдвое ниже средней многолетней за последнее десятилетие (0,6). По-прежнему низкой остается численность монгольского сурка (0,1–1,5

жилых бутанов на 1 га), даурской пищухи (0,2 жилых колоний на 1 га), монгольской песчанки, полевки Брандта и домовый мыши. Отмечено повышение численности узкочерепной (стадной) полевки: при весенних показателях – 0,2 нор/га и 0,6 % попадания в давилки к осени средние ее значения возросли до 7,4 нор/га и 13,5 % соответственно. Сравнительно высокой была осенняя численность джунгарского (3,5 %) и даурского (2,8 %) хомячков. Численность синантропных грызунов остается низкой: домовый мыши – 2,6 %, серой крысы – 0,1 %.

Численность основных переносчиков – блох даурского суслика также отмечалась на низком уровне. В 2010 г. общий их запас в микробиотопе по участкам составил: на Торейских равнинах – 88,5 блох (норма 90,7), на Харанорском мелкосопочнике – 50,1 (68,7), на Соктуйском низкогорье – 21,4 (42,1). Крайне низкими остаются и показатели численности специфических блох тарбагана, пищух, полевки Брандта. Показатели численности блох узкочерепной полевки и хомячков отмечались на среднем многолетнем уровне, но при ограниченности распространения прокормителей это не влияло на величину общего запаса блох на территории очага.

В 2011 г. нет оснований ожидать увеличения поголовья даурского суслика, тарбагана и общего запаса их специфических блох. Крайне низкие показатели численности носителей и переносчиков не могут обеспечить развития трансмиссивного механизма эпизоотического процесса при чуме.

Волго-Уральский песчаный очаг (16). В 2010 г. возбудитель чумы не выделен. Последняя эпизоотия была зарегистрирована на российской территории очага в 2005 г. в Красноярском районе Астраханской области, на казахстанской – в 2007 г.

Численность основных носителей чумы – малых песчанок в 2010 г. была невысокой. Средняя плотность полуденной песчанки весной составила 1,3, гребенщиковой – 4,0 ос./га, что близко к средним многолетним величинам (1,1 и 4,5). Осенью ожидаемого увеличения численности не произошло: у полуденной песчанки она поднялась лишь до 3,2 ос./га (норма 4,5), гребенщиковой – до 5,0 ос./га (норма 7,7). Особенно сильно пострадали мышевидные грызуны: от весны к осени в зональных биотопах песков общая их численность возросла мало, составив соответственно 3,4 и 4,1 % попадания в давилки, что много ниже нормы. Очень низкой зарегистрирована численность домовый мыши в населенных пунктах – даже осенью она составила в среднем 2,0 %.

Численность блох малых песчанок – основных переносчиков чумы также оставалась на низком уровне. Весной число блох на 1 га составило 70 (норма 114), а к осени возросло до 201 экз./га. Показатели численности блох второстепенных носителей также были невысокими – ИО колебались от 0,1 до 0,2. При обследовании населенных пунктов на наличие блох насекомых не обнаружено.

При благоприятной перезимовке численность

песчанок и мышевидных грызунов к весне 2011 г., по-видимому, окажется ниже средней многолетней величины. Численность блох песчанок весной может приблизиться к норме. Учитывая эти обстоятельства, вряд ли можно ожидать развития эпизоотий в западной (российской) части очага, хотя нельзя исключить обнаружения единичных зараженных чумой животных.

Прикаспийский песчаный очаг (43). В 2010 г. регистрировались эпизоотии чумы в Приморском ландшафтном районе на территории Лаганского административного района Республики Калмыкия на площади 600 км². Было выделено 11 культур чумы в марте, апреле, июне и ноябре: 3 штамма – от блох *Nosopsyllus laeviceps* из шерсти полуденных и гребенщиковых песчанок, 5 – от блох *Ns. laeviceps* и *Xenopsylla conformis* из нор песчанок, 2 – от блох *Ns. mokrzeckyi*, снятых с домовой мыши и 1 культура – прямым посевом от домовой мыши.

Состояние численности носителей чумы в разных частях очага существенно различалось. В северной части в Волго-Кумском междуречье плотность малых песчанок (полуденной и гребенщиковой) весной составила 6,5 ос./га (норма 3,6), однако к осени снизилась до 4,0 ос./га (норма 4,5). Средняя плотность малого суслика была 4,0 ос./га (при норме 3,0 ос./га). Показатели весенней численности мышевидных грызунов также оказались выше осенних и составили соответственно 6,4 и 3,1 % попадания в давилки. Численность общественной полевки отмечается на очень низком уровне – 0,5 % попадания. Весной средняя численность домовой мыши в населенных пунктах составила 3,5 %, а к осени возросла незначительно – до 4,2 %.

В Терско-Кумском междуречье численность малых песчанок остается очень низкой: весной – 0,8 ос./га, осенью – 1,0 ос./га (норма 2,7), в то время как мышевидных грызунов – на уровне средней многолетней нормы: весной 2,3 % попадания (норма 2,4), осенью 5,1 % (норма 5,3). В песчаных массивах Кумо-Манычского междуречья осенняя численность песчанок составила 3,0 ос./га (норма 3,9). Численность мышевидных грызунов здесь весной оказалась низкой – 1,4 % попадания (норма 2,9), увеличившись к осени незначительно – до 3,9 % (норма 7,6). Некоторый подъем численности песчанок отмечался в Терских и Иргаклинских песках Ставропольского края, где к осени средний показатель возрос до 8,2 ос./га (норма 5,5). Численность малого суслика в Кизлярской, Ногайской и Кумо-Манычской степях остается на очень низком уровне – 0,4 ос./га (норма 1,7).

Сильно различались и показатели численности блох грызунов. Севернее р. Кумы в Ильменном и Приморском ландшафтных районах общее обилие блох малых песчанок составило 184 экз./га (при норме 227 и 246 соответственно), а на юге Черных земель – 630 экз./га (норма 295). Численность блох малого суслика несколько увеличилась, что особенно проявилось на Черных землях, где их общий запас составил 112 экз./га. Относительно низкими

оставались показатели численности блох мышевидных грызунов: ИО в шерсти весной составил 0,2, осенью – 0,5. В Кумо-Манычском междуречье на наличие блохи было обследовано 24 объекта в 6 населенных пунктах и собрано 39 блох 4 видов – *P. irritans*, *Ctenocephalides canis*, *Ct. felis* и *Ns. mokrzeckyi*. Важно отметить, что повсеместно продолжает увеличиваться численность блохи *X. conformis*, являющейся активным переносчиком чумы.

В 2011 г. к весне, даже при благоприятных условиях перезимовки, на всей территории очага ожидается снижение численности песчанок и мышевидных грызунов, а также их блох относительно многолетней нормы. Устойчивое проявление энзоотии чумы в Приморье, относительно высокие показатели численности носителей и переносчиков на Черных землях могут обусловить развитие эпизоотий этой инфекции в указанных ландшафтных районах.

Восточно-Кавказский высокогорный очаг (39). В 2010 г. в окрестностях селения Хосрех Кулинского района на субальпийских лугах в поселениях обыкновенной полевки от блох было выделено 3 штамма возбудителя чумы: 2 в июне от блох *Megabothris turbidus* и *Frontopsylla elata*, снятых со зверьков и 1 в августе от блохи *M. turbidus* из гнезда. Общая площадь эпизоотии оценивается в 100 км². Необходимо подчеркнуть, что на этом локальном участке возбудителя чумы выделяют с 2008 г.

Общее состояние популяции основного носителя – обыкновенной полевки можно оценить как удовлетворительное. В горной части очага ее средняя численность весной составила 3,6 ос./га (многолетняя норма 3,2 ос./га), а осенью – 14,4 ос./га (норма 11,9). В предгорной части осенние показатели численности этого вида оказались несколько меньше – 5,0 ос./га (норма 7,4). Численность других мышевидных грызунов в природных биотопах была низкой: даже осенью общий процент попадания составил 2,1 (норма 8,3). В целом по очагу регистрируется низкая численность синантропных грызунов: 0,3 % попадания.

Показатели численности блох остаются крайне низкими. В горной части очага весной обилие блох обыкновенной полевки составило 17,0 экз./га (норма 52,2), осенью – 68,0 (норма 231,0). В предгорной части осенью их средняя численность достигла 77,0 экз./га (норма 161).

При благоприятных условиях зимнего периода можно ожидать сохранения численности обыкновенной полевки на уровне средней многолетней величины, второстепенных носителей – значительно ниже нормы. Численность блох останется на очень низком уровне. Вместе с тем на локальных участках мозаичных поселений основного носителя, в частности на Кокмадагском участке стойкого проявления энзоотии чумы, можно ожидать выделения единичных культур возбудителя.

Алтайский горный очаг (36). В очаге сохранялась высокая эпизоотическая активность: эпизоотии регистрировались на 12 участках общей площадью 667 км². Всего за год была выделена 71 культура чум-

ного микроба, в том числе 6 от монгольской пищухи, 61 от ее блох, собранных со зверьков, а также из нор и гнезд, 3 от плоскочерепной полевки, 1 от джунгарского хомячка.

Численность основного носителя – монгольской пищухи на территории очага в последние годы стабилизировалась, и в 2010 г. чуть превышала многолетние показатели: весной она составила 5,6 жилых нор на гектар, осенью – 8,9 (норма 4,1 и 6,4 соответственно). Отмечено расширение ее ареала: этот вид впервые обнаружили в августе на юго-востоке очага (участок Калгуты). Численность даурской пищухи невелика: и весной, и осенью средний показатель оказался равным 1,2 нор/га (норма 0,7 и 1,5 соответственно). Численность алтайского сурка по-прежнему низкая – 0,5 жилых бутонов на га (норма 0,8). Та же тенденция прослеживается и в динамике численности длиннохвостого суслика, средняя плотность которого весной составила 2,7, осенью – 3,2 ос./га, что ниже многолетней нормы (3,2 и 5,5 соответственно). Состояние популяции плоскочерепной полевки достаточно удовлетворительное: средний процент ее попадания весной составил 13,8 (при норме 8,6), а осенью возрос до 37,4 (норма 22,5).

Численность блох пищух – основных переносчиков чумы в 2010 г. оказалась относительно высокой: весной составила 194 экз./га, а к осени возросла до 401 экз./га. На монгольской пищухе ИО составил 6,4 (норма 5,2), на даурской пищухе – 3,9 (норма 2,6). На плоскочерепной полевке и длиннохвостом суслике эти показатели находились на уровне чуть ниже среднеемноголетних значений: 1,8 и 1,2 (норма 1,9 для обоих видов).

К весне следует ожидать сохранения относительно высокой численности пищух и плоскочерепной полевки, а также их блох. Численность других второстепенных носителей и переносчиков останет-

ся на низком уровне, но при благоприятных условиях к осени может несколько возрасти до среднеемноголетних показателей. В этих условиях наиболее вероятно сохранение эпизоотической активности во всех частях очага.

Таким образом, учитывая состояние популяций основных носителей и переносчиков чумы в природных очагах России, можно предположить, что в 2011 г. существенных изменений в характере эпизоотических проявлений не произойдет. Численность малого, горного, длиннохвостого и даурского сусликов и их блох повсеместно находится на низком уровне, при котором нельзя ожидать развития экстенсивных эпизоотий. В удовлетворительном состоянии пребывают популяции монгольской пищухи и ее блох, что обусловит эпизоотическую активность Алтайского горного очага чумы. Высокая численность обыкновенной полевки в Восточно-Кавказском очаге, но низкая численность ее блох, по-видимому, смогут обеспечить лишь микроочаговые проявления чумы на участках стойкой энзоотии. В большинстве равнинных очагов чумы летняя засуха и жара подорвали численность песчанок, мышевидных грызунов, а также их эктопаразитов: весенний уровень численности, даже при благоприятных условиях зимовки, окажется в 2011 г. низким. Повсеместно относительно низкими ожидаются показатели численности популяций синантропных грызунов.

Результаты краткосрочного прогноза по чуме в природных очагах России приведены на рис. 2. В 2011 г. можно ожидать развитие локальных эпизоотий на территории Алтайского горного, Восточно-Кавказского высокогорного, Прикаспийского песчаного природных очагов. Маловероятны проявления эпизоотий чумы в Прикаспийском Северо-Западном, Волго-Уральском и Забайкальском степных, Дагестанском равнинно-предгорном, Тер-

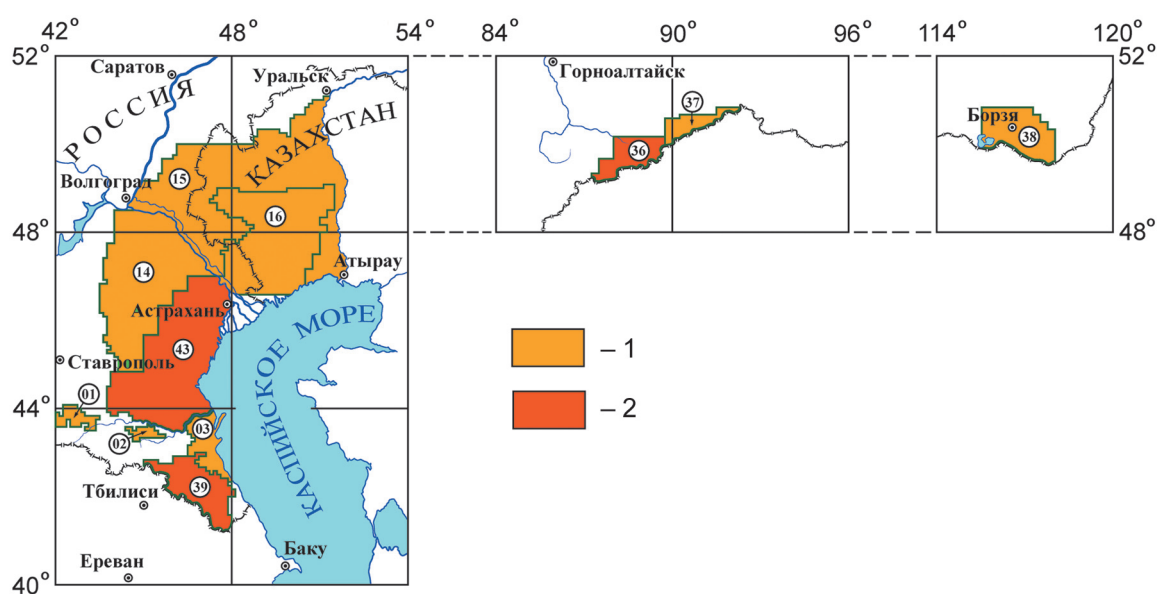


Рис. 2. Прогноз эпизоотической активности очагов чумы на территории Российской Федерации в 2011 г. Волго-Уральские степной (15) и песчаный (16) очаги показаны полностью, включая территории Казахстана:

1 – сохранение межэпизоотического периода; 2 – развитие локальных эпизоотий чумы

ско-Сунженском низкогорном, Волго-Уральском песчаном, Центрально-Кавказском высокогорном и Тувинском горном очагах, однако единичные находки зараженных чумой носителей и переносчиков возможны в двух последних.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базарова Г.Р. Постаквальная суша Аральского моря как потенциальный природный очаг чумы. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):18–21.
2. Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К., Танитовский В.А. Серая крыса в Западно-Казахстанской области. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2003; 1(7):92–5.
3. Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К., Танитовский В.А. и др. Активность нападения блох *Pulex irritans* на людей в различных биотопах жилья человека. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2004; 1(9):58–61.
4. Гражданов А.К. Современные факторы эпидемического потенциала в природных очагах чумы на западе Казахстана. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):16–8.
5. Кузнецов А.А., Осипов В.П., Синцов В.К. и др. Распространение и численность блохи *Xenopsylla conformis* Wagn., 1903 (Siphonaptera) в Прикаспийском песчаном очаге чумы. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):20–3.
6. Марамонович А.С., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И. и др. Чума в Китае. Опасность заноса в регионы Сибири и Дальнего Востока. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:95–9.
7. Марамонович А.С., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И. и др. Эпидемиологические закономерности чумы в Индии и обоснование мероприятий по санитарной охране территории Сибири и Дальнего Востока. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(98):15–20.
8. Мека-Меченко В.Г., Бурделов Л.А., Стогов Л.И., Агеев В.С. О расселении серой крысы на юго-востоке Казахстана. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2004; 1(9):61–6.
9. Никитин А.Я., Марамонович А.С., Косилко С.А. и др. Эпизоотологическая характеристика природных очагов чумы Монголии в связи с разработкой мер защиты от завоза и распространения инфекции на территории России. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):28–33.
10. Попков А.Ф., Вержущий Д.Б., Корзун В.М. и др. Итоги популяционно-экологических исследований природной очаговости чумы в Сибири. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):33–6.
11. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П. и др. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2010 г. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):24–9.
12. Топорков В.П., Величко Л.Н., Шиянова А.Е., Кедрова О.В. Динамика заболеваемости чумой в мире. Пробл. особо опасных инф. 2009; 3(97):22–5.

N.V.Popov, V.E.Bezsmertny, A.N.Matrosov, L.S.Nemchenko,
D.B.Verzhutsky, O.V.Maletskaia, A.I.Udovikov, A.A.Kuznetsov,
T.V.Knyazeva, L.D.Shilova, V.V.Gorshenko, V.P.Popov, V.P.Toporkov,
A.V.Toporkov, V.V.Kutyrev

Epizootic Activity of Plague Natural Foci in the Russian Federation in 2010 and Prognosis for 2011

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;
Plague Control Center of the Rosпотребнадзор, Moscow;
Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

The results of epizootiological surveillance in 11 plague natural foci in the territory of the Russian Federation in 2010 are presented in this review. The short-term prognosis of foci epizootic activity is performed based on the analysis of data on epizootic activity, the conditions of plague carrier and vector populations, and abiotic factors influence on their living conditions.

Key words: plague natural foci, carriers and vectors of plague, plague epizootics, prognosis of epizootic activity.

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

1. Bazarova G.R. [Postaquial Dry Land of the Aral Sea as Potential Natural Focus of Plague]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:18–21.
2. Bidashko F.G., Grazhdanov A.K., Tanitovskiy V.A. [Common Rat in West Kazakhstan Province]. Karantin. Zoonoz. Infek. Kazakhst. 2003; 1(7):92–5.
3. Bidashko F.G., Grazhdanov A.K., Tanitovskiy V.A. et al. [Rates of Fleas (*Pulex irritans*) Attacks on People in Different Biotores of Human Habitation]. Karantin. Zoonoz. Infek. Kazakhst. 2004; 1(9):58–61.
4. Grazhdanov A.K. [Contemporary Factors of Epidemic Potential in the Natural Plague Foci of Western Kazakhstan]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; 89:16–8.
5. Kuznetsov A.A., Ossipov V.P., Sintsov V.K., Knyazeva T.V., Matrosov A.N., Kim T.S., Sandzhiev V.B.-Kh. [Prevalence and Quantity of the Fleas *Xenopsylla conformis* Wagn., 1903 (Siphonaptera) in the Precaspian Sandy Plague Focus]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 94:20–3.
6. Maramovich A.S., Kosilko S.A., Innokent'eva T.I., Voronova G.A., Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Okunev L.P. [Plague in China. Threat of Transmission to Regions of Siberia and Far East]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 1:95–9.
7. Maramovich A.S., Kosilko S.A., Innokent'eva T.I., Voronova G.A., Nikitin A.Ya., Bazanova L.P., Okunev L.P. [Epidemiological Regularities of Plague in India and Substantiation of Measures on Sanitary Protection of Siberia and Far East Territories]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 98:15–20.
8. Meke-Mechenko V.G., Burdelov L.A., Stogov L.I., Ageev V.S. [On the Dispersal of a Common Rat in the South-East of Kazakhstan]. Karantin. Zoonoz. Infek. Kazakhst. 2004; 1(9):61–6.
9. Nikitin A.Ya., Maramovich A.S., Kosilko S.A., Innokent'eva T.I., Bazanova L.P., Balakhonov S.V., Voronova G.A., Okunev L.P. [Epizootiologic Characterization of Plague Natural Foci in Mongolia in Connection with Designation of Protection Measures from Import and Dissemination of the Infection into the Russian Territory]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 94:28–33.
10. Popkov A.F., Verzhutskiy D.B., Korzoon V.M., Innokent'eva T.I., Chipanin E.V., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Nikitin A.Ya., Okunev L.P., Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Logachev V.I., Mikhailov E.P., Feodorov S.V., Agapov V.A. [Summing-Up the Results of the Population and Ecological Investigations into Plague Natural Focality in Siberia]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 94:33–6.
11. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Ivanova S.M., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Kutyrev V.V. [Prognosis of Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Russian Federation for the Year of 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:24–9.
12. Toporkov V.P., Velichko L.N., Shiyanova A.E., Kedrova O.V. [The Tendency of Plague Morbidity Dynamics in the World]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:22–5.

Authors:

Popov N.V., Matrosov A.N., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Bezsmertny V.E., Gorshenko V.V., Popov V.P. Plague Control Center of Rosпотребнадзор. Pogodinskaya St., 10, B. 4, Moscow, 119121, Russia. E-mail: protivochym@nlm.ru

Nemchenko L.S., Verzhutskiy D.B. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissersa St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Maletskaia O.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Попов Н.В., Матросов А.Н., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Безсмертный В.Е., Горшенко В.В., Попов В.П. Противочумный центр. 119121, Москва, Погодинская ул., 10, с. 4. E-mail: protivochym@nlm.ru

Немченко Л.С., Вержущий Д.Б. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Малецкая О.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 20.01.11.

Е.В.Путинцева¹, А.В.Липницкий¹, В.В.Алексеев¹, В.П.Смелянский¹, В.А.Антонов¹, В.В.Мананков¹,
Н.И.Погасий¹, А.В.Злепко², А.Н.Чайка³, Т.П.Крючкова², С.Т.Савченко³, К.В.Жуков¹

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА В МИРЕ И РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2010 г.

¹ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»,

²Управление Роспотребнадзора по Волгоградской области, ³ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии
в Волгоградской области»

Представлены результаты эпидемиологического анализа заболеваемости лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) в мире и Российской Федерации в 2010 г. В 2010 г. имели место вспышки заболеваемости ЛЗН в Волгоградской, Ростовской и Воронежской областях. В Челябинской области, республиках Калмыкия, Татарстан, Краснодарском крае и Воронежской области ЛЗН выявлена впервые. При генотипировании волгоградских и ростовских изолятов РНК вируса определен II генотип. Анализ заболеваемости ЛЗН в Европе в 2010 г. установил схожесть генотипов вируса Западного Нила (ВЗН) на территории России и ряда стран Европы. По ретроспективным и оперативным данным установлено, что значительная часть территории РФ эндемична по ЛЗН. Отсутствие профилактических мероприятий по ЛЗН на большей части территории РФ (подготовка населения, медицинских работников, средств диагностики, тактик лечения и др.) может привести к значительным социальным и экономическим потерям при массовых проявлениях инфекции. Прогнозирование и оценка влияния будущих изменений окружающей среды на заболеваемость населения ЛЗН на территории России, в условиях общей тенденции потепления климата, требует изучения всех факторов механизма «вирус–переносчик–человек», начиная от молекулярного до популяционного уровней, силами как научных, так и практических учреждений Роспотребнадзора.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, эпидемическая ситуация, заболеваемость населения, мониторинг возбудителя.

В настоящее время глобальная эпидемиология лихорадки Западного Нила (ЛЗН) определяется некоторыми особенностями: энзоотическая передача вируса в цикле «птица–комар–птица» без значительной заболеваемости людей наблюдается в странах Африки, Центральной Америки, Карибского бассейна. Периодические вспышки среди людей и лошадей при низком уровне заболеваемости между вспышками происходят в странах Средиземноморья, Южной Африки, некоторых странах Европы и России. Отсутствие заболеваемости людей при небольшом уровне энзоотической активности характерно для стран Юго-Восточной Азии, Индии, Австралии. Повторяющиеся ежегодно (начиная с 1999 г.) вспышки ЛЗН характерны для Северной Америки. В течение почти 60 лет после первого выделения вируса из крови лихорадящей женщины в провинции Западный Нил в Уганде в 1937 г. [2] ЛЗН оставалась редкой причиной преимущественно легких заболеваний людей в Африке, на Ближнем Востоке, некоторых странах Европы и СССР. Однако в середине 1990-х годов крупные вспышки болезни с поражениями мозга в виде менингитов и менингоэнцефалитов произошли в Алжире (1994 и 1997 гг.), Румынии (1996 г.), Тунисе (1997 г.), России (1999 г.), США (1999 г.), Израиле (2000 г.), Судане (2002 г.) [3, 6, 8, 10, 11]. После выявления вируса в Нью-Йорке в 1999 г. [4] он быстро распространился по Американскому континенту, достигнув в 2006 г. Аргентины [5].

На евроазиатском континенте ареал распространения вируса охватывает европейскую часть России, часть Западной Сибири и Юго-Восточной

Азии. В последние 20 лет заболеваемость ЛЗН отмечена в большинстве стран СНГ и южных регионах бывшего СССР (Армения, Туркмения, Таджикистан, Азербайджан, Казахстан, Молдавия, Украина, Белоруссия и т. д.)

В 2010 г. в Европе отмечены крупные вспышки ЛЗН в Греции, где зарегистрирован 261 случай (32 – закончились летально) и в Румынии – 41 (4 – летальных). Случаи заболевания населения ЛЗН отмечены в Португалии, Италии, Венгрии, Румынии, а также на территории Ближнего Востока – в Израиле [13, 14]. В США зарегистрировано 974 случая, 33 – с летальным исходом. В целом на американском континенте в последние 3 года наблюдается снижение заболеваемости, особенно выраженное в Канаде. Если в 2007 г. в этой стране отмечено 2215 случаев ЛЗН, то в 2010 г. только 5.

Эпидемиологическая характеристика вспышки на севере Греции, которая явилась самой крупной в Европе после эпидемии в Румынии 1996–1997 гг., является типичной. Большинство нейроинвазивных форм болезни отмечалось у пожилых людей, с летальностью около 10 %. В отношении географического нахождения, наличия птиц (перелетных и резидентных) и переносчиков регион Центральной Македонии имеет все необходимые экологические компоненты для успешной передачи вируса людям [12, 13, 14]. Большинство случаев зарегистрировано вблизи двух рек, хотя имелись и заболевания городского населения. Текущая информация относительно циркуляции вируса в популяции птиц и лошадей в этом районе ограничена, однако серологические ис-

следования, проведенные в 1970-е годы, показали наличие вируса у людей и животных. В августе 2010 г. в пуле комаров *Culex*, собранных вблизи места, где был подтвержден случай заболевания ЛЗН, выявлен ВЗН линии (генотип) 2 [13, 14].

С июля по октябрь 2010 г. в России были зарегистрированы вспышки ЛЗН в Волгоградской (413 случаев, 5 – с летальным исходом), Ростовской (59 случаев, 1 – с летальным исходом) и Воронежской (27 случаев) областях. В этот же период в Астраханской области было зарегистрировано 12 случаев ЛЗН, в Краснодарском крае – 5, а также по 1 случаю заболевания в Челябинской области, Республике Калмыкия, завозные случаи в Республику Татарстан (1 из Иркутской области) и 4 в Москву (из Индии – 1, Украины – 1, Волгоградской области – 1 и Ростовской области – 1).

Вспышка ЛЗН 2010 г. в Волгоградской области превысила показатели вспышки 1999 г. (380 больных, 38 из которых скончались) и является самой крупной вспышкой ЛЗН в России. Многочисленная вспышка была отмечена в Астраханской области (95 человек) в 1999 г. и в последующие годы (2001, 2005 гг.) в области регистрировалась повышенная заболеваемость (от 49 случаев в 2001 г. до 73 в 2005 г.). В Волгоградской области повышенная заболеваемость ЛЗН отмечена в 2007 г. (63 заболевших). За период с 1997 по 2010 год в Российской Федерации заболело 1500 человек, из них 940 в Волгоградской области (62,6 %) и 380 (25,3 %) в Астраханской.

Одной из причин вспышки ЛЗН на территории России в 2010 г. явилась необычно высокая температура воздуха в июле–августе 2010 г., которая благоприятно повлияла на условия взаимодействия вируса ЗН с переносчиками. По данным метеонаблюдений, с 1999 по 2010 год в Волгоградской области среднемесячные температуры в июле и августе 2010 г. были самыми высокими за этот период.

Проявления ЛЗН 2010 г. в России имели сезонный характер, зависящий от активности переносчиков и частоты пребывания населения на природе. Первый случай заболевания был зарегистрирован 16 июля в Волгоградской области. Пик заболеваемости на территории России пришелся на август – сентябрь (95 % заболевших, по данным статистической формы отчетности МЗ № 2), в т.ч. август – 52 %, сентябрь – 43 %).

В 2010 г., как и в предыдущие годы, регистрировалась заболеваемость преимущественно городского населения, которое составило 81 % в общей доле заболевших (в Волгоградской области – 85 %, в Ростовской – 83 %, в Краснодарском крае – 80 %, в Воронежской – 18 %, в Челябинской области, республиках Калмыкия и Татарстан ЛЗН была диагностирована у жителей городов).

Среди заболевших ЛЗН 57 % составили мужчины, 43 % – женщины, в том числе дети до 14 лет (2 %).

По данным эпидемиологических исследований, 56 % заболевших ЛЗН в России в 2010 г. связывают

свое заболевание с укусом комаров вне города (на дачных участках – 42 %, в местах отдыха на природе – 14 %). Несмотря на очевидный более высокий и постоянный контакт с переносчиками ЛЗН сельских жителей, выявляемость заболевания среди них ниже. Вероятно, это можно объяснить их «проэпидемичиванием» в молодом возрасте и в результате этого более легким течением инфекции, а также более низкой обращаемостью сельского населения за медицинской помощью. 23 % заболевших связывают заболевание с укусом комаров по месту проживания в городах.

Как и во всем мире, в России отмечается преимущественная заболеваемость ЛЗН людей пожилого возраста. В 2010 г. заболевшие в возрасте 50 лет и старше составили 56,6 %, в т.ч. более 60 лет – 30,6 %, 30–39 и 40–49 лет – 32,6 % (16 и 16,6 % соответственно), что несколько выше, чем в период вспышки 1999 г., когда заболевших было больше в возрастной группе 20–39 лет. В Воронежской области выявлена другая тенденция, где общее количество заболевших в возрастных группах до 50 лет составило 74 %, а наибольшее количество больных отмечено в группе 30–39 лет (9 из 27–33 %). Вероятно, при образовании нового природного очага ЛЗН популяционный иммунитет населения активного возраста находится на низком уровне. В Республиках Калмыкия, Татарстан и Челябинской области все заболевшие были в возрасте 30–39 лет.

Анализ клинических проявлений ЛЗН у 523 заболевших в РФ показал, что тяжелые (менингеальные) формы составили 0,1 %, летальность – 1,1 %, что значительно ниже, чем при вспышке 1999 г. Летальность среди заболевших в Волгоградской области в 1999 г. была 10 %, а удельный вес тяжелых форм составлял 25 %, в сезон 2010 г. – 0,1 и 0,5 % соответственно. Постоянная работа по мониторингованию возбудителя, подготовке населения и медицинских кадров, своевременная диагностика заболевания в Волгоградской области позволили в сезон вспышечной заболеваемости 2010 г. значительно снизить ущерб, нанесенный инфекцией населению.

На территории Астраханской области (самого «старого» очага ЛЗН на территории России) все зарегистрированные заболевания имели среднетяжелое клиническое течение и в 97 % случаев без поражения центральной нервной системы. Следует отметить отсутствие на территории регистрации легких форм заболевания, с которыми население, по-видимому, не обращается за медицинской помощью.

В Москве, где имели место завозные случаи ЛЗН, тяжелые формы заболевания с поражением центральной нервной системы составляли 40 %.

На территориях, где ЛЗН регистрировалась впервые, тяжелые формы заболевания составляли от 12 до 40 %.

Среди заболевших в России в сезон 2010 г. преобладали (72 %) среднетяжелые клинические формы (в Астраханской области они составили 100 %, в Воронежской – 77 %, Волгоградской – 58,5 %, в

Ростовской – 50 %).

Следует отметить значение мониторингирования ЛЗН и выявление ее в группах больных, имеющих схожие с ЛЗН клинические проявления, в первую очередь в группах больных с неясной лихорадкой, этиологически неустановленных менингитов, менингоэнцефалитов, тяжелых форм «респираторных» инфекций. В 2010 г. эта работа как «системная» проводилась лишь в Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Ростовской областях и Краснодарском крае. При единичных обследованиях больных в этих группах выявлены антитела к ВЗН у больных из Челябинской, Саратовской, Курской, Ленинградской областей, республик Татарстан и Калмыкия (по данным исследований сывороток крови, присланных в Референс-центр и исследованиям территориальных инфекционных больниц). Этот факт позволяет говорить об отсутствии системы выявления больных ЛЗН на территории России и неподготовленности медицинских кадров и населения к ее массовому появлению, что может привести к значительным социальным последствиям.

В исследовании, проведенном в ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, вирусная РНК ВЗН была обнаружена в аутопсийном материале от трех умерших, а также в 10 сыворотках крови из Волгоградской области и 11 сыворотках крови от больных в Ростовской области. При генотипировании изолятов РНК вируса определен II генотип, уже определявшийся на этих территориях (в Ростовской области в 2004 г., в Волгоградской в 2007 г.) Это подтверждает наличие природных очагов ЛЗН на этих территориях, не связанных с перелетными птицами, II генотип ВЗН обнаруживался на американском континенте, Ближнем Востоке (Израиль) и в Европе (Украина, Республика Беларусь, в 2010 г. в Греции [4]).

Установлено, что клинически выраженные заболевания ЛЗН составляют менее 1 % от общего числа инфицированных вирусом, поэтому истинные цифры инфицированных ВЗН в России неизвестны.

Изучение иммунитета населения к ЛЗН проводилось по заданию Управлений Роспотребнадзора в 2009 г. на 4 территориях, а в 2010 г. – на 8. Антитела к вирусу ЗН найдены у населения (в группах доноров и животноводов) Волгоградской (12 %), Ростовской (9 %), Курской (2 %) областей, Ставропольского (6 %) и Краснодарского (9 %) краев, республик Калмыкия (9 %), Адыгея (1 %), Татарстан (1 %).

По данным ретроспективного эпиданализа, положительные результаты (IgG-антитела) получены при обследовании различных групп населения в прошлые годы на территории РФ, где до 2010 г. заболеваемость людей (по данным официальной статистики) не зарегистрирована. К ним относятся Саратовская, Воронежская, Калининградская, Новосибирская, Иркутская, Томская области, Ставропольский, Краснодарский, Приморский, Красноярский, Алтайский края, Республики Адыгея, Татарстан, территории Западной и Восточной Сибири.

В 2010 г. исследования по изучению объектов внешней среды проводились в 16 областях РФ. Маркеры ЛЗН найдены в комарах (Волгоградская, Ростовская области), клещах (Ростовская область, республики Хакасия, Адыгея и Ставропольский край), грызунах и других мелких млекопитающих (Воронежская область и Ставропольский край), птицах (Ставропольский край). Сведения о циркуляции ВЗН в природе, свидетельствующие об эпидемических проявлениях инфекции, установлены (по данным ретроспективного эпиданализа) на 19 территориях РФ.

В 2010 г. все зарегистрированные в России случаи заболеваний ЛЗН подтверждены наличием иммуноглобулинов класса М (IgM), выявленных методом ИФА. Исследования проводились вирусологическими лабораториями ФГУЗ Центров гигиены и эпидемиологии в Астраханской, Волгоградской, Ростовской, Воронежской областях, а также в Республиканской клинической инфекционной больнице в Казани, Клинической инфекционной больнице Краснодарского края, Причерноморской, Северо-Западной противочумными станциями, ФГУЗ ЦНИИ вирусологии им. Ивановского, ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Референс-центром ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ. Дополнительным методом диагностики служила ПЦР с обратной транскрипцией. Реальным методом подтверждения ЛЗН с одновременной характеристикой генотипа вируса являлось секвенирование участков генома путем исследования биологического материала (сыворотки крови, мозг умерших) без выделения вируса, проводившееся ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФГУН ЦНИИ эпидемиологии и ФГУЗ ЦНИИ вирусологии.

Выводы и прогноз

1. В 2010 г. имели место вспышки заболеваемости ЛЗН в Волгоградской, Ростовской и Воронежской областях. В Челябинской области, республиках Калмыкия, Татарстан, Краснодарском крае и Воронежской области ЛЗН выявлена впервые.

2. При генотипировании волгоградских и ростовских изолятов РНК вируса определен II генотип ВЗН, ранее определявшийся на этих территориях. Анализ заболеваемости ЛЗН в Европе в 2010 г. установил схожесть генотипов ВЗН на территории России и ряда стран Европы.

3. Циркуляция более 5 лет II генотипа ВЗН на территории Волгоградской и Ростовской областей свидетельствует о наличии природных очагов ЛЗН, не связанных с перелетными птицами.

4. На большинстве территорий России, в том числе с установленной циркуляцией вируса в объектах внешней среды, до настоящего времени не налажена система выявления ЛЗН у больных, имеющих сходную с ЛЗН клиническую симптоматику.

5. Отсутствие профилактических мероприятий по ЛЗН во многих регионах России (подготовки населения, медицинских работников, средств диагностики, тактик лечения и др.) может привести к значи-

тельным социальным и экономическим потерям при массовых проявлениях инфекции.

6. По ретроспективным и оперативным данным установлено, что значительная часть территории Российской Федерации эндемична по лихорадке Западного Нила, поэтому организация работ по изучению эндемичности территорий и мониторингов возбудителя ЛЗН должна включаться в годовые планы работ Управлений Роспотребнадзора субъектов РФ.

7. На территориях сформировавшихся природных очагов ЛЗН в Российской Федерации в эпидемический сезон целесообразно введение обязательного исследования на ВЗН доноров крови и органов для пересадки.

8. На территориях России, где установлена циркуляция вируса ЛЗН в природе, возможна вспышечная заболеваемость. Использование лабораторных методов диагностики лихорадки Западного Нила при расшифровке этиологии тяжелых форм ОРВИ, менингитов и других заболеваний, имеющих схожую с ЛЗН клиническую симптоматику, приведет к статистической регистрации инфекции на этих территориях.

Общее потепление в мире приводит к изменению климата и в России, что влияет на жизненные циклы переносчиков и взаимодействие их с вирусом [1, 7, 15]. Прогнозирование и оценка влияния будущих изменений окружающей среды на заболеваемость населения ЛЗН на территории России требует установления всех факторов этого механизма, начиная от молекулярного до популяционного уровней, силами как научных, так и практических учреждений Роспотребнадзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платонов А.Е. Влияние погодных условий на эпидемиологию трансмиссивных инфекций (на примере лихорадки Западного Нила в России). Вест. Рос. акад. мед. наук. 2006; 2:25–9.
2. Smithburn K., Hughes T., Burke A., Paul J. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1940; 20:470–92.
3. Mackenzie J., Gubler D., Petersen L. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nat. Med. 2004; 10:S98–109.
4. Nash D., Mostashari F., Fine A., Miller J., O'Leary D., Murray K. et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. N. Engl. J. Med. 2001; 344:1807–14.
5. Morales M., Barrandeguy M., Fabbri C., Gareia Y., Vissani A., Trono K. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12:1559–61.
6. Tsai T., Popovici F., Cernescu C., Campbell G., Nedelcu N. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. Lancet. 1998; 352:767–71.
7. Tabachnick W. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epizootics in a changing world. J. Exp. Biol. 2010; 213:946–54.
8. Feki J., Marrakchi C., BenHmida., Belahsen F., Ben Jemaa M., Maaloul J. et al. Epidemic West Nile virus encephalitis in Tunisia. Neuroepidemiology. 2005; 24:1–7.
9. Platonov A., Shipulin G., Shipulina O., Tyutyunnik E., Frolochkina T., Lanciotti R. et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:128–32.
10. Green M., Weinberger M., Ben-Ezer J., Bin H., Mendelson E., Gandacu D. et al. Long-term death rates, West Nile virus epidemic, Israel, 2000. Emerg. Infect. Dis. 2005; 11:1754–7.

11. Depoortere E., Kavlé J., Keus K., Zeller H., Marri S., Legros D. Outbreak of West Nile virus causing severe neurological involvement in children Nuba Mountain, Sudan, 2002. Trop. Med. Inf. Health. 2004; 9:730–6.

12. Papapanagiotou J., Kyriazopoulou V., Antoniadis A., Batikova M., Gresikova M., Sekeyova M. Haemagglutination-inhibiting antibodies to arboviruses in a human population in Greece. Zentralbl. bacterial Orig. A. 1974; 228: 443–6.

13. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, July–August, 2010. ECDC threat assessment.

14. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, July–August, 2010. European Centre Disease Prevention and Control, Stockholm; 2010.

15. Weaver S., Reisen W. Present and future arboviral threats. Antiviral Res. 2010; 85:328–45.

E.V.Putintseva, A.V.Lipnitsky, V.V.Alekseev, V.P.Smelyansky, V.A.Antonov,
V.V.Manankov, N.I.Pogasiy, A.V.Zlepko, A.N.Chaika, T.P.Kryuchkova,
S.T.Savchenko, K.V.Zhukov

Dissemination of the West Nile Fever in the Russian Federation and in the World in 2010

Volgograd Research Anti-Plague Institute;
Rosпотребнадзор Administration of the Volgograd Region;
Center of Hygiene and Epidemiology in the Volgograd Region

Presented are the results of epidemiological analysis of the West Nile fever morbidity in the Russian Federation and all over the world in 2010. In 2010 West Nile fever outbreaks took place in Volgograd, Rostov and Voronezh Regions. For the first time West Nile fever was detected in Chelyabinsk Region, Kalmyk Republic, the Republic of Tatarstan, the Krasnodar Territory and the Voronezh Region. The IInd genotype was determined in the process of genotyping of Volgograd and Rostov virus isolates. Analysis of West Nile fever morbidity in Europe in 2010 revealed that the genotypes of West Nile virus in the territory of Russia and in a number of European countries were similar. According to the retrospective and operative data it is determined that West Nile fever is endemic in the significant part of the territory of the Russian Federation. The absence of West Nile fever prophylaxis in the most part of the territory of the Russian Federation (training of the population, medical workers, preparation of the diagnostic means, working out of the treatment tactics and etc.) can lead to the significant social and economic losses in case of massive manifestations of this infection. Forecasting and assessment of the impact of future environment changes upon West Nile fever morbidity in the territory of the Russian Federation in the conditions of general trend of climate warming require studying of all the factors of "virus-vector-person" mechanism from the molecular to the population level by efforts of scientific and practical institutions of the Rosпотребнадзор.

Key words: West Nile fever, epidemic situation, morbidity of the population, etiological agent monitoring.

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

1. Platonov A.E. [The Influence of Weather Conditions on the Epidemiology of Vector-Borne Diseases by the Example of West Nile Fever in Russia]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2006; 2:25–9.

Authors:

Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V., Smelyansky V.P., Antonov V.A., Manankov V.V., Pogasiy N.I., Zhukov K.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Zlepko A.V., Kryuchkova T.P. Rosпотребнадзор Administration of the Volgograd Region. Volgograd, Russia.

Chaika A.N., Savchenko S.T. Center of Hygiene and Epidemiology in the Volgograd Region. Volgograd, Russia.

Об авторах:

Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Мананков В.В., Погасий Н.И., Жуков К.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Злепко А.В., Крючкова Т.П. Управление Роспотребнадзора по Волгоградской области. Волгоград.

Чайка А.Н., Савченко С.Т. Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области. Волгоград.

Поступила 18.01.11.

УДК 616.981.51: 616–036.2 (471)

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

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ В 2010 г., ПРОГНОЗ НА 2011 г.

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Проведен анализ эпидемиологической ситуации по сибирской язве в Российской Федерации и в мире в 2010 г., представлен прогноз заболеваемости на 2011 г.

Ключевые слова: сибирская язва, возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*.

Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Российской Федерации продолжает оставаться нестабильной, а заболеваемость не имеет тенденции к снижению. По данным Информационно-аналитического центра Россельхознадзора, в Российской Федерации за 9 месяцев 2010 г. резко ухудшилась эпизоотическая обстановка по сибирской язве. В третьем квартале 2010 г. было зарегистрировано 8 новых очагов заболевания [2]. Неблагоприятная тенденция роста случаев зоонозных инфекций делает эту проблему актуальной как для структур Роспотребнадзора и здравоохранения, так и ветеринарного надзора.

В 2010 г. в период с июня по сентябрь (октябрь) на территории РФ зарегистрировано 22 случая заболевания людей сибирской язвой. На субъекты юга РФ пришлось 72,73 % (16 случаев): 11 случаев заболевания (50 %) выявлено в Северо-Кавказском федеральном округе (Республика Дагестан – 8, Чеченская Республика – 3), 5 случаев (22,73 %) в Южном федеральном округе (Волгоградская область – 2, Краснодарский край – 2, Ростовская область – 1); 27,27 % (6 случаев) зарегистрировано в Сибирском федеральном округе (Омская область).

Первая групповая вспышка сибирской язвы 2010 г. произошла в июне, в с. Гимры Унцукульского района Республики Дагестан, в ходе которой заболело 6 человек, из них 3 детей до 14 лет. Заражение произошло на кутане «Бузна» при проведении вынужденного убоя невакцинированной против сибирской язвы коровы и разделке мяса, из которого впоследствии выделен возбудитель сибирской язвы. Окончательный диагноз «Сибирская язва, кожная форма» с течением средней степени тяжести у 2 заболевших и легким течением у 4 пациентов был поставлен на основании эпидемиологических, клинических данных и результатов лабораторных исследований (обнаружения ДНК генов токсин- и капсулообразования *B. anthracis* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в материале из струппов и/или содержимого язвы у 5 больных (от одного из заболевших такой материал для исследования не предоставлялся), а также определения диагностического титра противосибирезявенных анти-

тел непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА) в сыворотке крови 6 больных). Исходом болезни всех пациентов стало выздоровление.

В июле 2010 г. кожной формой сибирской язвы с течением средней степени тяжести заболел житель с. Хлебодарное Целинского района Ростовской области. Причиной болезни стал несанкционированный убой и разделка туши невакцинированной против сибирской язвы свиньи. Из мяса была выделена культура возбудителя сибирской язвы. Окончательный диагноз был поставлен на основании эпидемиологического анамнеза, клиники и данных лабораторных исследований – выявления ДНК *B. anthracis* в струпе язвы больного. Заболевший выздоровел.

В Тюкалинском районе Омской области в июле 2010 г. зарегистрирована вспышка сибирской язвы, в ходе которой заболело 6 человек. Групповая заболеваемость связана с содержанием и убоем лошадей в одном из личных хозяйств в деревне Бурановка. Заболевание характеризовалось тяжелым и среднетяжелым течением, у одного больного осложнилось сибирезявленным сепсисом и закончилось летальным исходом. Остальные пациенты, благодаря своевременно назначенной адекватной терапии, выздоровели. Диагноз был установлен на основании эпидемиологических данных (участие в вынужденном убое лошадей, из патологического материала которых выделен возбудитель сибирской язвы), клиники и данных лабораторных исследований (обнаружение ДНК возбудителя сибирской язвы в смывах с карбункулов, выделение культуры *B. anthracis* из крови впоследствии скончавшегося больного). В ходе проведенного эпидемиологического расследования выявлено, что условиями, способствующими возникновению данной ситуации, послужили грубые нарушения требований ветеринарно-санитарных правил: неполный документальный учет поголовья животных и его охват вакцинацией против сибирской язвы; отсутствие осмотра животных перед убоем и контроля/регистрации падежа, грубые нарушения правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов (еще в начале июня 2010 г. в том же личном хозяйстве, а также в деревне Бекишево произошло несколько случаев падежа

лошадей, трупы которых, не подвергаясь ветеринарному освидетельствованию, были оставлены на пастбищах); допуск к убою лиц без вакцинации против сибирской язвы, спецодежды, средств индивидуальной защиты и инструктажа о мерах личной профилактики. Дальнейшее расследование показало, что мясо 10 туш вынужденно забитых лошадей из этого эпизоотического очага поступило на одно из мясоперерабатывающих предприятий Омска, где были изготовлены мясные полуфабрикаты. В ходе лабораторных исследований из продукции предприятия было выделено три штамма возбудителя сибирской язвы, а проведенное генотипирование ДНК *B. anthracis* выявило единое происхождение этих штаммов и культуры, изолированной из крови умершего больного. Главным государственным санитарным врачом по Омской области вынесено постановление об изъятии из оборота и уничтожении продукции данного предприятия, изготовленной в период с 13.07. по 06.08.2010 г. Арбитражный суд Омской области признал законными действия Управления Роспотребнадзора по Омской области и вынес решение об уничтожении более чем 160 тонн опасных мясных полуфабрикатов.

Группа жителей х. Новодербеновский Суровикинского района Волгоградской области в августе 2010 г. провела вынужденный забой незарегистрированного и невакцинированного против сибирской язвы бычка в личном подсобном хозяйстве, в результате которого 2 участника убоя заболели кожной формой сибирской язвы с легким течением. Диагноз подтвержден данными эпидемиологического анамнеза (участие в вынужденном убое КРС, из мяса которого выделена культура *B. anthracis*), соответствующей клинической картиной и результатами бактериологического исследования – выделением возбудителя сибирской язвы из клинического материала. Исходом заболевания стало выздоровление.

В с. Куяда Гунибского района Республики Дагестан в августе 2010 г. после вынужденного забоя и разделки мяса больного барана на хуторе «Хацинуб» заболели два участника убоя. Окончательный диагноз: «Сибирская язва, кожная форма, легкое течение» поставлен на основании эпидемиологических данных (участие в вынужденном убое МРС с последующим выделением из мяса возбудителя сибирской язвы) и клинической картины. Исход заболевания – выздоровление.

В августе 2010 г. в результате контакта с мясом КРС в цехе по производству колбасных изделий в с. Алхан-юрт Урусмартановского района Чеченской Республики заболели три работницы кожной формой сибирской язвы, в том числе одна беременная (срок беременности – 24 недели на момент инфицирования). При проведении эпидемиологического расследования специалистами Управления Роспотребнадзора по Чеченской Республике установлено, что коровы были вакцинированы против сибирской язвы в ноябре 2009 г. Окончательный диагноз поставлен по резуль-

татам эпидемиологических, клинических и лабораторных исследований (обнаружение ДНК *B. anthracis* в стружьях больных методом ПЦР, определение непрямым МФА противосибиреязвенных антител в диагностических титрах в сыворотке крови больных; обнаружение ДНК возбудителя сибирской язвы методом ПЦР и бактериоскопическое выявление морфологически сходных с *B. anthracis* клеток в пробе мяса). Исходом заболевания стало выздоровление. Беременность заболевшей завершилась рождением доношенного плода.

В сентябре 2010 г. зарегистрированы 2 случая заболевания сибирской язвой у животноводов, принимавших участие в забое больного КРС на МТФ № 2 ООО «Успенский Агропромсоюз» в станице Успенская Белоглинского района Краснодарского края. По данным Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, животные были провакцинированы против сибирской язвы в январе 2010 г. На основании эпидемиологических и клинических данных был поставлен окончательный диагноз: «Сибирская язва, кожная форма, течение средней степени тяжести». Исход болезни – выздоровление.

В 2010 г. заболевания людей сибирской язвой были зарегистрированы также в некоторых странах ближнего зарубежья: в Грузии (22 случая, из них 1 летальный), Казахстане (7 случаев, из которых 2 летальных), Кыргызстане (23 случая). Все заболевания людей связаны с участием в убое и разделке туш больных сибирской язвой животных.

Случаи сибирской язвы среди людей выявлялись и в странах дальнего зарубежья. Массовые заболевания наблюдались в Великобритании и Бангладеш. В период с декабря 2009 по июль 2010 г. в Великобритании зарегистрировано 47 случаев так называемой инъекционной формы сибирской язвы среди наркоманов, употреблявших внутривенно героин, контаминированный спорами возбудителя сибирской язвы, заболевание у 16 из них закончилось летальным исходом. По меньшей мере, 2 подобных случая отмечены в Германии. Проведенное генетическое типирование штаммов, выделенных от больных, выявило идентичность их генотипов, что свидетельствует об общности их происхождения: штаммы отнесены к Закавказской ветви возбудителя сибирской язвы и были наиболее близки к так называемым «индустриальным» штаммам, выделенным на Ближнем и Среднем Востоке [3].

Масштабная групповая вспышка зарегистрирована в Бангладеш, где в период с августа по октябрь 2010 г. кожной формой сибирской язвы заболело 607 человек. Это самая крупная в истории страны вспышка заболевания связана с бесконтрольным массовым забоем больных животных (104 головы КРС) и продажей/раздачей мяса местным жителям [4]. Тот факт, что в данной вспышке не было зарегистрировано случаев заболевания кишечной формой сибирской язвы можно объяснить тем, что в условиях тропического климата и низкого уровня жизни

единственным способом сохранения мяса является его немедленная термическая обработка. В этом случае споры возбудителя сибирской язвы еще не успевают сформироваться, а вегетативная форма сибиреязвенного микроба является чувствительной к воздействию высокой температуры.

Таким образом, причинами заболевания людей сибирской язвой в РФ и приграничных государствах в 2010 г. остается контакт с заболевшими животными в процессе ухода, вынужденного убоя без ветеринарного освидетельствования, разделки туш. К условиям, способствующим возникновению случаев заболевания среди людей, следует отнести несоблюдение санитарно-эпидемиологических требований (отсутствие вакцинации против сибирской язвы и необеспеченность средствами индивидуальной защиты лиц, профессионально занятых в животноводстве). Заболеванию сибирской язвой сельскохозяйственных животных в 2010 г., помимо наличия почвенных очагов инфекции, неполного учета и охвата вакцинацией поголовья, нарушения утилизации биологических отходов, содействовала высокая температура воздуха и засуха в летний период.

Следует подчеркнуть высокую диагностическую ценность ПЦР в лабораторной диагностике сибирской язвы, в том числе при подтверждении кожной формы заболевания, когда выделение культуры, особенно на фоне антибиотикотерапии, зачастую не представляется возможным, а также значимость генетического типирования штаммов при проведении эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы.

Результаты многолетнего анализа заболеваемости сибирской язвой позволяют прогнозировать сохранение заболеваемости людей в 2011 г. на среднем для последнего десятилетия уровне (от 1 до 24 случаев, в среднем 10 случаев в год) преимущественно в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах. Не исключен завоз животных, продуктов и сырья животноводства из зарубежных стран, в первую очередь из граничащих с РФ государств (Казахстана, Кыргызстана, Грузии др.). Продолжает оставаться потенциальная угроза заражения сибирской язвой героиновых наркоманов.

Основным условием снижения напряженности ситуации по сибирской язве является соблюдение ветеринарно-санитарных и медико-санитарных требований. Комплекс ветеринарно-санитарных мероприятий включает полный учет и вакцинацию против сибирской язвы поголовья восприимчивых сельскохозяйственных животных вне зависимости от формы собственности, учет и контроль санитарного состояния сибиреязвенных скотомогильников, недопущение выпаса скота на территориях вблизи необустроенных скотомогильников, проведение

работ по дезинфекции почвы в местах убоя и разделки туш, утилизации биологических отходов. Необходим контроль наличия сопроводительных документов, свидетельствующих о вакцинации скота при его завозе на территорию РФ, а также проведение ветеринарной экспертизы продуктов и сырья животноводства, поступающих из стран, неблагополучных по сибирской язве.

В 2010 г. введены в действие новые Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.7.2629-10 «Профилактика сибирской язвы» [1], которыми установлены основные требования к комплексу организационных, санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения заболевания сибирской язвой среди людей. Первостепенное значение в предупреждении заболевания сибирской язвой людей имеет запрет на проведение вынужденного убоя, разделки туш заболевших животных без предварительного ветеринарного освидетельствования, употребление в пищу блюд из инфицированного мяса, реализацию продуктов и сырья от павших и вынужденно убитых животных без лабораторного заключения об их безопасности. Важен полный охват вакцинацией декретированного контингента, обеспечение работников спецодеждой и средствами индивидуальной защиты, проведение санитарно-просветительной работы с населением неблагополучных по сибирской язве пунктов о мерах общественной и личной профилактики сибирской язвы. Недопустимо бесконтрольное проведение строительных и других работ, связанных с выемкой и перемещением грунта, в санитарно-защитной зоне сибиреязвенных скотомогильников.

Достижению оптимального конечного результата в вопросе стабилизации ситуации по сибирской язве в РФ может способствовать разработка стандартизированного подхода к порядку межведомственного взаимодействия структур Россельхознадзора и Роспотребнадзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика сибирской язвы» СП 3.1.7.2629-10. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2010.
2. Эпизоотическая ситуация в РФ (9 месяцев 2010 года). http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2010/files/russia_2010.pdf (дата обращения 25.12.2010).
3. Anthrax, human - UK (23): (England, Scotland), report. ProMED-mail [Internet]. 25 Sep 2010 [cited 26.09.2010]. Available from: http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1202:972066983459692::NO::F2400_P1202_CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,84993
4. Anthrax, human, bovine - Bangladesh (23). ProMED-mail [Internet]. 25 Oct 2010 [cited 25.10.2010]. Available from: http://www.promedmail.org/pls/apex/f?p=2400:1001:972066983459692:::F2400_P1001_BACK_PAGE,F2400_P1001_ARCHIVE_NUMBER,F2400_P1001_USE_ARCHIVE:1202,20101025.3866,Y

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

**Epidemiological Situation on Anthrax in the Russian Federation:
Analysis of Morbidity in 2010, Prognosis for 2011**

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Analysis of epidemiological situation on anthrax in the Russian Federation and all over the world in 2010 is carried out. Prognosis of morbidity for 2011 is presented.

Key words: anthrax, etiological agent of anthrax, *Bacillus anthracis*.

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

1. [Sanitary-Epidemiological Regulations "Prophylaxis of Anthrax", SR 3.1.7.2629-10]. Federal Service for Surveillance in the Sphere of

Customers Rights Protection and Human Welfare; 2010.

2. [Epizootic Situation in the RF (9 months of the year 2010)]. Available from: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/2010/files/russia2010.pdf> [cited 25.12.2010].

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 18.01.11.

Г.М.Вахрамеева, А.А.Лапин, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, Р.И.Миронова, И.А.Дятлов

ПЦР ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОДВИДОВ *FRANCISELLA TULARENSIS* С ПОМОЩЬЮ ОДНОГО ПРАЙМЕРА

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Представлены экспериментальные данные распределения по размерам ампликонов, полученных с помощью праймера, содержащего *chi*-последовательность *Escherichia coli*, и ДНК из штаммов различных подвидов *Francisella tularensis*. Анализ данного распределения позволил выявить пять информативных областей картины электрофореграмм (в районах 190, 280, 500–570, 830 и 950 п.о.), дающих возможность проводить подвидовую дифференциацию штаммов туляремии микроба. Несмотря на незначительную генетическую гетерогенность штаммов *F. tularensis*, ПЦР-анализ с использованием только одного праймера *Chi* 1f позволяет определять подвидовую принадлежность клинических изолятов возбудителя туляремии удобным, безопасным и быстрым способом.

Ключевые слова: *F. tularensis*, подвид, ПЦР, типирование, праймер.

Возбудителем туляремии является грамотрицательная факультативно-анаэробная внутриклеточная бактерия *Francisella tularensis*. Имеющиеся подвиды *F. tularensis*: *tularensis* (*nearctica*, тип А), *holarctica* (*palaeartica*, тип В), *mediasiatica* и *novicida* различаются по вирулентности для животных и человека. Поэтому создание надежного метода внутривидовой дифференциации *F. tularensis* имеет важное практическое значение по причине широкого распространения природных очагов данной инфекции на территории РФ, периодически возникающих вспышек этого заболевания и возможности использования его в качестве агента биотерроризма.

Существуют общепринятые серологические методы обнаружения возбудителя туляремии, однако из-за отсутствия существенных внутривидовых антигенных отличий невозможно использовать данные методы для подвидовой дифференциации [6]. Подвиды *F. tularensis* дифференцируются по биохимическим свойствам [1], однако этот подход является достаточно трудоемким и требует работы с живой культурой.

В настоящее время для внутривидового типирования *F. tularensis* широко применяется VNTR метод (Variable Number Tandem Repeat – вариабельные нуклеотидные тандемные повторы) [3]. Но данный метод требует использования целого набора праймеров для получения однозначного ответа о подвидовой принадлежности анализируемого генетического материала. Применение RAPD метода (Randomly Amplified Polymorphic DNA – ПЦР с использованием случайных праймеров) позволяет проводить относительно просто внутривидовую дифференциацию штаммов туляремии микроба [7]. Однако до настоящего времени не предложены праймеры, которые позволяют надежно различать штаммы, относящиеся к различным подвидам.

В настоящей работе сконструирован прай-

мер *Chi* 1f, позволяющий проводить методом ПЦР внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*. В качестве основы праймера нами была использована последовательность *chi*-сайта *Escherichia coli* 5'-GCTGGTGG 3' [5]. Участки с *chi*-сайтами являются «горячими точками» для внутригеномной рекомбинации у кишечной палочки [2]. Праймер *Chi* 1f, помимо *chi*-последовательности, содержит также фланкирующие нуклеотиды: 5'-CTAGG-GCTGGTGG-G 3'.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали штаммы из коллекции ФГУН ГНЦ ПМБ: *F. tularensis* различного географического происхождения (subsp. *tularensis* Schu, 8859 и B399, subsp. *holarctica* 15, 503 и 21/400, subsp. *holarctica* bv. *japonica* Jasoe и Miura, subsp. *mediasiatica* 117 и 120, subsp. *novicida* Utah 112), *Salmonella enteritidis*, *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, *Escherichia coli* JM83. Культуры туляремии микроба выращивали на FT агаре (ФГУН ГНЦ ПМБ) с добавлением полимиксина В до 100 мкг/мл при температуре 37 °С в течение 24 ч. Культуры штаммов остальных микроорганизмов выращивали на агаре Лурия-Бертани [8] при температуре 37 °С в течение 18 ч.

Выделение ДНК из *F. tularensis*. Ночную агаровую культуру суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (~10 мг биомассы в 250 мл раствора). Суспензию смешивали с равным объемом раствора, содержащего 200 мМ NaOH и 1 % додецилсульфата натрия (ДСН). Лизат переносили в 65 мкл 4 М (NH₄)₂SO₄, перемешивали, инкубировали в водяной бане при температуре 95 °С в течение 15 мин и помещали в лед с водой на 15 мин. В полученную суспензию добавляли равный объем изопропанола и инкубировали при температуре 4 °С в течение 30 мин. Нуклеиновые кислоты осаждали

центрифугированием при 10000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Полученный осадок промывали 70 % этанолом, ресуспендировали в 1 мл буфера TE и прогревали при температуре 95 °C в течение 10 мин. Препарат хранили при температуре минус 20 °C.

Выделение ДНК из *S. enteritidis*, *Y. pestis*, *E. coli*. Проводили по методике, описанной выше.

Постановка полимеразной цепной реакции. Праймер Chi 1f был синтезирован в ЗАО «Синтол». Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10х буфер для ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) – 75 mM трис-HCl (pH 8,8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 0,4 пкМ праймера, 0,2 мкМ каждого дНТФ, 1 ед Taq ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) и 50–100 нг ДНК. Условия проведения ПЦР-амплификации: начальная денатурация 94 °C (3 мин); 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °C (30 с), отжига при 54 °C (30 с) и элонгации при 72 °C (1 мин); завершающая элонгация при 72 °C (5 мин). При подборе амплификации использовали два режима проведения ПЦР: градиентный (с использованием термоциклера «Mastercycler Gradient», Eppendorf, Германия) и обычный (с использованием термоциклера «Applied Biosystem 2700», США). Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле, гель готовили на буфере TBE [8]. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием [8]. Фотодокументирование проводили на системе для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция), при ультрафиолетовом освещении с помощью трансиллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов использовали маркер молекулярных весов GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, «Fermentas», Литва.

Результаты и обсуждение

Ампликоны, получаемые с помощью праймера Chi 1f на матрицах штаммов *F. tularensis* различного географического происхождения, имеют характерное распределение полос по интенсивности и размерам (от ~100 п.о. до ~2000 п.о.), рис. 1.

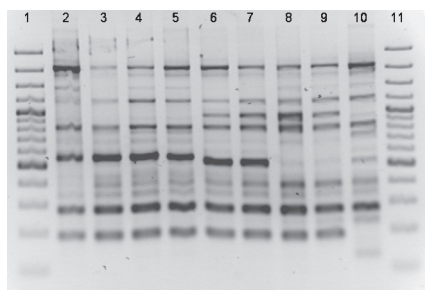


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi 1f и ДНК *F. tularensis*:

1–11 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – subsp. *holarctica* 15; 3 – subsp. *holarctica* 503; 4 – subsp. *holarctica* bv. *japonica* Miura; 5 – subsp. *holarctica* bv. *japonica* Jasoe; 6 – subsp. *tularensis* 8859; 7 – subsp. *tularensis* Schu; 8 – subsp. *mediasiatica* 120; 9 – subsp. *mediasiatica* 117; 10 – subsp. *novicida* Utah 112

Визуальное сравнение картины распределения ампликонов позволяет выделить пять характерных областей электрофореграмм: ~190, ~280, ~500–570, ~830, ~950 п.о.

Для оптимизации информативности получаемых электрофореграмм нами проведен сравнительный анализ распределения ампликонов по интенсивности и размерам при различных температурах отжига праймеров на ДНК. В качестве матриц в этих экспериментах использовалась ДНК из штаммов туляремийного микроба различной подвижной принадлежности – subsp. *tularensis* Schu, subsp. *holarctica* 503, subsp. *mediasiatica* 120. Наиболее яркая картина распределения фрагментов ДНК по гелю была получена при температуре отжига 54 °C (данные не приведены). Эту температуру в дальнейшем применяли при проведении ПЦР.

Для выяснения уникальности электрофореграмм ампликонов, синтезируемых на матрицах *F. tularensis* с помощью праймера Chi 1f, были использованы ДНК ряда микроорганизмов: *S. enteritidis*, *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, *E. coli* JM83 (рис. 2).

Представленная на рис. 2 картина распределения ампликонов по подвижности и интенсивности позволяет сделать предположение, что праймер Chi 1f можно использовать не только для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*, но и, в определенных рамках, для межвидового и родового типирования генетического материала.

Сравнение подвижности доминирующих по интенсивности ампликонов различных подвигов *F. tularensis* позволило выявить общие для штаммов туляремийного микроба фрагменты ДНК размерами ~280 и ~830 п.о. Штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* отличается от других штаммов вида *F. tularensis* отсутствием полос в области ~190 п.о. (рис. 1). У среднеазиатского подвида туляремийного микроба отсутствует ампликон в области ~500–570 п.о. Штаммы голарктического подвида, в том числе японского биовара, отличаются от штаммов неарктического подвида *F. tularensis* наличием полосы размером ~570 п.о., тогда как для подвида *tularensis* характерен фрагмент размером ~500 п.о. У голарктического подвида отсутствует фрагмент размером ~950 п.о.,

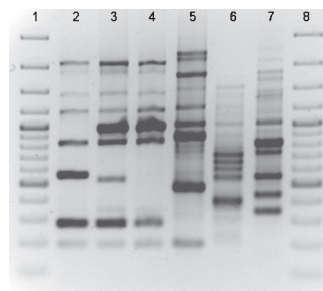


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных в ПЦР с праймером Chi 1f и ДНК различных видов микроорганизмов:

1–8 – GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; 2 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503; 3 – *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu; 4 – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 120; 5 – *S. enteritidis*; 6 – *Y. pestis* EV линии НИИЭГ; 7 – *E. coli* JM83

Распределение диагностически значимых ампликонов по размерам для штаммов различных подвидов *F. tularensis*

Подвид	Штамм	Размер ампликона, п.о.					
		~190	~280	~500	~570	~830	~950
<i>tularensis</i>	Schu	+	+	+	-	+	+
	8859	+	+	+	-	+	+
	B399	+	+	+	-	+	+
<i>holarctica</i>	15	+	+	-	+	+	-
	503	+	+	-	+	+	-
	21/400	+	+	-	+	+	-
<i>holarctica</i> bv. <i>japonica</i>	Jasoe	+	+	-	+	+	-
	Miura	+	+	-	+	+	--
<i>mediasiatica</i>	117	+	+	-	-	+	+
	120	+	+	-	-	+	+
<i>novicida</i>	Utah 112	-	+	-	-	+	-

который присутствует у штаммов subsp. *tularensis* и subsp. *mediasiatica*. Сводные данные по распределению ампликонов на электрофореграммах приведены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования одного праймера для внутривидовой дифференциации *F. tularensis*. Сходные результаты и выводы были представлены в работах [3, 4, 7].

Предлагаемый праймер, на наш взгляд, позволяет проводить не только внутривидовую дифференциацию *F. tularensis*, но также определять однородность исследуемой ДНК на возможность присутствия генетического материала других микроорганизмов.

Картина распределения ампликонов ПЦР ДНК *F. tularensis* различных подвидов с использованием праймера Chi 1f свидетельствует о существенном отличии подвида *novicida* от других подвидов. Уникальное сходство ампликонов размером ~950 п.о., полученных с использованием ДНК штаммов подвидов *mediasiatica* и *nearctica*, согласуется со схожестью этих подвидов по ряду биохимических свойств (ферментация глицерина и продукция цитруллинуреидазы).

Для изучения подвидовой эволюции туляремийного микроба представляет интерес проведение тонкого структурного анализа электрофореграмм ПЦР-продуктов, полученных с помощью предлагаемого нами праймера, штаммов *F. tularensis*, выделенных из различных природных очагов туляремии.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д/2 от 16.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
2. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. М.: Наука; 1984. 472 с.
3. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J. Bacteriol. 2004; 186:5808–18.
4. Johansson A., Ibrahim A., Goransson I., Eriksson U.,

Gurycova D., Claridge III J.E., Sjöstedt A. Evaluation of PCR-based methods for discrimination of *Francisella* species and subspecies and development of a specific PCR that distinguishes two major subspecies of *Francisella tularensis*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(11):4180–5.

5. Kobayashi I., Murialdo H., Crasemann J.M., Stahl M.M., Stahl F.W. Orientation of cohesive end site *cos* determines the active orientation of χ sequence in stimulating recA-recBC-mediated recombination in phage λ lytic infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982; 79:5981–5.

6. Nutter J.E. Antigens of *Pasteurella tularensis*: preparative procedures. Appl. Microbiol. 1971; 22:44–8.

7. De la Puente-Redondo V.A., del Blanco N.G., Gutierrez-Martin C.B., Garcia-Pena F.J., Ferri E.F.R. Comparison of different Approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(3):1016–22.

8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

G.M. Vakhrameeva, A.A. Lapin, V.M. Pavlov, A.N. Mokrievich,
R.I. Mironova, I.A. Dyatlov

PCR Differentiation of *Francisella tularensis* Subspecies Using One Primer

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology,
Obolensk

Presented are experimental data of size distribution of amplicons obtained with the help of the primer consisting of *Escherichia coli* chi-sequence and DNA from different subspecies of *Francisella tularensis* strains. Analysis of this distribution permitted to determine five informative regions on the electrophoregrams (in the regions of 190, 280, 500–570, 830 and 950 b.p.), that made it possible to perform subspecies differentiation of tularemia microbe strains. Thus, the subspecies of *F. tularensis* clinical isolates can be identified by safe, fast and convenient method – the PCR analysis using only one primer Chi 1f despite the slight genetic heterogeneity of tularemia agent strains.

Key words: *F. tularensis*, subspecies, PCR, typing, primer.

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

1. Олсуфьев Н.Г. [Taxonomia, microbiology and laboratory diagnostics of tularemia agent]. Moscow: Medicina; 1975. 192 p.
2. Khesin N.B. [Genome variability]. Moscow: Nauka; 1984. 472 p.

Authors:

Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 20.09.10.

А.А.Горяев, С.П.Заднова, А.В.Шубина, Я.М.Краснов, Н.И.Смирнова

**ИЗМЕНЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ,
ВЫДЕЛЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведен ретроспективный генетический анализ штаммов холерного вибриона, вызвавших вспышки и спорадические случаи холеры на территории Российской Федерации с 1993 по 2006 год. Установлено, что уже с 1993 г. заболевание вызывали измененные штаммы *Vibrio cholerae* биовара эльтор, содержащие в геноме профага СТХф ген *ctxB* классического типа, кодирующий В-субъединицу холерного токсина. Кроме того, обнаружено два штамма, у которых в геноме профага присутствовал ген *rstR* классического типа.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, профаг СТХф, измененные варианты.

В настоящее время известно более 200 серогрупп холерных вибрионов, однако возбудителем холеры являются только токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. На основании фенотипических и генетических признаков холерные вибрионы O1 серогруппы разделяют на два биовара – классический и эльтор. Штаммы классического биовара были, по-видимому, возбудителями первых шести пандемий холеры (1817–1923 гг.), в то время как штаммы биовара эльтор вызвали седьмую пандемию, начавшуюся в 1961 г. и продолжающуюся по настоящее время [1, 4]. Фенотипические различия штаммов двух биоваров связаны со способностью эльтор вибрионов продуцировать термолabileмный гемолизин, агглютинировать куриные эритроциты, ферментировать глюкозу до образования ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра, расти на средах, содержащих полимиксин В, и лизироваться диагностическим холерным бактериофагом эльтор. Несмотря на значительные фенотипические различия, сравнительный генетический анализ штаммов двух биоваров показал высокую степень сходства их геномов [3]. Выявленные различия связаны с неодинаковыми нуклеотидными последовательностями гена *tcpA*, основного белка токсин-корегулируемых пилей адгезии, необходимого холерным вибрионам для колонизации кишечника человека, гена *rstR*, репрессора профага СТХф, а также гена *hlyA*, ответственного за синтез термолabileмного гемолизина. Кроме того, разная нуклеотидная последовательность гена *ctxB* у холерных вибрионов классического и эльтор биоваров (две нуклеотидные замены в 115 и 203 положениях у вибрионов эльтор) определяет биосинтез холерного токсина (ХТ) разных типов – 1-го и 2-го. Также в геноме *V. cholerae* биовара эльтор присутствуют два острова пандемичности (VSP-I и VSP-II) и гены *rstC* и *rtxC*, входящие в состав профага RS1φ и RTX-оперона [1, 3].

Вместе с тем, по литературным данным, известно, что начиная с 1991 г. в странах Юго-Восточной Азии обнаружены атипичные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор, отличительной особенностью которых явилось наличие аллелей классического типа в

генах *tcpA*, *rstR* и *ctxB*. При этом некоторые штаммы совмещали фенотипические признаки классического и эльтор биоваров. Такие измененные штаммы эльтор вибрионов, отличающиеся повышенной вирулентностью, стали доминирующими и вытеснили типичные эльтор вибрионы на территории стран Азии и Африки [9, 10].

Целью данной работы был ретроспективный генетический анализ штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, выделенных с 1993 по 2006 год в период эпидемических вспышек и при единичных заносах холеры на территорию Российской Федерации.

Материалы и методы

В работе были использованы 10 клинических штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». В качестве контрольных штаммов использовали *V. cholerae* M818 биовара эльтор и *V. cholerae* 569В классического биовара. Для культивирования бактерий применяли бульон и агар LB (pH 7,2), а также бульон АК1 (pH 8,4).

Определение чувствительности к холерным диагностическим фагам, продукции гемолизина, чувствительности к полимиксину В и реакцию Фогес-Проскауэра проводили согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры».

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в микропробирках объемом 600 мкл на амплификаторе «PTC-150» (MJ Research, США) и iCycler IQ5 (Bio-Rad, США). В реакционную смесь объемом 15 мкл (2,5 мкл буфера 3а – 0,67 М Трис-НСl pH 8,4, 0,166 М (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Twin 20, 200 мкг/мл BSA, 0,02 М MgCl₂; 2,5 мкл смеси 2 мМ dNTP («Сибэнзим»); 0,25 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы («Бионем»); по 0,5 мкл специфических праймеров; и 8,75 мкл деионизированной воды) добавляли 10 мкл анализируемой ДНК. Последовательности праймеров, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Секвенирование генов *rstR* и *ctxB* проводили на приборе «CEQ8000» (Beckman Coulter, США). Для

Результаты и обсуждение

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованные в работе

Название	Последовательность (5'-3')	Ссылка
<i>ctxA-F</i>	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	[5]
<i>ctxA-R</i>	CGATGATCTTGGAGCATCCCCAC	
<i>ctxB-F</i>	ATGATTAAATTAATAATTGG	Рассчитан авторами
<i>ctxB-R</i>	TTAATTTGCCATACTAATTG	
<i>Ig-1-F</i>	GAGCCTGTGACACTCACCTTGTAT	[2]
<i>rstR-1F-clas</i>	CTTCTCATCAGCAAAGCCTCCATC	
<i>rstR-2F-eltor</i>	GCACCATGATTAAAGATGCTC	
<i>rstA-3R</i>	TCGAGTTGTAATTCATCAAGAGTG	
<i>Fw-con</i>	ACTATCTTCAGCATATGCACATGG	[8]
<i>Rv-clas</i>	CCTGGTACTTCTACTTGAAACG	
<i>Rv-eltor</i>	CCTGGTACTTCTACTTGAAACA	
<i>rtxC-F</i>	CGACGAAGATCATTGACGAC	[7]
<i>rtxC-R</i>	CATCGTCGTTATGTGGTTGC	
<i>rstC-1</i>	AACAGCTACTGGCTTATTC	[12]
<i>rstC-2</i>	TGAGTTGCGGATTTAGGC	
<i>tcpA-F</i>	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	[6]
<i>tcpA-R-eltor</i>	CGAAAGCACCTTCTTCACGTTG	
<i>tcpA-R-clas</i>	TTACCAAATGCAACGCCGAATG	

сравнения использовали нуклеотидные последовательности изучаемых генов штаммов *V. cholerae* N16961 биовара эльтор и *V. cholerae* O395 классического биовара, представленные в GenBank. Анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0» и «Mega4» [11].

Для проведения анализа нами были использованы штаммы, выделенные от больных во время эпидемических вспышек холеры в Дагестане (1993 г.), Приморье (1997 г.) и Казани (2001 г.), а также при единичных заносах холеры в Пермь (1993 г.), Белорецк (2004 г.), Тверь (2005 г.) и Мурманск (2006 г.).

При изучении фенотипических свойств установлено, что все анализируемые изоляты относятся к штаммам холерного вибриона биовара эльтор: чувствительны к эльтор и резистентны к классическому диагностическим холерным бактериофагам, растут на среде с полимиксином В, продуцируют гемолизин и образуют ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра (табл. 2).

На следующем этапе был проведен ПЦР-анализ, который показал наличие у всех штаммов генов *ctxA*, *rstC* и *rtxC*. При использовании аллель-специфических праймеров было установлено присутствие у всех изучаемых штаммов генов *tcpA* и *rstR* эльтор типа или *tcpA^{El}* и *rstR^{El}* (табл. 2). Однако в хромосоме двух штаммов – *V. cholerae* M1266 и M1293, наряду с геном *rstR^{El}*, также присутствовал *rstR* классического типа или *rstR^{Class}* (табл. 2). Для выявления генотипа *ctxB* был проведен Mismatch Amplification Mutation Assay PCR (MAMA-PCR), позволяющий дифференцировать однонуклеотидные различия в положении 203 гена *ctxB*. По результатам MAMA-PCR-анализа все изучаемые штаммы содержали *ctxB* классического типа или *ctxB^{Class}* (табл. 2).

Для подтверждения полученных результатов нами было проведено секвенирование генов *rstR* и *ctxB*. Анализ нуклеотидных последовательностей подтвердил данные ПЦР-анализа. Ген *rstR* штаммов

Таблица 2

Фенотипические и генетические особенности штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор, выделенные на территории Российской Федерации с 1993 по 2006 гг.

Штамм	Место выделения	Год выделения	Биовар	Фенотип*				Генотип**					
				фаг С	фаг эльтор	Ф-П	полимиксин В	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>rstR</i>	<i>tcpA</i>	<i>rstC</i>	<i>rtxC</i>
M1266	Пермь	1993	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El/Class	El	+	+
M1293	Дагестан	1994	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El/Class	El	+	+
P17647	Красноярский край	1997	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
P17644	Красноярский край	1997	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M1344	Казань	2001	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M1345	Казань	2001	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M1349	Казань	2001	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M1429	Белорецк	2004	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M1430	Тверь	2005	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
P18899	Мурманск	2006	эльтор	R	S	+	R	+	Class	El	El	+	+
M818	Саратов	1970	эльтор	R	S	+	R	+	El	El	El	+	+
569B	Индия	1948	Классический	S	R	-	S	+	Class	Class	Class	-	-

* R или S – резистентность или чувствительность к полимиксину или к диагностическим холерным бактериофагам С (классическому) или эльтор; Ф-П – реакция Фогес-Проскауэра;

** Class – аллель классического биовара, El – аллель биовара эльтор.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	115	120	130
N16961	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M818	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
O395	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
569B	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1266	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1293	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
P17644	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
P17647	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1344	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1345	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1349	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1429	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
M1430	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
P18899	ATGATTAAAT	TAAATTTTGG	TGTTTTTTTT	ACAGTTTATC	TATCTTCAGC	ATATGCACAT	GGAAACCCCTC	AAAATATTAC	TGATTTGTGT	GCAGAATACC	ACAAACACACA	AATATATACG	CTAAATGATA	
	140	150	160	170	180	190	200	203	210	220	230	240	250	260
N16961	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M818	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
O395	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
569B	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1266	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1293	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
P17644	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
P17647	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1344	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1345	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1349	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1429	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
M1430	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
P18899	AGATATTTTC	GTATACAGAA	TCTCTAGCTG	GAAAAAGAGA	GATGGCTATC	ATTACTTTTA	AGAAATGGTGC	AACITTTTCAA	GTAGAAATAC	CAGGTAGTCA	ACATATAGAT	TCACAAAAAA	AAGCGATTGA	
	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370			
N16961	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M818	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
O395	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
569B	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1266	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1293	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
P17644	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
P17647	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1344	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1345	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1349	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1429	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
M1430	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		
P18899	AAGGATGAAG	GATACCCCTGA	GGATTGTCATA	TCTTACTGAA	GCTAAAGTCG	AAAAATTATG	TGATATGGAAT	AATAAAACGC	CTCATGCGAT	TGCCCGCAATT	AGTATGCGCA	ATTAA		

Выворнутые нуклеотидные последовательности генов *ctxB* изучаемых штаммов *V. cholerae*.

Последовательности генов *ctxB* штаммов N16961 биовара эльтор и O395 классического биовара взяты для сравнения из GenBank

V. cholerae P17647, P17644, M1344, M1345, M1349, M1429, M1430 и P18899 был полностью идентичен последовательности гена *rstR^{El}* штамма *V. cholerae* N16961 эльтор биовара, представленной в GenBank, а также последовательности этого гена контрольного штамма *V. cholerae* M818. У штаммов *V. cholerae* M1266 и M1293, выделенных соответственно в Перми (1993 г.) и Дагестане (1994 г.), присутствовали два аллеля гена *rstR*, один из которых был идентичен гену *rstR^{El}* штаммов N16961 и M818 биовара эльтор, а другой – гену *rstR^{Class}* штаммов O395 и 569B классического биовара. При сравнении сиквенсов гена *ctxB* оказалось, что все исследуемые штаммы содержат в геноме профага CTXφ ген *ctxB^{Class}*, так как в нуклеотидной последовательности этого гена в позициях 115 и 203 присутствует цитозин (рисунок).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают, что взятые для анализа клинические штаммы *V. cholerae*, выделенные на территории Российской Федерации во время эпидемических вспышек и при единичных заносах холеры в 1993–2006 гг. и относящиеся по фенотипическим признакам к эльтор биовару, являются измененными эльтор вариантами, так как содержат в геноме про-

фага CTXφ гены *rstR^{El}* и *ctxB^{Class}*, либо *rstR^{El}/rstR^{Class}* и *ctxB^{Class}*. Наличие у двух штаммов *V. cholerae* M1266 и M1293 гена *rstR* двух биоварспецифических аллелей, возможно, связано с присутствием в их геноме двух различных профагов CTXφ (CTX^{El}φ и CTX^{Class}φ), которые могут располагаться тандемно на одной хромосоме, либо раздельно на разных хромосомах.

На основании представленных результатов можно предположить, что начиная с 1993 г. все эпидемические вспышки и единичные завозные случаи холеры были вызваны измененными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор, содержащими ген *ctxB^{Class}*. Для подтверждения данного предположения необходимо дальнейшее исследование большего количества штаммов. Тем не менее, полученные данные указывают на необходимость создания новых генодиагностических препаратов для своевременного выявления измененных вариантов возбудителя холеры.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
2. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., et al. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.
3. Chun J., Grim C.J., Hasan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J., et al. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 106(36):15442–7.
4. Faruque S.M., Nair G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Immunol. 2002; 46:59–66.
5. Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J. Clin. Microbiol. 1992; 30(8):2118–21.
6. Keasler S.P., Hall R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet. 1993; 341(8861):1661.
7. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. J. Med. Microbiol. 2009; 58:234–8.
8. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 52:314–7.
9. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype EL Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3296–9.
10. Safa A., Sultana J., Cam P.D., et al. Classical cholera toxin producing *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains in Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:987–8.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 2007; 24(8):1596–9.
12. Waldor M.K., Rubin E.J., Gregory D.N. et al. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by regions RS2. Mol. Microbiol. 1997; 24:917–26.

A.A.Goryaev, S.P.Zadnova, A.V.Shubina, Ya.M.Krasnov,
N.I.Smirnova

Altered Variants of Cholera Agent Isolated in the Territory of the Russian Federation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out was the retrospective genetic analysis of cholera vibrio strains which caused the outbreaks and sporadic cases of cholera in the territory of the Russian Federation from 1993 to 2006. It was elucidated that beginning from 1993 the disease had been caused by the altered strains of *V. cholerae* El Tor containing *ctxB* gene of classical type, encoding B subunit of cholera toxin, in their CTX ϕ prophage genome. In addition, identified were two strains whose prophage genome contained classical type *rstR* gene.

Key words: *Vibrio cholerae*, CTX ϕ prophage, altered variants.

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

1. Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Evolution of the cholera agent genome]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2004; 4:3–13.

Authors:

Goryaev A.A., Zadnova S.P., Shubina A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Горяев А.А., Заднова С.П., Шубина А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 26.09.10.

Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинокоев, Л.В.Анисимова, Н.Ю.Шавина,
Н.А.Виноградова, В.В.Кутырев

АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ШТАММЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ И РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИХ ДЕТЕКЦИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В работе приведены данные об антибиотикоустойчивых штаммах *Yersinia pestis*, выделенных из клинических источников и от животных, и показаны причины их резистентности к различным лекарственным препаратам. Сообщается о разработке двух ПЦР для выявления генов устойчивости к антибиотикам, эффективность которых подтверждена при использовании коллекции антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis*.

Ключевые слова: возбудитель чумы, антибиотикоустойчивость, гены, детекция, полимеразная цепная реакция.

Штаммы *Yersinia pestis*, циркулирующие в естественных условиях в природных очагах чумы, как правило, чувствительны к действию антибиотиков [7, 14, 16]. Так проведенное Е. Hernandez *et al.* [7] изучение чувствительности 94 штаммов *Y. pestis*, выделенных в разных регионах, к 24 различным антибиотикам, показало, что все изоляты были чувствительны к изученным антибиотикам, включая флуорхинолоны, аминогликозиды и доксициклин. Наиболее активными в отношении *Y. pestis* оказались флуорхинолоновые антибиотики, цефалоспорины третьего поколения и аминогликозиды.

Впервые для лечения чумы в качестве антимикробных агентов были применены сульфонамид (1938 г.) и стрептомицин (1946 г.) [13]. Их использование привело к резкому падению смертности среди заболевших чумой. В настоящее время для лечения этой болезни широко применяются антибиотики стрептомицин, тетрациклин и хлорамфеникол. Основным из них является стрептомицин, однако из-за ограниченного доступа к стрептомицину в некоторых странах вместо него применяют гентамицин или гентамицин в сочетании с тетрациклином. Хлорамфеникол является препаратом выбора для лечения чумы, осложненной менингитом или плевритом, так как в этих случаях другие антибиотики менее эффективны [2, 9, 12]. Альтернативными лекарственными препаратами для чумы являются флуорохинолоны, а для ее профилактики используют сульфонамид, триметоприм-сульфаметоксазол и тетрациклин [5].

В 1995 г. на о. Мадагаскар от больного человека был изолирован штамм *Y. pestis* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR – multi-drug resistance) к препаратам, используемым для лечения (стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин), профилактики (сульфонамид, тетрациклин), а также к препаратам резерва (канамицин, ампициллин, спектиномицин) [5]. Как оказалось, детерминанты устойчивости к антибиотикам были локализованы на конъюгативной плазмиде rIP1202 (150 т.п.н.), принадлежавшей группе несовместимости Inc6-C. Устойчивость к ампициллину была вызвана наличием TEM-1 пенициллиназы (*bla*_{TEM-1}), хлорамфе-

николу – хлорамфеникол ацетилтрансферазы I типа (*catI*), к канамицину – 3'-O-аминогликозид фосфотрансферазы I типа [*aph*(3')-II], к сульфонамиду – лекарственно-устойчивой дегидроптероат синтазы (*sulI*), и к стрептомицину – 3'-9-O-аминогликозид аденилтрансферазы (*ant3'9*) [4, 5]. Устойчивость к тетрациклину была обусловлена эффлюксом [*tet*(D)]. Плазида rIP1202 могла с высокой частотой передаваться между штаммами возбудителя чумы [4–6, 8].

В том же году на о. Мадагаскар был выделен еще один клинический антибиотикоустойчивый штамм *Y. pestis*, содержащий другую конъюгативную плазмиду rIP1203 (40 т.п.н.), с высоким уровнем резистентности к стрептомицину, которая также могла с высокой частотой передаваться штаммам чумного микроба. Плазида rIP1203 содержала два гена *strA* (801 п.н.) и *strB* (804 п.н.), кодирующих аминогликозид 3'-O- и 6-O-фосфотрансферазные активности [5]. В течение последующих трех лет (1996–1998 гг.) на о. Мадагаскар были выделены два клинических изолята, один из них отличался устойчивостью к ампициллину, а другой – к хлорамфениколу [3]. Затем в столице острова (г. Антананариву) были изолированы три штамма *Y. pestis*: один с устойчивостью к тетрациклину (от крысы) и два – к ампициллину (от блох) [3].

В 2004 г. rIP1202 – подобная конъюгативная плазида была обнаружена в Восточном Китае у штамма холерного вибриона *V. cholerae* O139, устойчивого, по крайней мере, к 6 антибиотикам – ампициллину, стрептомицину, гентамицину, хлорамфениколу и триметоприм-сульфаметаксозолу. Идентичность MDR плазмид *Y. pestis* и *V. cholerae* составила 99,99 % [11]. Анализ MDR штаммов *V. cholerae* O139, изолированных в Восточном Китае с 1994 по 2006 год, выявил значительный рост изолятов, содержащих rIP1202-подобную плазмиду, – от 7,69 до 92,16 % [11].

Плазмиды с практически идентичными плазмидами rIP1202 последовательностями были выявлены у штаммов *Salmonella enterica* серотипа Newport у патогенных для рыб штаммов *Yersinia ruckeri*, а также у многочисленных энтеробактериальных патогенов,

изолированных из розничных мясных продуктов в 2002–2005 гг. в США [15]. Все эти данные свидетельствуют о возрастающем распространении rIP1202-подобных MDR плазмид среди зоонозных патогенных бактерий, а также о возникновении в природе резервуара MDR подвижных генетических элементов, которые могут передаваться возбудителям опасных и особо опасных инфекционных болезней.

Появление в природе атипичных антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* представляет серьезную проблему для здравоохранения, поскольку это может привести к повышению процента летальности среди заболевших чумой. К тому же именно MDR штаммы могут быть использованы в качестве биологического агента в актах биотерроризма [10]. Все это требует проведения мониторинга выделяемых штаммов *Y. pestis* по их антибиотикоустойчивости, а также разработки современных и эффективных методов идентификации MDR штаммов.

В настоящее время для выявления штаммов *Y. pestis*, резистентных к лекарственным препаратам, используются микробиологические методы, которые занимают достаточно продолжительное время, что затрудняет своевременный выбор лекарственного препарата для лечения больного человека. Развитие высокоэффективных технологий современной молекулярной микробиологии позволяет осуществлять выявление лекарственной устойчивости у штаммов *Y. pestis* на качественно новом уровне. Большой эффективностью и быстротой получения результатов отличается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предназначенный для детекции различных генов. До сих пор этот метод использовали для выявления у возбудителя чумы генов вирулентности или видоспецифических участков ДНК.

Целью нашего исследования была разработка способа выявления у штаммов *Y. pestis* генов, кодирующих устойчивость к некоторым антибиотикам, на основе метода ПЦР.

Материалы и методы

В работе использовано 49 штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов различного происхождения. Штаммы культивировали на агаре или в бульоне LB при 37 °С. ДНК штаммов выделяли общепринятым способом [1]. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: 1 цикл – 94 °С 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С 45 с, 60 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл 72 °С 3 мин. Определение наличия продукта ПЦР-амплификации осуществляли методом электрофореза в 1–2 % агарозном геле [1].

Результаты и обсуждение

В связи с широким распространением у патогенных бактерий множественной устойчивости, вызванной плазмидой rIP1202, нами был проведен

компьютерный анализ генов антибиотикорезистентности этой плазмиды, полная нуклеотидная последовательность которой представлена в базе данных NCBI GenBank. Выявлено наличие двух генов *strA* и *strB*, кодирующих устойчивость к стрептомицину (Sm), двух генов *tetA* и *tetC* – к тетрациклину (Tc) и гена *cat* – к хлорамфениколу (Cm), а также других генов. Были определены размеры генов и их локализация на rIP1202: *strA* (размер гена 804 п.н.), положение гена 34715–35518 от начала последовательности плазмиды; *strB* (837 п.н.), положение гена 35519–36354; *tetA* (1185 п.н.), положение гена 1477544–148728; *tetR* (657 п.н.), положение гена 148824–149480; *cat* (660 п.н.), положение гена 40829–41483. Все перечисленные гены из состава плазмиды rIP1202 кодируют резистентность к антибиотикам, широко применяемым для лечения чумы.

На следующем этапе для выявления этих генов у штаммов *Y. pestis* нами были рассчитаны праймеры, последовательности которых представлены в табл. 1. Локализация некоторых праймеров указана на рис. 1 (А, Б, В). Кроме праймеров на гены антибиотикоустойчивости rIP1202, были также рассчитаны праймеры на ген канамицинустойчивости *npt* (796 п.н.), кодируемый транспозоном Tn5, часто встречающимся среди членов семейства Enterobacteriaceae (табл. 1).

Для изучения эффективности разработанных праймеров были использованы природные штаммы *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также коллекция антибиотикоустойчивых штаммов, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб» (табл. 2). Среди штаммов, резистентных к антибиотикам, присутствовали: четыре канамицинустойчивых штамма *Y. pestis*: KM219, KM244, KM245 и KM258, полученные путем введения в геном исходных штаммов транспозона Tn5, кодирующего устойчивость к канамицину; два тетрациклинустойчивых штамма – PKR133 (Tc^r) и Java (Tc^r); два устойчивых к хлорамфениколу штамма KM131 и KM221,

Таблица 1

Последовательности рассчитанных праймеров на гены антибиотикоустойчивости

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
strA-S	CATTCTGACTGGTTGCCTG
strA-As	ATTGCGGGACACCACATCA
strB-S	ACCTGTTCTCATTGCGGAC
strB-As	GAAAGGCACCCATAAGCGT
tetA-S	TACAGTGCCGTGCCAATCA
tetA-As	TCTGCCGTTTGTCAATTGCG
tetR-S	ATGAGACAGGGATTGACGG
tetR-As	TGACTGACCGCTGAAATCG
cat-S	ATTCACATCTTGCCCCGCC
cat-As	ATCAGCACCTTGTCGCCTT
Tn5(Kan)-S	ATTCGGCTATGACTGGGCA
Tn5(Kan)-As	ATGTTTCGCTTGGTGGTTCG

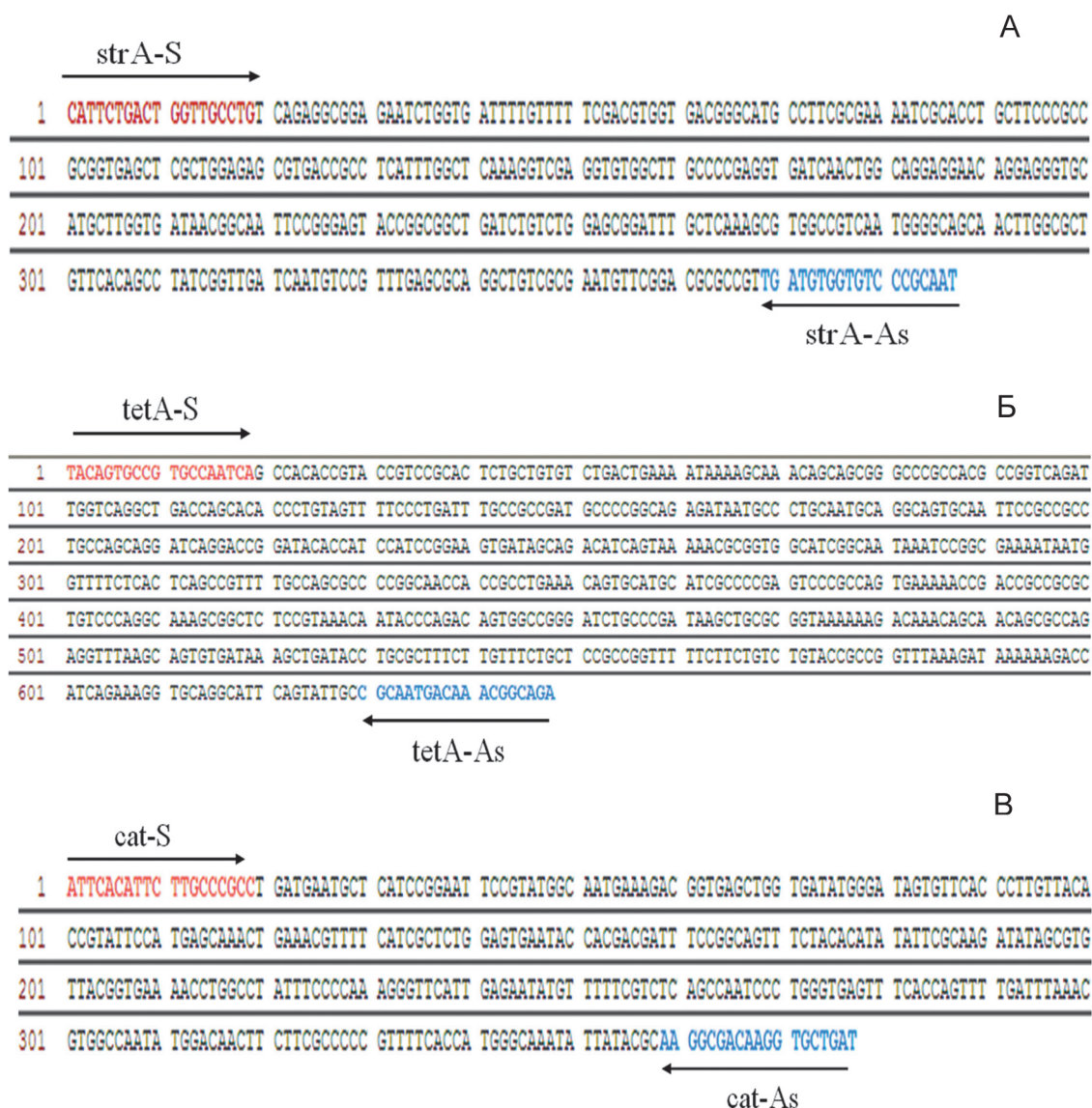


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *strA* (А), *tetA* (Б) и *cat* (В) плазмиды pIP1202. Указано положение прямого и обратного праймеров

сконструированных за счет введения плазмиды Flac::Tn9, содержащей транспозон Tn9 с генами устойчивости к Cm, а также резистентные к стрептомицину штаммы KM118, KM122, KM677, И-2998 (Sm^r), A-250 (Sm^r), полученные путем направленной селекции на средах со стрептомицином или под действием ультрафиолета.

При изучении коллекции природных и антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis*, использованных в этой работе, с помощью праймеров, сконструированных на ген *cat* плазмиды pIP1202, был получен положительный сигнал амплификации у штаммов *Y. pestis* KM131 и KM221, устойчивых к хлорамфениколу (табл. 2). В ПЦР у этих штаммов выявляли амплификаты, которые имели размер 377 п.н., что соответствовало ожидаемому (рис. 2).

Устойчивость к хлорамфениколу у Cm^r штаммов *Y. pestis* KM131 и KM221 обусловлена введенной в

них плазмидой F⁺lac::Tn9. По данным проведенного нами компьютерного анализа, ген устойчивости к хлорамфениколу, расположенный в Tn9, имеет практически идентичную последовательность гену *cat*, локализованному на плазмиде pIP1202. Такую же последовательность, по данным NCBI GenBank, имеет и ген *cat*, расположенный на плазмиде pIP1206 штамма *Escherichia coli* 1540, транспозоне Tn-Cam204 и плазмиде pO111, включенных в геном других штаммов *E. coli*. Это означает, что разработанная нами ПЦР на ген *cat* будет эффективна для выявления генов устойчивости к хлорамфениколу (и Cm^r штаммов *Y. pestis*), расположенных на мобильных генетических элементах разного происхождения.

С праймерами на гены *strA* и *strB*, а также на *tetA* и *tetR* (плазмида pIP1202) ни с одним из исследованных природных и авторских антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* не получено по-

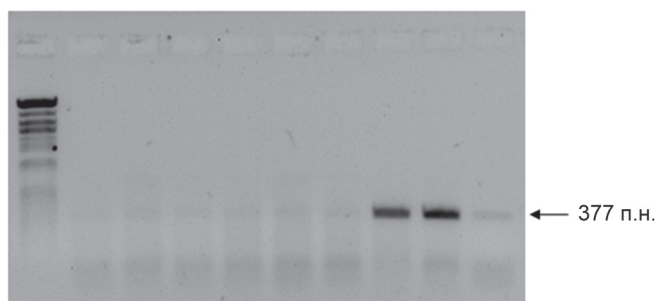
Таблица 2

Выявление антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* с помощью разработанных ПЦР

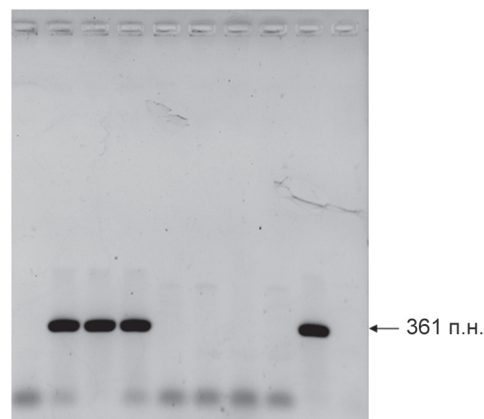
№	Название штамма	Антибио- тикоустой- чивость	Наличие гена <i>cat</i> (Cm ^r)	Наличие гена <i>npt</i> (Km ^r)
<i>Антибиотикоустойчивые штаммы</i>				
1–4	KM219, KM244, KM245, KM 258	Km ^r	–	+
5–9	KM677, KM118, KM122, И2998, А 250	Sm ^r	–	–
10–11	KM131, KM 221	Sm ^r	+	–
12–13	PKR133 (Tc ^r), Java (Tc ^r)	Tc ^r	–	–
<i>Природные штаммы</i>				
14–49	PKR133, 15 Hamburg, Sonche, Exu 21, Exu 33, KM 776, KM 567, A-1792, M-956, A-1793, A-161, M-519, A-1825, A-1836, A-100, 231исх, 353,1203, A-1486, И-1270, 7896, 3544 Арм., 1146, 818, A1633, A1724, A1725, 2183, 2817, KM 683, A1802, A1815, A1817, KM 684, И-3069, И-3071	–	–	–

ложительного результата, что свидетельствовало об отсутствии у них генов, идентичных таковым, расположенным на плазмиде pIP1202, и о наличии у них других механизмов резистентности к Sm и Tc. Несмотря на то, что проведенное нами компьютерное моделирование комплементарности сконструированных праймеров последовательностям генов *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR* свидетельствует об их эффективности для выявления этих генов, тем не менее, для подтверждения возможности их использования на практике необходимы бактериальные штаммы, содержащие мобильные генетические элементы с генами резистентности к Sm и Tc, гомологичными генам pIP1202. Эффективность разработанных праймеров на эти гены предстоит выяснить в дальнейшем.

Нами была также разработана ПЦР для выявления гена *npt* устойчивости к канамицину, локализо-

Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis* с праймерами на ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – Маркер молекулярных масс λ /Ava; 2 – KM219; 3 – KM244; 4 – KM245; 5 – KM258; 6 – PKR133 (Tc^r); 7 – Java; 8 – KM131; 9 – KM221; 10 – отрицательный контроль. Стрелкой указан размер амплификата

Рис. 3. ПЦР анализ штаммов *Y. pestis* с праймерами на ген *npt* устойчивости к канамицину:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – KM122; 2 – KM245; 3 – KM244; 4 – KM258; 5 – Java (Tc^r); 6 – KM118; 7 – KM677; 8 – KM221; 9 – KM219; 10 – отрицательный контроль. Стрелкой указан размер амплификата

ванного на транспозоне Tn5, который встречается у разных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. С помощью разработанной ПЦР были получены положительные сигналы у штаммов KM219, KM244, KM245, KM258, устойчивых к канамицину (табл. 2, рис. 3). В ПЦР выявлялись амплификаты ожидаемого размера – 361 п.н.

Ген *npt* устойчивости к канамицину, расположенный на транспозоне Tn5, часто встречается у бактерий и носит разные названия – *nptII*, *aph* и *npt*, но, по данным NCBI GenBank, имеет идентичную последовательность и одинаковые размеры независимо от его источника, из чего следует, что разработанная нами ПЦР позволит провести идентификацию гена *npt* устойчивости к канамицину, имеющего разное происхождение.

Таким образом, разработаны ПЦР, выявляющие гены устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) и канамицину (*npt*), у штаммов возбудителя чумы. Созданные ПЦР могут найти свое применение при проведении мониторинга антибиотикоустойчивых штаммов возбудителя чумы. В дальнейшем предстоит расширить круг выявляемых генов антибиотикоустойчивости, что необходимо для быстрой идентификации резистентных штаммов *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
2. Becker T.M., Poland J.D., Quan T.J. et al. Plague meningitis a retrospective analysis of cases reported in the United States, 1970–1979. West. J. Med. 1987; 147:554–7.
3. Chanteau S., Retsitorahina M., Rahalison et al. Current epidemiology of human plague in Madagascar. Microbes Infect. 2000; 2:25–31.
4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferrable plasmid. N.

Engl. J. Med. 1997; 337:677–80.

5. Galimamnd M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 2006; 50(10):3233–6.

6. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C. et al. Transferable plasmid-mediated streptomycin resistance in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7(1):43–8.

7. Hernandez E., Giradet M., Ramissie F. et al. Antibiotic susceptibilities of *Yersinia pestis* to 24 antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52:1029–31.

8. Hinnebusch B.J., Rosso M.-L., Schwan J.L., Carniel E. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. Mol. Microbiol. 2002; 2:349–54.

9. McCrumb F.R., Mercurier S., Robic J. et al. Chloramphenicol and terramycin in the treatment of pneumonic plague. Am. J. Med. 1953; 14:284–93.

10. Navais E. Problems associated with potential massive use of antimicrobial agents as prophylaxis or therapy of a bioterrorist attack. Clin. Microbiol. Infect. 2002; 8:534–9.

11. Pan J.-C., Ye R., Wang H.-Q. et al. *Vibrio cholerae* O139 multi-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. Antimicrob. Agents. Chemother. 2008; 52(11):3829–36.

12. Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and control. WHO/CSR/EDC/99.2 [cited 2010 Oct 14]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/plague/WHO_CDS_CSR_EDC_99_2_EN

13. Pollitzer R. Plague (WHO monograph series no. 22). Geneva: World Health Organization; 1954. 698 p.

14. Smith M.D., Vinh D.X., Hoa N.T.T. et al. In vitro antimicrobial susceptibilities of strains of *Yersinia pestis*. Antimicrob. Agent. Chemother. 1995; 39:2553–4.

15. Weich T.J., Fricke W.F., McDermott P.F. et al. Multiple Antimicrobial Resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS ONE. 2007; 3:e309.

16. Wong J.D., Barash J.D., Sandfort R.F. et al. Susceptibilities of *Yersinia pestis* strains to 12 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44(7):1995–6.

G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, L.V.Anisimova, N.Yu.Shavina, N.A.Vinogradova, V.V.Kutyrev

Antibiotic-Resistant Strains of Plague Agent and Development of Procedure for Their Detection by PCR Method

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

The data of antibiotic-resistant strains of *Yersinia pestis* isolated from clinical sources and animals are shown in the present study. Highlighted are the reasons of their resistance to different drugs. Represented are two PCRs developed for detection of antibiotic resistance genes, their efficiency has been confirmed using collection of antibiotic-resistant strains of *Y. pestis*.

Key words: plague agent, antibiotic resistance, genes, detection, polymerase chain reaction.

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

1. Maniatis N., Fritsch E., Sambrook D. [Genetic Engineering Techniques. Molecular Cloning]. Moscow: Mir; 1984. 479 p.

Authors:

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 07.12.10.

А.В.Осин, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, Н.И.Смирнова

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА MLST-ТИПИРОВАНИЯ ПАНДЕМИЧЕСКИХ И ПРЕДПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведено молекулярное типирование пандемических и предпандемических штаммов холерного вибриона методом мультилокусного секвенирования. Применение двух схем MLST, основанных на сиквенсе генов, связанных с вирулентностью, и генов жизнеобеспечения, показало большую эффективность последней в дифференциации штаммов, выделенных до начала и в период 7-й пандемии холеры.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, мультилокусное секвенирование, гены вирулентности, гены жизнеобеспечения.

Холера – тяжелое инфекционное диарейное заболевание, возбудителями которой являются штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Холерные вибрионы O1 серогруппы представлены двумя биоварами – классическим и эльтор. Вибрионы классического биовара являлись возбудителями пятой и шестой пандемий азиатской холеры, последняя из которых закончилась в 1923 г. Штаммы *V. cholerae* биовара эльтор, впервые выделенные на карантинной станции Эль Тор в 1905 г., не вызывали заболевание холерой, а являлись причиной спорадических диарейных расстройств кишечника. Первая крупная вспышка холеры, вызванная эльтор вибрионами, была зарегистрирована в 1937 г. на о. Целебес, однако за пределы острова болезнь распространения не получила. Формирование нового клона возбудителя холеры *V. cholerae eltor* завершилось к 1961 г. за которым последовало начало 7-й пандемии холеры, продолжающейся и по настоящее время.

Способность к пандемическому распространению штаммов *V. cholerae eltor*, выделяемых от больных после 1961 г., связывают с наличием у них в геноме двух кластеров генов VSP-1 и VSP-2, называемых «островами» пандемичности и отсутствующих как у предпандемических штаммов эльтор вибрионов, так и у *V. cholerae* классического биовара [3]. Происхождение современных эльтор вибрионов до сих пор остается неясным так же, как и неясна их филогенетическая связь с предпандемическими изолятами. Проблемы, связанные с процессами образования штаммов с новыми свойствами, стоят в последнее время особенно остро, что вызвано, в первую очередь, выделением изолятов *V. cholerae eltor* с отличной от основного клона возбудителя 7-й пандемии структурой некоторых генов, связанных с вирулентностью, а также появлением вибрионов, сходных по строению генома с предпандемическими штаммами биовара эльтор [2, 5]. В сложившейся ситуации изучение изменений в геноме возбудителя холеры, происходящих в процессе эволюции, с использованием современных технологий, является одним из самых актуальных направлений в исследованиях этого патогена. Одним из основных методов

изучения генома является секвенирование фрагментов генов и анализ полученных данных в специализированных компьютерных программах. Кроме того, совокупное сравнение нуклеотидных последовательностей 6–7 локусов у разных штаммов – мультилокусное секвенирование (MLST), позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью определять степень их филогенетического родства. Для целого ряда микроорганизмов существуют разработанные схемы MLST-анализа, результаты которых можно найти в сети Internet и сопоставить их с данными собственных исследований [6]. Однако для *V. cholerae* таких схем пока не создано, что, несомненно, затрудняет проведение научных экспериментов с этим возбудителем.

Цель работы – подбор генов-мишеней для проведения MLST-анализа пандемических и предпандемических штаммов *V. cholerae* биовара эльтор и определения их филогенетического родства.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовано 11 штаммов *V. cholerae* биовара эльтор и один штамм классического биовара, которые хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Все изученные штаммы были выделены от больных, их характеристика представлена в табл. 1. Сведения о содержании в геноме этих изолятов генов вирулентности, пандемичности и персистенции были опубликованы нами ранее [1]. Культивирование штаммов проводили на LB-агаре (pH 7,2) в течение 18 ч при 37 °C.

Полимеразная цепная реакция и ДНК секвенирование. Олигонуклеотидные праймеры на 7 генов, имеющих непосредственное отношение к вирулентности возбудителя холеры (*ctxA*, *tcpA*, *toxR*, *toxT*, *IS1358*, *gmd*, *manB*), были рассчитаны нами в ходе выполнения работы, кроме того использовали праймеры на гены жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*) [4]. Праймеры синтезировали в НПФ «Литех» (Россия) на автоматическом синтезаторе ДНК «АСМ-102U». ПЦР проводили в микро-

Таблица 1

Штаммы *Vibrio cholerae*, использованные в работе

Штамм	Биовар	Год выделения	Место выделения
ATCC14033	Эльтор	1910	Египет
Mak97	Эльтор	1937	Индонезия
Mak676	Эльтор	1937	Индонезия
Celebes 30	Эльтор	1937	Индонезия
Mak757	Эльтор	1937	Индонезия
Dakka33	Классический	1958	Пакистан
T-4	Эльтор	1963	Индия
M818	Эльтор	1970	Россия
2223	Эльтор	1972	Туркмения
M1328	Эльтор	1998	Россия
M1429	Эльтор	2004	Россия
M1430	Эльтор	2005	Россия

пробирках объемом 600 мкл в следующих условиях: предварительная денатурация 94 °C – 2 мин, затем (денатурация при 94 °C – 45 с, отжиг праймеров при 57 °C – 45 с, элонгация 72 °C – 45 с) 35 циклов, заключительный этап (отжиг праймеров при 57 °C – 45 с, элонгация 72 °C – 3 мин) 5 циклов на амплификаторе PTC-0150 MiniCycler (MJ Research, Incorporated, USA). Секвенирование ДНК проводили по методу [9].

Обработка результатов. Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму CLUSTALW в программе MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) версия 4.0 [8], кластерный анализ нуклеотидных последовательностей – в программе START (ST analysis and recombination tests). Дендрограмму, показывающую связь между типами последовательностей (ST), строили по методу UPGMA (от англ. unweighted pair-group method for arithmetic averages). Кроме того, в программе START определено соотно-

шение несинонимичных нуклеотидных замен к синонимичным (d_N/d_S) [7].

Результаты и обсуждение

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов связанных с вирулентностью. На первом этапе нашей работы в качестве мишеней для секвенса были выбраны фрагменты 7 локусов, связанных с вирулентностью: *ctxA* – отвечающий за синтез А субъединицы холерного токсина (СТ); *tcpA* – кодирующий продукцию основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии (TCP), главного фактора колонизации холерных вибрионов; *toxR* и *toxT* – двух регуляторных генов, координирующих синтез СТ и TCP, а также трех локусов *manB*, *gmd* и инсерционной последовательности IS1358, входящих в состав кластера генов O1 антигена. В результате анализа полученных данных установлена высокая консервативность нуклеотидной последовательности локусов *ctxA*, IS1358, *manB* и *gmd*, у всех штаммов она представлена одним аллелем (табл. 2).

Другие изучаемые гены были более вариабельны: регуляторный ген *toxT* обладал двумя аллелями, глобальный ген-регулятор *toxR* – тремя, а *tcpA* – пятью. Использование алгоритма UPGMA на основе полученного аллельного профиля позволило выявить шесть филогенетических групп изучаемых штаммов. В первую вошли 7 штаммов эльтор вибрионов, включая предпандемические и пандемические изоляты (рис. 1, А). Проведенный анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов этих штаммов выявил их полную идентичность.

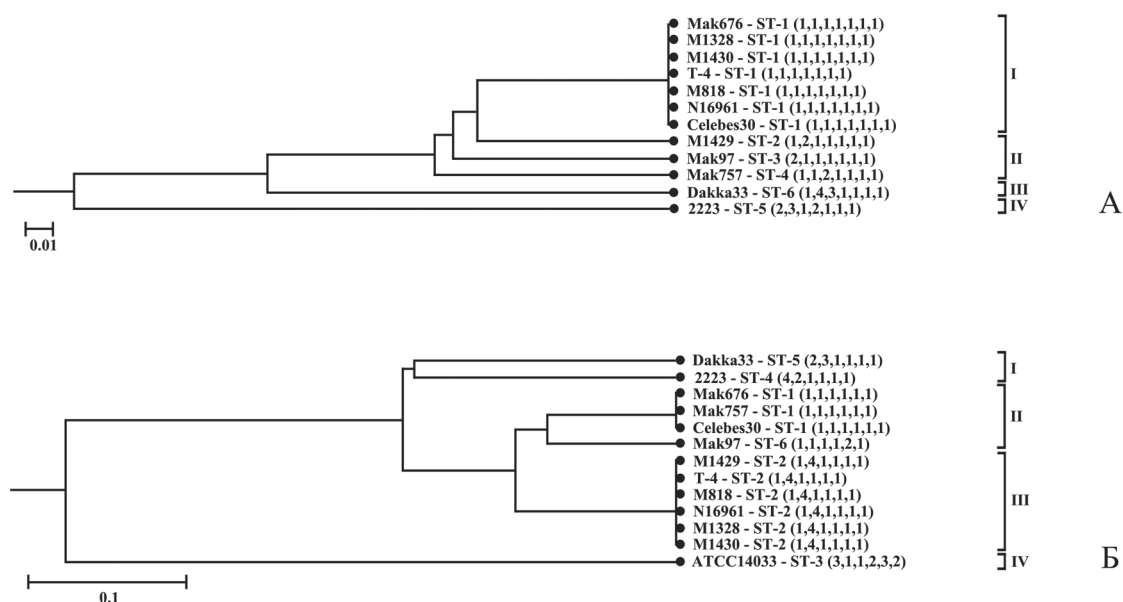
Вторая группа представлена 3 штаммами биовара эльтор, один из которых является пандемическим, а два других – предпандемическими. Эти изоляты отличаются друг от друга не более чем по одному локусу и при проведении кластерного анализа оказались

Таблица 2

Характеристика локусов секвенированных последовательностей

Локус	Размер анализируемого фрагмента, п.н.	Число аллелей	Число полиморфных нуклеотидов	Среднее содержание G+C пар, %	d_N/d_S *
ctxA	699	1	0	40,5	0,0000
tcpA	654	5	210	42,7	0,1172
toxR	799	3	14	45,9	4,0313
toxT	756	2	7	28,3	0,1063
IS1358	1297	1	0	41,9	0,0000
gmd	1072	1	0	39,9	0,0000
manB	1464	1	0	38,5	0,0000
cat	512	4	8	52,8	0,0000
chi	370	4	4	50,7	0,0000
dnaE	551	1	0	49,7	0,0000
gyrB	575	2	15	50,6	0,0000
recA	714	2	23	48,1	0,0000
pgm	732	3	10	49,4	0,0000

* Показатель соотношения не синонимичных и синонимичных нуклеотидных замен в секвенированных последовательностях.



Дендрограммы результатов MLST, построенные по алгоритму UPGMA:

А – схема MLST с использованием набора генов, связанных с вирулентностью (*ctxA*, *tcpA*, *toxR*, *toxT*, *manB*, *gmd*, *IS1358*);Б – схема MLST с использованием набора генов жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*)

близко расположены на филогенетическом дереве, что дает нам основание объединить их в одну группу. Наличие ряда варибельных нуклеотидов в секвенированных последовательностях штаммов, относящихся ко второй группе, в частности в генах *tcpA* и *toxR*, может отражать особенности генетической организации отдельных изолятов, поскольку филогенетическая удаленность их друг от друга крайне незначительна.

Третья группа была представлена лишь одним штаммом – *V. cholerae* 2223 биовара эльтор. Структура гена *tcpA* у этого штамма заметно отличалась от таковой у других изолятов эльтор (145 полиморфных нуклеотидов) и имела значительное сходство с геном *tcpA* классических холерных вибрионов (55 идентичных нуклеотидов).

В четвертую группу входил штамм *V. cholerae* классического биовара. Таким образом, при использовании в качестве мишеней для MLST-типирования генов, связанных с вирулентностью, не удалось выявить различия в происхождении пандемических и предпандемических штаммов холерного вибриона биовара эльтор. Данный алгоритм исследования позволил установить лишь удаленное родство *V. cholerae* классического и эльтор биоваров, а также обнаружить локус *tcpA* у вибрионов эльтор, имеющий аллель, сочетающий в себе особенности нуклеотидной структуры этого гена обоих биоваров.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов жизнеобеспечения. Для дальнейшей работы было выбрано шесть генов жизнеобеспечения (*housekeeping*), расположенных в эволюционно более древних участках хромосомы и кодирующих соответственно: *cat* – каталазу, *chi* – хитиназу, *dnaE* – ДНК полимеразу, *gyrB* – гиразу, *pgm* – фосфоглюко-

мутазу и *recA* – рекомбиназу А. Сравнение выровненных последовательностей показало отсутствие варибельных нуклеотидов лишь в гене *dnaE*. В то же время локусы *gyrB* и *recA* содержали по два аллеля, *pgm* – три, а *cat* и *chi* – четыре (табл. 2). Наиболее информативным при монолокусном анализе оказалось использование фрагмента гена хитиназы *chi*. Штаммы, выделенные до начала 7-й пандемии, входили по этим данным в одну группу и отличались от пандемических изолятов наличием 4 варибельных нуклеотидов, расположенных в разных участках секвенированной последовательности. Другая группа объединила в себе все пандемические штаммы, за исключением *V. cholerae* 2223, аллель которого обладал высокой степенью сходства с таковым у штамма классического биовара Dakka33 и был отнесен, вместе с последним, в общую группу. По результатам мультилокусного секвенирования с использованием алгоритма UPGMA, следует отметить наиболее выраженную варибельность генов *cat*, *gyrB*, *pgm*, *recA* у авирулентного предпандемического штамма ATCC14033, что указывает на его эволюционную удаленность от всех взятых в исследование изолятов обоих биоваров. *V. cholerae* Dakka33 классического биовара и пандемический штамм 2223 биовара эльтор так же, как и при анализе генов вирулентности, оказались филогенетически близки, что может свидетельствовать о возможности существования промежуточных вариантов между холерными вибрионами обоих биоваров. И, наконец, две большие группы сформировали предпандемические вирулентные изоляты с о. Целебес и пандемические штаммы. Анализ полученных данных показал, что они эволюционно очень близки и имели, вероятно, одного общего предка, однако выявленные различия не позволяют

говорить о клональности их происхождения.

Проведенный статистический анализ с использованием расчета коэффициента соотношения несинонимичных нуклеотидных замен к синонимичным (d_N/d_S) позволил установить, что единственным локусом, вариабельность которого привела к изменению аминокислотного состава кодируемого им белка, является ген *toxR* у штамма Mak757, поскольку его расчетное соотношение d_N/d_S превысило единицу и равнялось четырем. Остальные локусы несмотря на наличие в них вариабельных нуклеотидов, по всей видимости, не оказывали влияния на структуру кодируемых ими белков.

Установлено, что в качестве мишеней для мультилокусного секвенирования с целью изучения эволюционных связей штаммов *V. cholerae* различного происхождения наиболее перспективными являются гены жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*). Проведено типирование пандемических и предпандемических штаммов холерных вибрионов биовара эльтор и определена степень их филогенетического родства. Подтверждена эффективность предлагаемого алгоритма MLST-типирования для выяснения эволюционных связей *V. cholerae* различного происхождения и выявления патогенных клонов с новыми свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Н.И., Нefeldов К.С., Осин А.В., Ливанова Л.Ф., Краснов Я.М. Изучение распространенности регуляторных генов, контролирующих экспрессию генов вирулентности, среди штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор с разным пандемическим потенциалом. Мол. генет. 2007; 1:15–22.
2. Balakrish Nair, Ashrafus Safa, Bhuiyan N. A., Suraia Nusrin, Denise Murphy, Carolyn Nicol et al. Isolation of *Vibrio cholerae* O1 strains similar to pre-seventh pandemic El Tor strains during an outbreak of gastrointestinal disease in an island resort in Fiji. J. Med. Microbiol. 2006; 55:1559–62.
3. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(3):1556–61.
4. Garg P., Aydanian A., Smith D., Morris J.G., Balakrish Nair

G., Stine O.C. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. Emer. Infect. Diseases. 2003; 9(7):810–4.

5. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S. et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIR5101 and comparative genomics with *V. cholerae*. J. Bacteriol. 2010; 192(13):3524–33.

6. MLST-Home: Multi Locus Sequence Typing [Internet]. Available from: <http://www.mlst.net> [cited 17 Jun 2010].

7. Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., Maiden M.C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics. 2001; 17:1230–1.

8. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004; 5:150–63.

9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.

A.V.Ossin, Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, N.I.Smirnova

Elaboration of the Algorithm of MLST-Typing of Pandemic and Pre-Pandemic *V. cholerae* El Tor strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Molecular typing of pandemic and pre-pandemic cholera vibrio strains was carried out with the help of multi-locus sequence analysis. Application of two MLST schemes based on the sequence of virulence-associated and house-keeping genes demonstrated the last one to be the most effective in differentiation of strains, isolated before and during the seventh cholera pandemic.

Key words: *Vibrio cholerae*, multi-locus sequence typing, virulence genes, housekeeping genes.

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

1. Smirnova N.I., Nefeldov K.S., Osin A.V., Livanova L.F., Krasnov Ia.M. [A Study of the Prevalence of Regulatory Genes Controlling Virulence Gene Expression among *Vibrio cholerae* Eltor Strains Varying in Their Pandemic Potential]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2007; 1:15–22.

Authors:

Ossin A.V., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Осин А.В., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 10.11.10.

А.В.Топорков, А.И.Кологоров, В.П.Топорков, С.А.Щербакова, И.Г.Карнаухов, Е.С.Казакова, И.Н.Шарова, Н.А.Осина, В.В.Кутырев

**ПРИНЦИПЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ОСОБО ОПАСНЫХ, НОВЫХ И ВОЗВРАЩАЮЩИХСЯ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Предложен и обоснован единый алгоритм диагностики опасных инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, с использованием стандартов клинической, эпидемиологической и лабораторной диагностики, в основе которых лежат критерии определения подозрительного, вероятного и подтвержденного случаев болезни с учетом клинических проявлений, эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований. Выделены и описаны два этапа диагностики новых инфекционных болезней, представляющих собой чрезвычайную ситуацию в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Ключевые слова: эпидемиологическая и лабораторная диагностика, санитарная охрана, инфекционные болезни, санитарно-эпидемиологическое благополучие.

Перечень инфекционных (паразитарных) болезней (далее – болезни), требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации определяется Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) [7] и санитарно-эпидемиологическими правилами «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями) [16] и включает 16 нозологических форм.

Санитарные правила «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств» [17] регламентируют проведение мероприятий по санитарной охране территории в отношении 23 болезней. Положение о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) в рамках Таможенного союза [16] предписывает проведение мероприятий по санитарной охране территории в отношении 24 болезней.

Проведения мероприятий по санитарной охране территории могут потребовать и вновь возникающие опасные инфекционные болезни, представляющие собой чрезвычайную ситуацию в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Эпидемиологический надзор за инфекционными болезнями предусматривает своевременное выявление заносных и подозрительных случаев болезни и проведение их эпидемиологической и лабораторной диагностики.

Выявление больных с симптомами, подозрительными на болезнь, осуществляется на транспортных средствах, прибывающих из эндемичных стран, в пунктах пропуска через границу (СКП, СКО), а также на всех этапах оказания медицинской помощи лицам, прибывшим из зарубежных стран, и на энде-

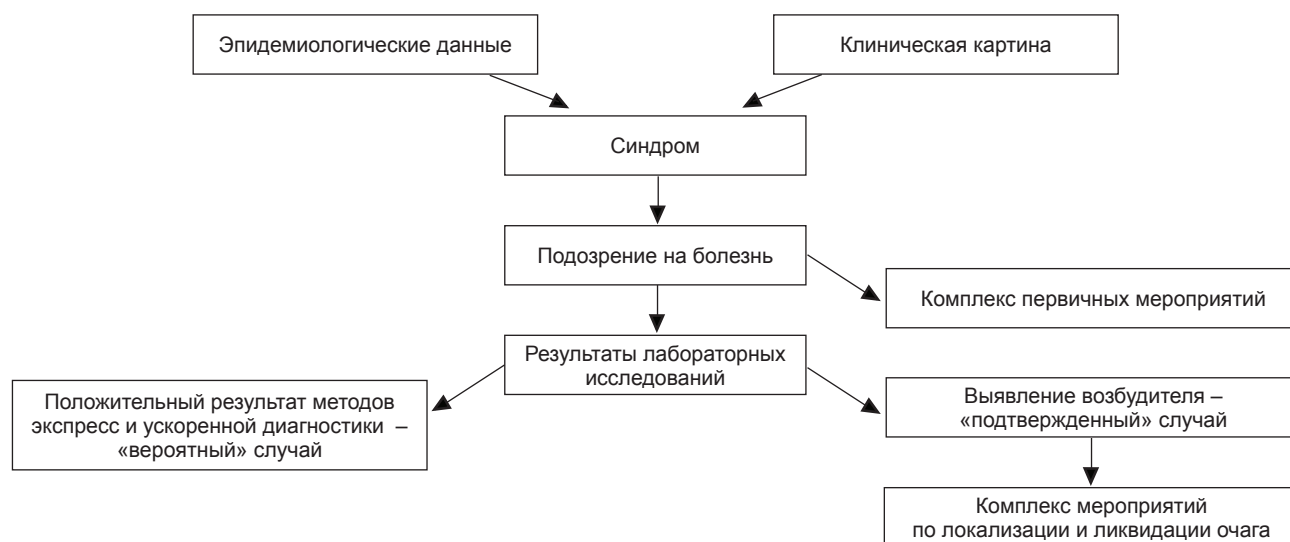
мичных территориях Российской Федерации.

Эпидемиологическая и лабораторная диагностика отдельных болезней, с учетом рекомендаций ВОЗ и практического опыта специалистов противочумных учреждений, должна осуществляться в соответствии с единым алгоритмом диагностики (рисунок) и с использованием стандартов клинической, эпидемиологической и лабораторной диагностики, в основе которых лежат критерии определения подозрительного, вероятного и подтвержденного случаев болезни с учетом клинических проявлений, эпидемиологического анамнеза и результатов лабораторных исследований.

Стандарты клинической и эпидемиологической диагностики должны содержать наиболее характерные, значимые клинические и эпидемиологические признаки болезни и включать известные факторы риска (территория, время, контингент и т.д.). При этом важнейшее значение имеет клинко-эпидемиологическая диагностика, позволяющая установить «подозрительный случай» болезни и избежать проведения избыточного числа лабораторных исследований, снизить затраты при проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий.

Врач, выявивший больного или подозрительно-го на болезнь, собирает эпидемиологический анамнез и проводит клиническое обследование с целью получения объективных данных, определяющих основные клинические признаки и наличие одного из синдромов (острой диареи, острой геморрагической лихорадки, острый желтушный, острый неврологический, острый респираторный, острый дерматологический, острый системный).

При сборе анамнестических данных уточняется нахождение больного на эндемичной территории в пределах инкубационного периода, наличие контак-



Алгоритм эпидемиологической и лабораторной диагностики опасных инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории

та с больным, страдающим аналогичным заболеванием, или контакта с заразным материалом, подвергался ли больной нападению комаров, вшей, блох, клещей и другим рискам инфицирования, относится ли он к контингентам риска. Составляется список лиц, контактировавших с больным в период заболевания. Если полученные данные не исключают возможность инфицирования, ставится эпидемиологический диагноз «подозрение на болезнь». Больной подлежит немедленной госпитализации в инфекционный стационар.

Сопоставление полученного анамнеза, объективных данных клинического обследования, проведенного врачом у постели больного, со стандартным описанием клинических проявлений, позволяет поставить предварительный клинический диагноз (подозрительный случай) болезни. В стационаре производят забор клинического материала для лабораторного исследования и направляют его в соответствующую лабораторию. Немедленно передается информация о случившемся в учреждения здравоохранения и в органы и учреждения Роспотребнадзора по схеме, предусмотренной в действующих нормативных документах. Осуществляется комплекс первичных противоэпидемических мероприятий.

Лабораторные исследования материала проводят в учреждениях, имеющих разрешения на работу с возбудителями I–II групп патогенности (опасности) в соответствии с действующими санитарными правилами, нормативными и методическими документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики болезней.

При получении положительных результатов лабораторных исследований в одном или нескольких лабораторных тестах ставится диагноз «Вероятный случай заболевания». При получении положительного результата бактериологического (вирусологического) анализа – выделение возбудителя из клинического материала и его идентификации и/или в случае

выявления в крови больного специфических антител (IgM в диагностическом титре и/или сероконверсии IgG) выдается ответ – «Подтвержденный случай заболевания». При подтвержденных эндемичных случаях заболеваний чумой, сибирской язвой, туляремией, бруцеллезом, лихорадкой Западного Нила, КГЛ собирается дополнительная информация по результатам предэпидемической диагностики (об экологической, эпизоотологической и эпидемиологической ситуации на территории).

Наибольшую сложность представляет эпидемиологическая и лабораторная диагностика новых инфекционных болезней. За последние 50 лет на нашей планете выявлено более пятидесяти новых инфекционных болезней [6, 19]. Анализ методических приемов, применявшихся при изучении клиники и эпидемиологии таких инфекционных болезней, как болезнь легионеров, лихорадка Ласса, атипичная пневмония (ТОРС) и пандемический грипп H1N1 [3, 4, 5, 8, 9–15, 18, 21–27] показывает, что независимо от экологии источника возбудителя инфекции (антропонозы, зоонозы, сапронозы) изучение клиники и эпидемиологии вновь возникающих инфекций проводилось стандартными методами, описанными ведущими специалистами в области эпидемиологии [1].

Процесс диагностики новых инфекционных болезней включает два этапа.

Задачами первого этапа исследования являются:

- определение генеза вспышки (местная или заносная);
- детальное описание клинических признаков новой инфекционной болезни;
- выделение одного или нескольких синдромов, наиболее характерных для данного заболевания;
- определение стандартного клинического и подозрительного случаев болезни [20];
- установление предположительного источника возбудителя инфекции;
- установление предположительного пути и фак-

торов передачи возбудителя инфекции;

- лабораторное исследование клинического материала;

- банк клинического материала (сыворотки крови больных);

- определение комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Определение стандартного клинического случая болезни является очень важным, так как на основании клинических данных будут выявлять и регистрировать всех заболевших в период эпидемии новой инфекционной болезни.

Важное эпидемиологическое значение имеет установленный синдром заболевания, так как он определяет локализацию возбудителя в организме и вероятный механизм передачи возбудителя [2].

При локализации возбудителя в дыхательных путях вероятен воздушно-капельный и воздушно-пылевой путь передачи; в пищеварительном тракте – водный, пищевой и бытовой; в кровеносной системе – инокуляционный и контаминационный; на наружных покровах – инфекция может передаваться путем прямого контакта, бытовым и трансмиссивным способом.

Большое значение имеют данные эпидемиологического анамнеза: заболевание местное или заносное; продолжительность минимального и максимального инкубационного периода; контакты с выявленными больными; контакты с животными и продуктами животного происхождения; источники пищевых продуктов и водопользования; контакты с переносчиками инфекции и их резервуарами [1].

На основании полученных клинических и эпидемиологических данных оценивается масштаб эпидемии и выдвигается гипотеза о генезе эпидемии (местная, завозная), о вероятном источнике возбудителя инфекции, контагиозности инфекции, вероятных путях передачи возбудителя инфекции, контингентах риска и определяется комплекс необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Второй этап диагностики эпидемии инфекционной болезни неизвестной этиологии предусматривает дальнейшее изучение клинических проявлений заболевания и детальное изучение возникшего эпидемического процесса:

- изучение основных эпидемиологических закономерностей возникшего эпидемического процесса;

- статистическое подтверждение выдвинутых гипотез об источнике и предполагаемых путях и факторах передачи возбудителя инфекции;

- оценку эффективности проводимых профилактических и противоэпидемических мероприятий и их корректировку в соответствии с полученными результатами;

- определение влияния санитарно-гигиенических, ландшафтно-географических, климатических, социальных факторов на интенсивность и динамику эпидемического процесса;

- разработку методов лабораторной диагностики;

- прогноз дальнейшего развития событий.

Анализ этих данных позволяет установить вероятную причину возникшей эпидемии, масштаб эпидемического неблагополучия, изучить динамику эпидемического процесса, определить контингенты риска.

Результаты оперативного анализа вспышки и статистическая обработка полученных данных об уровне заболеваемости, ее динамике, территориальном распределении, характере очаговости, эпидемической значимости больных отдельными клиническими формами, основных факторах передачи возбудителя инфекции, заболеваемости отдельных возрастных, профессиональных и социальных групп населения являются фактологической основой для объективного подтверждения или опровержения ранее выдвинутых гипотез о генезе вспышки, источнике возбудителя инфекции и предполагаемых путях его передачи.

Наряду с изучением количественных характеристик возникшего эпидемического процесса уточняется влияние санитарно-гигиенических условий, ландшафтно-географической характеристики территории и климатических факторов на течение эпидемического процесса.

На основании полученных результатов даются рекомендации по проведению дальнейших противоэпидемических и профилактических мероприятий, прогноз дальнейших событий. Предлагаемые подходы позволяют стандартизировать выработку решений при диагностике особо опасных, новых и возвращающихся инфекционных болезней и при проведении эпидемиологического расследования обеспечить проведение адекватных противоэпидемических, профилактических мероприятий, лабораторной диагностики в соответствии со стандартами и уровнем организации лабораторной базы в рамках функционирования единой национальной системы лабораторной диагностики.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брес П. Действия служб общественного здравоохранения в чрезвычайных ситуациях, вызванных эпидемиями. Практическое руководство. Женева: ВОЗ; 1990. 293 с.
2. Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М.: Медицина; 1965. 290 с.
3. Дроздов С.Г., Сергиев В.Г. Защита неэндемичных территорий от тропических вирусных геморрагических лихорадок. М.: Медицина; 1984. 286 с.
4. Жданов В.М., Львов Д.К. Эволюция возбудителей инфекционных болезней. М.: Медицина; 1984. 272 с.
5. Киселев О.И., Маринич И.Г., Соминина А.А., редакторы. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. СПб.; 2003. 244 с.
6. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология. М.: Медицинское информационное агентство; 2008. 656 с.
7. Международные медико-санитарные правила. Женева: ВОЗ; 2005. 73 с.
8. Монат Т. Лихорадка Ласса: эпидемиология и эпизоотология. Бюл. ВОЗ; 1976; 52(4):567–83.

9. Онищенко Г.Г., Лазикова Г.Ф., Чистякова Г.Г. и др. Эпидемиологическая характеристика вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 2:82–5.
10. Онищенко Г.Г., Тартаковский И.С., Лазикова Г.Ф. и др. Эпидемиологическое обследование очагов внебольничной пневмонии легионеллезной этиологии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 2:10–2.
11. Онищенко Г.Г., Лазикова Г.Ф., Чистякова Г.Г. и др. Эпидемиологические версии расследования вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 2:77–82.
12. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Топорков В.П. и др. Атипичная пневмония (SARS, ТОРС) и санитарная охрана территорий. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:3–19.
13. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. Второе издание. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2007. 816 с.
14. Прозоровский С.В., Покровский В.И., Тартаковский И.С. Болезнь легионеров (легионеллез). М.: Медицина; 1984. 208 с.
15. Россия в ожидании гриппа. Интерфакс от 08.09.2010 г. <http://www.interfax.ru/society/txt.asp?id=153653> (дата обращения: 08.09.2010).
16. Санитарно-эпидемиологические правила «Санитарная охрана территории Российской Федерации» СП 3.4.2318-08. Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2008; 2:37–68.
17. Санитарные правила «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств» (утверждены Решением Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ от 3 июня 2005 г.). http://www.microbe.ru/files/SP_san_ohrana_territ.pdf (дата обращения: 24.11.2010).
18. Смородинцев А.А., Коровин А.А. Грипп. М.: Медгиз; 1961. 372 с.
19. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: Медицина; 2001. 560 с.
20. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина; 2007. 480 с.
21. Frame J.D., Gocse D.J., Baldwin J.M., Troup J.M. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological features. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1970; 19:670–6.
22. Coronavirus never before seen in humans is the cause SARS. 2003. Сайт ВОЗ: <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr31/en/print.html>.
23. Lassa fever. WHO Newsletter. Geneva; 2005.
24. Lee N., Hui D., Wu A., et al. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. N. Engl. J. Med. 2003; 15: 1986–94.
25. Maunier R., Hunter J., Vincent L. et al. The immediate psychological and occupational impact of the 2003 SARS outbreak in a teaching hospital. CMAJ. 2003; 168(10):1245–51.
26. McDade J.E., Brenneis D.J., Boreman F.M. Legionnaires disease isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N. Engl. J. Med. 1977; 297:1197–203.
27. Monat T.L., Newhouse V.F., Kemp Y.E., et al. Lassa virus isolation from Mastomys Natalensis rodents during an epidemic in Sierra Leone. Science. 1974; 185:263–5.

A.V.Toporkov, A.I.Kologorov, V.P.Toporkov, S.A.Shcherbakova,
I.G.Karnaukhov, E.S.Kazakova, I.N.Sharova, N.A.Osina, V.V.Kutyrev

Principles of Standardization of Epidemiological and Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous, Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Suggested and substantiated is the integrated algorithm for diagnostics of dangerous infectious diseases that require measures on sanitary protection of territories using clinical, epidemiological and laboratory diagnostic standards. These standards are based on criteria for detection of suspected,

probable and confirmed cases, with consideration for clinical manifestations, epidemiological anamnesis and laboratory analysis results. Distinguished and described are two stages for diagnosis of new infectious diseases that represent an emergency in the sphere of sanitary and epidemiological well-being of the population.

Key words: epidemiological and laboratory diagnostics, sanitary protection, infectious diseases, sanitary and epidemiological well-being.

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

1. Bres P. [Public Health Services Activities in Response to Emergencies Caused by Diseases]. Practical Handbook, Geneva: WHO; 1990. 293 p.
2. Gromashevskii L.V. [General Epidemiology]. Moscow: Meditsina; 1965. 290 p.
3. Drozdov S.G., Sergiev V.G. [Protection of Non-Endemic Areas from Tropical Hemorrhagic Fevers]. Moscow: Meditsina; 1984. 286 p.
4. Zhdanov Y.M., L'vov D.K. [Evolution of Causative Agents of Infectious Diseases]. Moscow: Meditsina; 1984. 272 p.
5. Kiselev O.I., Marinich I.G., Somina A.A., editors. [Flue and Other Respiratory Viral Infections: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics and Therapy]. St. Petersburg; 2003. 244 p.
6. L'vov D.K., editor. [Medical virology]. Moscow: Med. Inform. Agen.; 2008. 656 p.
7. [International Health Regulations]. Geneva: WHO; 2005. 73 p.
8. Monat T. [Lassa Fever: Epidemiology and Epizootology]. Bull. WHO. 1976; 52(4):567–83.
9. Onishchenko G.G., Lazikova G.F., Chistyakova G.G. et al. [Epidemiologic Characteristics of Legionnaires' Disease Outbreak in the Town of Verkhnyaya Pyshma]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 2:82–5.
10. Onishchenko G.G., Tartakovskii I.S., Lazikova G.F. et al. [Epidemiologic Examination of Foci of Community-Acquired Pneumonia Caused by Legionella] Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 2:10–2.
11. Onishchenko G.G., Lazikova G. F., Chistyakova G. G. et al. [Epidemiologic Versions in Investigation of Legionnaires' Disease Outbreak in the Town of Verkhnyaya Pyshma]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 2:77–82.
12. Onishchenko G.G., Feodorov Yu.M., Toporkov V.P. et al. [Atypical Pneumonia (SARS) and Sanitary Protection of the Territories]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; 85:3–19.
13. Pokrovskii V.I., Pak S.G., Briko N. I., Danilkin B.K. [Infectious Diseases and Epidemiology]. Second Ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. 816 p.
14. Prozorovskii S.V., Pokrovskii V.I., Tartakovskii I.S. [Legionnaires' Disease]. Moscow: Medicina; 1984. 208 p.
15. [Russia in Anticipation of Influenza]. Interfax [Internet]. 08 Sept 2010 [cited 08 Sept 2010]. Available from: <http://www.interfax.ru/society/txt.asp?id=153653>
16. [Sanitary and Epidemiological Regulations "Sanitary Protection of the Russian Federation Territory" SP 3.4.2318-08]. Bul. Norm. Metod. Dok. Gossanepidnadzora. 2008; 2:37–68.
17. [Sanitary Regulations: Sanitary Protection of the Territories of the Commonwealth of Independent States State-Parties]. 3 Jun 2005 [cited 24 Nov 2010]. Available from: http://www.microbe.ru/files/SP_san_ohrana_territ.pdf
18. Smorodintsev A.A., Korovin A.A. [Gripp]. Moscow: Medgiz; 1961, 372 p.
19. Cherkaskii B.L. [The Handbook of General Epidemiology]. Moscow: Meditsina; 2001. 560 p.
20. Cherkaskii B.L. [Risk in Epidemiology]. Moscow: Prakticheskaya Meditsina; 2007. 480 p.

Authors:

Toporkov A.V., Kologorov A.I., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A.,
Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Sharova I.N., Osina N.A., Kutyrev V.V.
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46,
Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Топорков А.В., Кологоров А.И., Топорков В.П., Щербакова С.А.,
Карнаухова И.Г., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Осина Н.А.,
Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46.
E-mail: microbe@san.ru

Поступила 18.10.10.

Н.П.Храпова, В.В.Алексеев, И.И.Корсакова, Н.М.Дрефс, Л.В.Ломова,
Т.В.Булатова, Г.М.Напалкова

ПРИМЕНЕНИЕ САПНЫХ И МЕЛИОИДОЗНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ РАЗЛИЧНОЙ ЭПИТОПНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Обобщены современные подходы к выбору методов и средств обнаружения патогенных буркхольдерий и данные литературы и собственных исследований по вопросу разработки моноклональных средств быстрой идентификации представителей рода *Burkholderia*. Обсуждены перспективы совершенствования моноклональных препаратов и тест-систем для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза в различных объектах исследования, а также дифференциации видов буркхольдерий и внутривидового типирования штаммов возбудителя мелиоидоза.

Ключевые слова: возбудители сапа, мелиоидоза, моноклональные антитела, обнаружение, идентификация патогенных буркхольдерий.

Современные подходы к разработке и совершенствованию иммунодиагностических средств индикации патогенов базируются на широком использовании моноклональных антител заданной специфичности (МКА).

Эти уникальные ингредиенты иммунодиагностических тестов позволяют идентифицировать сайты связывания и уточнять химическую структуру антигенных детерминант, изучать биологические функции ряда антигенов – потенциальных компонентов химических вакцинных препаратов, оценивать роль этих биополимеров в патогенезе инфекции, служат основой для создания диагностических средств индикации патогенных микроорганизмов.

МКА делают возможным проведение исследований на принципиально новом уровне, обеспечивая получение точной информации о местоположении и структуре гомологичных им детерминант, антигенной мозаике различных видов микроорганизмов, антигенном дрейфе, эпитопной плотности диагностически значимых биополимеров.

Эффективность применения МКА для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза и их дифференциации от близкородственных видов буркхольдерий подтверждена как отечественными, так и зарубежными исследователями.

Впервые о возможности применения мелиоидозных МКА как основы для высокочувствительной иммуноферментной тест-системы для обнаружения экзотоксина возбудителя мелиоидоза в сыворотке крови экспериментальных животных сообщили G.Ismail *et al.* в 1987 г. [17].

Вскоре эффективность применения МКА для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза и их дифференциации от близкородственных видов буркхольдерий была подтверждена отечественными экспериментаторами [11]. Для дифференциации двух близких в антигенном отношении видов микроорганизмов, *B. mallei* и *B. pseudomallei*, были получены МКА к поверхностным антигенам этих бактерий [13].

На основе МКА к эпитопам антигена 6 (по классификации Н.Н.Пивня) в ВолгоградНИПЧИ был изготовлен препарат для индикации возбудителя сапа в различных объектах исследования. В рабочем разведении он обеспечивал специфическое свечение *B. mallei*, не взаимодействовал с близкородственной бактерией *B. pseudomallei* и гетерологичными микроорганизмами. В 1992 г. препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные мышинные сухие» успешно прошел государственные испытания и решением Комитета МИБП при МЗ СССР от 15.10.92 г. был рекомендован для внедрения в практику здравоохранения. Позже после разработки технологии изготовления иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных был решен один из проблемных вопросов дифференциации двух близких в антигенном отношении видов патогенных буркхольдерий, *B. pseudomallei* и *B. mallei* [7, 8].

Опыт работы по использованию МКА в производстве препаратов для МФА подтвердил существенные преимущества моноклонального сырья: стабильность его свойств, возможность накопления МКА в необходимых количествах в любое время, что повысило технологичность всего процесса производства препаратов, параметры качества которых превышают соответствующие показатели поликлональных аналогов [12].

Помимо совершенствования технологии производства препаратов для индикации возбудителей сапа и мелиоидоза, МКА применяли в аналитических целях, что позволило получить новые сведения о свойствах ряда диагностически значимых антигенов патогенных буркхольдерий, составе некоторых биополимеров и их локализации в микробной клетке [2, 5].

Для выявления буркхольдерий чаще всего применяют МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* или поверхностно локализованному антигену капсулоподобного вещества этого микроорганизма [18, 21, 25], к антигенам клеточной стенки [12, 13] и белкам

наружной мембраны [1, 19] буркхольдерий II группы патогенности.

МКА различной эпитопной направленности используют при изготовлении диагностических препаратов и тест-систем для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов или в реакции агглютинации бактерий. Полагают, что наиболее перспективным методом обнаружения антигенов возбудителя мелиоидоза в пробах клинического материала является сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного метода с применением МКА. По данным N.Anuntagool *et al.*, установлено, что в этих случаях чувствительность метода достигает 75 %, а специфичность – 98 % [14].

В ВолгоградНИПЧИ в 1996–1998 гг. на основе МКА была разработана и апробирована экспериментальная иммуноферментная тест-система для выявления гликопротеина (АГ8) в составе капсульной субстанции *B. pseudomallei*. С помощью этой тест-системы подтверждена гетерогенность штаммов *B. pseudomallei* по признаку экспрессии антигенных детерминант, в частности по содержанию АГ8 в суточных культурах буркхольдерий [18]. Высокая разрешающая способность тест-системы иммуноферментной моноклональной позволяет осуществлять быстрый и достоверный контроль за наличием/отсутствием Аг8 в исследуемых пробах, его накоплением на этапах культивирования различных штаммов возбудителя мелиоидоза [10, 11], а также исследовать динамику распространения Аг8, как одного из основных маркеров *B. pseudomallei* в организме биомоделей при различных способах заражения животных [6].

МКА к различным эпитопам антигена 8 были с успехом использованы С.Н.Скопинской и соавт. для экспресс-обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза (в эксперименте) с помощью технологии флуоресцентного липосомального иммуноанализа [10].

За рубежом МКА к антигенам *B. pseudomallei* используют в ряде традиционных иммунодиагностических тестов, применяемых, преимущественно, в эндемичных регионах распространения инфекции, для идентификации выделяемых культур буркхольдерий и их дифференциации от других представителей рода *Burkholderia* [29].

С помощью ТИФМ на основе МКА к экзополисахариду I.Steinmetz *et al.* [25] были идентифицированы все штаммы *B. pseudomallei*, изолированные в различных географических регионах. В то же время при проверке кросс-реактивности тест-системы было выявлено взаимодействие с близкородственными бактериями *B. mallei*.

Эти же экзополисахарид-специфичные МКА были использованы для ускоренной идентификации *B. pseudomallei* с помощью реакции латекс-агглютинации (РЛА) [26]. Авторы идентифицировали изоляты из проб внешней среды и клинического материала, отобранные в районах Юго-Восточной Азии, северной Австралии и Африки. Четкая специфическая агглютинация была зарегистрирована с

Ara⁻ штаммами *B. pseudomallei*, но не с *Burkholderia*-подобными изолятами (Ara⁺) и другими видами бактерий. Преимущества использования МКА для приготовления латексного диагностикума стали очевидны, поскольку ранее с помощью РЛА на основе поликлональных антител дифференцировать *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* не удавалось [15, 23].

Мишенью для идентификации *B. pseudomallei* в пробах клинического материала может служить также белок наружной мембраны с молекулярной массой 30 kDa, локализованный на поверхности бактерий [19]. Использование МКА к этому антигену в РА с клиническими изолятами позволило авторам в 243 случаях получить положительные результаты [20]. РА с другими видами грамотрицательных бактерий оказались отрицательными, за исключением положительной РА с одним штаммом *B. mallei*. Однако МКА этого типа обладали кросс-реактивностью в отношении грамположительных *Bacillus sp.* и *Streptococcus pyogenes*. Помимо РА, МКА были апробированы в РЛА. Чувствительность реакции составила 100 %, специфичность колебалась от 85,96 % (высев на среду для гемокультуры) до 96,49 % (высев в сердечно-мозговой бульон). Установлено, что сочетанное применение культурального метода и РЛА повышало специфичность анализа и укорачивало сроки получения ответа.

Эти данные отражают сложность решения вопроса о выборе антигенной мишени и типа диагностической реакции при поиске патогена в случае исследования клинического материала.

Наряду с межвидовой дифференциацией буркхольдерий актуальным направлением исследований остается совершенствование схем эффективного выявления внутривидовых отличий: обнаружение вирулентных и авирулентных штаммов *B. pseudomallei*, выделяемых из проб клинического материала и объектов внешней среды.

Впервые о возможности дифференциации таких штаммов в лабораторных условиях заговорили после установления факта того, что авирулентные штаммы *B. pseudomallei*, изолированные из внешней среды, отличаются от вирулентных клинических изолятов *B. pseudomallei* по способности ассимилировать L-арабинозу [24, 28].

Позже после получения МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* и их использования для диагностических целей было обнаружено, что дифференциация вирулентных (Ara⁻) и авирулентных (Ara⁺) штаммов *B. pseudomallei* возможна по наличию или отсутствию на поверхности бактериальной клетки гликопротеина с молекулярной массой 200 kDa [22], и подтверждено специалистами, работавшими в эндемичных районах распространения возбудителя мелиоидоза [26].

В настоящее время общепринято, что авирулентные Ara⁺ *B. pseudomallei* изоляты из внешней среды отличаются от вирулентных Ara⁻ клинических изолятов и Ara⁻ изолятов из внешней среды способ-

ностью ассимилировать L-арабинозу и отсутствием на их поверхности 200 kDa антигена [16]. Антиген 200 kDa *B. pseudomallei* относится к группе экзополисахаридов грамотрицательных бактерий, так называемых капсульных полисахаридов — значимых факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза. Он является гликопротеином в составе капсулы, его идентифицируют как составную часть антигена 8, локализованного внеклеточно [2, 3, 4, 5].

В связи с этим несомненный интерес представляют работы по получению и использованию МКА для целей дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов *B. pseudomallei*. Опубликованы данные о МКА, четко взаимодействующими с Aga^- изолятами *B. pseudomallei*, но не Aga^+ вариантами, выделенными из внешней среды [21, 22]. Для быстрой дифференциации вирулентных и авирулентных изолятов *B. pseudomallei* C.Thepthai *et al.* [27] была предложена панель агглютинирующих мелиоидозных МКА, в которую вошли две группы антител, агглютинировавших 100 % Aga^+ клинических и почвенных изолятов *B. pseudomallei* и вторая группа МКА, которые агглютинировали более 90 % Aga^- клинических и почвенных изолятов.

Дальнейшее совершенствование лабораторной диагностики мелиоидоза ориентировано на разработку иммунодиагностических препаратов и тест-систем на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* для обнаружения и идентификации вирулентных штаммов *B. pseudomallei*, что особенно важно в условиях чрезвычайных ситуаций, вне зависимости от зон эндемичного распространения патогена. Недавно полученная нами коллекция гибридом-продуцентов МКА к различным эпитопам антигена 200 kDa является базой для разработки вышеназванного направления исследований. После завершения этапов по получению исчерпывающей характеристики всех свойств МКА будет определена диагностическая ценность каждого типа моноклонального иммуноглобулина в реакциях с широким набором буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов.

В целом, следует отметить, что несмотря на повышенный интерес к возбудителям сапа и мелиоидоза во всем мире международный рынок диагностических средств не располагает коммерчески доступными МИБП для их обнаружения и идентификации.

Поэтому расширение работ в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)» в части получения иммунодиагностических препаратов и тест-систем на основе МКА для детекции патогенных микроорганизмов, в том числе возбудителей сапа и мелиоидоза, открывает новые возможности для сотрудничества профильных учреждений по совершенствованию существующей схемы индикации буркхольдерий II группы патогенности и разработке новых моноклональных средств обнаружения этих патогенов, необходимых для повышения готовности специалистов к

условиям чрезвычайных ситуаций.

Работа выполнена по государственному контракту № 60-Д/4 от 24.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветчинин С.С., Копылов П.Х., Киселева Н.В., Баранов А.М., Баранова Е.В., Галкина Е.В. и др. Получение моноклональных антител к белкам наружной мембраны *Burkholderia pseudomallei* штамма C-141. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):54–7.
2. Каплиев В.И., Пивень Н.Н., Храпова Н.П. Определение локализации антигенов возбудителя мелиоидоза на ультраструктурном уровне с помощью моноклональных антител. Микробиол. журн. Киев, 1992; 54(1):85–9.
3. Пивень Н.Н., Смирнова В.И., Каплиев В.И., Подзолкова Г.Г., Храпова Н.П. Роль поверхностных антигенов *Pseudomonas pseudomallei* в патогенезе мелиоидоза. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 10:8–12.
4. Пивень Н.Н., Илюхин В.И. Патогенность *Burkholderia pseudomallei* как функция его внеклеточных и поверхностных антигенов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 6:94–9.
5. Пивень Н.Н., Алексеев В.В., Попов С.Ф., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В. и др. Ультраструктурно-иммунохимическое изучение капсулы патогенных буркхольдерий. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 5:19–24.
6. Плеханова Н.Г., Алексеев В.В., Пивень Н.Н., Храпова Н.П., Викторов Д.В., Тихонов С.Н. и др. Оценка продукции капсульного гликопротеинового комплекса *Burkholderia pseudomallei* при мелиоидозной инфекции. Пробл. особо опасных инф. 2004; 87:65–6.
7. Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. О получении моноклональных люминесцирующих иммуноглобулинов для обнаружения возбудителя мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань, 1996. С. 147–8.
8. Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П., Алексеев В.В., Кулаков М.Я. О разработке новых иммунобиологических препаратов на основе моноклональных антител к *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:153–8.
9. Самыгин В.М., Храпова Н.П., Спиридонов В.А., Степин А.А. Биосинтез антигена 8 в процессе культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 4:50–2.
10. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Прохвятилова Е.В. Применение технологии флуоресцентного липосомального иммуноанализа в диагностике и индикации сапа и мелиоидоза. Вестник Рос. АМН. 2007; 12:17–22.
11. Храпова Н.П., Липницкий А.В., Свиридов В.В., Барков А.М., Новицкая И.В. Перспективы создания иммуноглобулиновых препаратов нового поколения для индикации возбудителей сапа и мелиоидоза. Сообщение 1. Вопр. противозид. защиты населения. М., 1988; 34:129–34.
12. Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., Прохвятилова Е.В., Кулаков М.Я. Перспективы совершенствования иммуноглобулиновых препаратов для обнаружения и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Мед. паразитизм и паразитарн. бол. 1995; 4:49–53.
13. Яковлева И.В., Свиридов В.В., Титова Н.Г., Храпова Н.П., Липницкий А.В., Фарбер С.М. и др. Моноклональные антитела в дифференциации *Pseudomonas mallei* и *Pseudomonas pseudomallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1995; 3:14–5.
14. Anuntagool N., Intachote P., Naigowit P., Sirisinha S. Rapid antigen detection assay for identification of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *pseudomallei* infection. J. Clin. Microbiol. 1996; 34(4):975–6.
15. Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun N., White N.J., Sirisinha S. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara^+ *Burkholderia pseudomallei* isolates is immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara^- clinical isolates. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5:225–9.
16. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the *in vitro* growth of virulent Ara^- and avirulent Ara^+ *Burkholderia pseudomallei*. Acta tropica. 2000; 74:221–8.
17. Ismail G., Embi M.N., Omar O., Razak N. Toxigenic properties of *Pseudomonas pseudomallei* extracellular products. Trop.

Biomed. 1987; 4:101–10.

18. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Prokhvatilova Y.V. Detection of Glycoprotein of *Burkholderia pseudomallei*. Emerg. Infect. Dis. 1998; 4(2):336–7.

19. Pongsunk S., Ekpo P., Dharakul T. Production of specific monoclonal antibodies to *Burkholderia pseudomallei* and their diagnostic application. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 1996; 14(1):43–7.

20. Pongsunk S., Thirawattanasuk N., Piyasangthong N., Ekpo P. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in blood cultures by a monoclonal antibody assay. J. Clin. Microbiol. 1999; 37(11):3662–7.

21. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52(3):231–5.

22. Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun V., Puthucheary S.D., Vadivelu J. et al. Antigenic differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. Microbiol. Immunol. 1998; 42(11):731–7.

23. Smith M.D., Wuthiekanun V., Walsh A.L., Pitt T.L. Latex agglutination test for identification of *Pseudomonas pseudomallei*. J. Clin. Pathol. 1993; 46:374–5.

24. Smith M.D., Angus B.J., Wuthiekanun V., White N.J. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. Infect. Immun. 1997; 65:4319–21.

25. Steinmetz I., Rohde M., Brenneke B. Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. Infect. Immun. 1995; 63(10):3959–65.

26. Steinmetz I., Reganzerowski A., Brenneke B., Haussler S., Simpson A., White N.J. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody. J. Clin. Microbiol. 1999; 37(1):225–8.

27. Thepthai C., Dharakul T., Smithtikarn S., Trakulsomboon S., Songsivilai S. Differentiation between non-virulent and virulent *Burkholderia pseudomallei* with monoclonal antibodies to the Ara⁺ or Ara⁻ biotypes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 65(1):10–2.

28. Wuthiekanun V., Smith M.D., Dance D.A., Walsh A.L., Pitt T.L., White N.J. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J. Med. Microbiol. 1996; 45:408–12.

29. Zhao J., Liu Z., Ma C., Deng D. A study on pathogen antigen and serodiagnosis of *Malleus* and melioidosis. Wei Sheng Wu Hsueng Pao. 1990; 30(1):63–9.

N.P.Khrapova, V.V.Alekseev, I.I.Korsakova, N.M.Drefs, L.V.Lomova,
T.V.Bulatova, G.M.Napalkova

Application of Glanders and Melioidosis Monoclonal Antibodies of Different Epitope Specificity for Pathogenic Burcholderia Detection and Identification

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Summarized are the modern approaches to choosing the methods and techniques of pathogenic burkholderia detection, literary data, and the results of the authors own studies on the problem of development of monoclonal preparations for fast identification of *Burkholderia* genus representatives. Discussed are the prospects both of modernization of monoclonal preparations and test-systems for detection of glanders and melioidosis etiological agents in different objects and of the differentiation of burkholderia species, and intraspecific typing of melioidosis agent strains.

Key words: glanders and melioidosis etiological agents, monoclonal antibodies, detection, identification of pathogenic burkholderia.

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

1. Vetchinin S.S., Kopylov P.Kh., Kiseleva N.V., Baranov A.M., Baranova E.V., Galkina E.V. et al. [Production of Monoclonal Antibodies against Outer Membrane Proteins of *Burkholderia pseudomallei*, Strain C-141]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 98:54–7.

2. Kapliev V.I., Piven' N.N., Khrapova N.P. [The Determination of the Location of the Antigens of the Causative Agent of Melioidosis at the Ultrastructural Level by Using Monoclonal Antibodies]. Mikrobiol. Zh. 1992; (1):85–9.

3. Piven' N.N., Smirnova V.I., Kapliev V.I., Podzolkova G.G., Khrapova N.P. [The Role of the Surface Antigens of *Pseudomonas pseudomallei* in the Pathogenesis of Melioidosis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 10:8–12.

4. Piven' N.N., Iliukhin V.I. [Pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*: Extracellular and Surface Antigen Functions]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2000; 6:94–9.

5. Piven' N.N., Alekseev V.V., Popov S.F., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Plekhanova N.G., Kapliev V.I., Avrorova I.V. [Ultrastructural Immunochemical Study of Pathogenic *Burkholderia* Capsule]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 5:19–24.

6. Plekhanova N.G., Alekseyev V.V., Piven N.N., Khrapova N.P., Viktorov D.V., Tikhonov S.N., Kivokurtseva T.Yu., Perepelitsyn S.V., Iyazmina T.N. [Estimation of Production of the Capsular Glycoprotein Complex in *Burkholderia pseudomallei* in Case of Melioidosis Infection]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; 87:65–6.

7. Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [On the Obtaining of Monoclonal Luminescent Immunoglobulins for Detection of the Melioidosis Causative Agent]. In: Ecological and Epidemiological Surveillance of Natural Foci Infections in the North of the Caspian Sea Region. Astrakhan', 1996. P. 147–8.

8. Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P., Alekseyev V.V., Kulakov M.Ya. [The Development of New Immunobiologic Preparations on the Basis of Monoclonal Antibodies against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; 86:153–8.

9. Samygin V.M., Khrapova N.P., Spiridonov V.A., Stepin A.A. [Antigen biosynthesis during cultivation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 4:50–2.

10. Skopinskaya S.N., Iarkov S.P., Khranov E.N., Khrapova N.P., Piven' N.N., Prokhvatilova E.V. [The Use of Fluorescent Liposomal Immunoanalysis for the Diagnostics and Indication of Glanders and Melioidosis]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2007; 12:17–22.

11. Khrapova N.P., Lipnitsky A.V., Sviridov V.V., Barkov A.M., Novitskaya I.V. [The Outlook for Creation of New Immunoglobulin Preparations for the Indication of Glanders and Melioidosis Causative Agents. Report 1]. Vopr. Protivoepidem. Zashchity Nasel. 1988; 34:129–34.

12. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Prokhvatilova E.V., Kulakov M.Ya. [The Outlook for Improving the Immunoglobulin Preparations for the Detection and Identification of the Causative Agents of Glanders and Melioidosis]. Med. Parazitol. 1995; 4:49–53.

13. Iakovleva I.V., Sviridov V.V., Titova N.G., Khrapova N.P., Lipnitsky A.V., Farber S.M., Barkov A.M. [Monoclonal Antibodies in the Differentiation of *Pseudomonas mallei* and *Pseudomonas pseudomallei*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1995; 6:14–5.

Authors:

Khrapova N.P., Alekseev V.V., Korsakova I.I., Drefs N.M., Lomova L.V., Bulatova T.V., Napalkova G.M. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 17.01.11.

С.А.Агеев, Р.З.Шайхутдинова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Т.И.Комбарова, С.В.Дентовская,
А.П.Анисимов

КОНСТРУИРОВАНИЕ КАНДИДАТА В ВАКЦИННЫЕ ШТАММЫ *YERSINIA PESTIS* С ПОНИЖЕННОЙ РЕАКТОГЕННОСТЬЮ

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск.

Разработана методология направленного конструирования лишенных маркеров антибиотикоустойчивости неревертирующих $\Delta lpxM$ мутантов *Y. pestis*, сочетающая прямой сайт-направленный мутагенез, клонирование мутантной аллели $\Delta lpxM::cat$ в суицидном векторе pCVD442, гомологичную рекомбинацию *in vivo* и удаление кассеты устойчивости к антибиотикам. Созданный на основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ нокаутный мутант по гену *lpxM*, лишенный маркеров антибиотикоустойчивости, синтезировал липополисахарид (ЛПС) со сниженной способностью стимулировать продукцию TNF- α . Степень снижения провоспалительной активности ЛПС, синтезируемого мутантным штаммом *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$, была значительно выше в тестах на клетках-мишенях человека по сравнению с мышинной моделью.

Ключевые слова: *lpxM*, сайт-направленный мутагенез, липополисахарид, эндотоксическая активность, *Yersinia pestis*.

Применяемая в настоящее время в странах СНГ чумная живая вакцина на основе аттенуированного штамма *Y. pestis* EV стимулирует напряженный и эффективный поствакцинальный иммунитет и предохраняет от гибели после заражения атипичными вариантами возбудителя чумы за счет индукции иммунного ответа на целый ряд антигенов, расположенных на клеточной поверхности как типичных, так и измененных бактерий [4]. Однако и эта вакцина имеет значительные ограничения в применении из-за ее высокой реактогенности, связанной с наличием липополисахарида (ЛПС) в составе клеточной стенки *Y. pestis*. Одним из возможных путей уменьшения реактогенности является генно-инженерная модификация ЛПС, предотвращающая встраивание в липид А шестого жирно-кислотного остатка лауриновой кислоты [2]. Ранее был сконструирован мутант вакцинного штамма EV с нарушенным встраиванием лауриновой кислоты, у которого центральная часть кодирующего ее гена *lpxM* была замещена на ген устойчивости к канамицину. По данным авторов, по сравнению с исходным вакцинным штаммом $\Delta lpxM::kan$ мутант обладал сниженной реактогенностью [5, 8]. Однако использование такого штамма в качестве основы для живой вакцины недопустимо из-за присутствия в его геноме гена лекарственной устойчивости [9]. Поэтому целью настоящего исследова-

ния была разработка методики получения мутантного по гену *lpxM* штамма *Y. pestis*, лишенного маркеров лекарственной устойчивости как основы для разработки новой живой чумной вакцины со сниженной реактогенностью.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы, плазмиды, клеточные линии и животные. Для мутагенеза использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Для проведения генетических манипуляций применяли штаммы *Escherichia coli* DH5 α λ pir (конструирование суицидной плазмиды для мутагенеза) и S17 λ pir (конъюгативный перенос сконструированной суицидной плазмиды в клетки *Y. pestis*). Штаммы *E. coli* выращивали на жидких и плотных питательных средах Лурия-Бертани при температуре 37 °C [12]. Клетки *Y. pestis* выращивали на жидких и плотных питательных средах Хоттингера (pH 7,2–7,4) при температуре 28 °C. Использованные в работе плазмиды представлены в таблице.

В качестве клеток-индукторов TNF- α использовали макрофагоподобную мышиную линию J774.1A и линию человеческих промиелоцитов U937. Летальную токсичность ЛПС и индукцию TNF- α *in vivo* определяли для 8–10-недельных самок мышей

Использованные плазмиды

Плазмиды	Характеристика	Источник
pCP20	<i>bla cat</i> c1857 λ P _R <i>flp</i> pSC101 <i>oriTS</i>	[6]
pCVD442	<i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , <i>bla</i> , <i>sacB</i>	[7]
pCVD442- $\Delta lpxM::cat$	pCVD442, содержащая фрагмент $\Delta lpxM::cat$	Настоящее исследование
pKD3	<i>bla FRT cat FRT</i> PS1 PS2 <i>oriR6K</i>	[6]
pKD46	<i>bla</i> P _{BAD} <i>gam bet exo</i> pSC101 <i>oriTS</i>	[6]

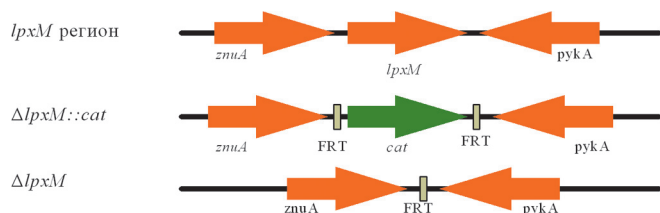


Рис. 1. Схема конструирования LpxM-варианта штамма *Y. pestis* EV

линии BALB/c массой (19±2) г.

Конструирование штаммов *Y. pestis* с инактивированным геном *lpxM*. Рестрикционно-лигазные работы выполняли по руководству T.Maniatis *et al.* [11].

На основе вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, предварительно трансформированного RedGam-хелперной плазмидой pKD46, был получен мутант $\Delta lpxM::cat$ путем замены кодирующей последовательности гена на кассету устойчивости к хлорамфениколу [6] (рис. 1). ПЦР-продукт для мутагенеза, амплифицированный с праймерами Cat1-f (ataacgtgtcttctgtaatgatgattagccaccgccaattctaagagttccccgtgtaggctggagctgcttc) и Cat2-r (tggtacgaccaataaccagtcgtatcatccgcgtcgcaataagttattttaagataatgggaattagccatggctcc), представлял собой ген *cat* плазмиды pKD3, ограниченный FRT сайтами и фланкированный с двух сторон короткими участками гомологии (55 п.н.) гена *lpxM*. После введения методом электропорации в вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ 100 нг полученного ПЦР-продукта отбирали клоны с фенотипом Cm^R Ap R . В дальнейшем мутантную аллель $\Delta lpxM::cat$ сконструированного штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM::cat$ /pKD46 амплифицировали с праймерами Cat3-f (agtctgtcagcccatcgtag) и Cat4-r (atgggtgcscatcacatcgcc) и клонировали в суицидном векторе pCVD442, предварительно гидролизованном SmaI, в клетках *E. coli* DH5 α λ pir. Передачу рекомбинантной плазмиды pCVD442- $\Delta lpxM::cat$ в штамм *E. coli* S17 λ pir осуществляли методом электропорации, а из него в штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ – методом конъюгативного переноса. Контрselection конъюгантов *Y. pestis* и вторичную рекомбинацию проводили, как описано ранее [7].

Удаление кассеты устойчивости к хлорамфениколу в инактивированном гене и последующую элиминацию плазмиды pCP20 проводили, как описано ранее [6]. В результате был получен лишенный маркера антибиотикоустойчивости штамм *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ (Ap S Cm S) с инактивированным геном *lpxM*. Для подтверждения корректности структуры полученных мутантов на каждом из этапов мутагенеза использовали ПЦР (рис. 2). Для определения нуклеотидной последовательности фрагмента $\Delta lpxM$ штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ использовали прямой метод секвенирования без предварительного клонирования геномных фрагментов ДНК.

Выделение и анализ структуры ЛПС. Выделение, электрофоретический контроль препаратов и визуализацию ЛПС в полиакриламидных гелях, а также

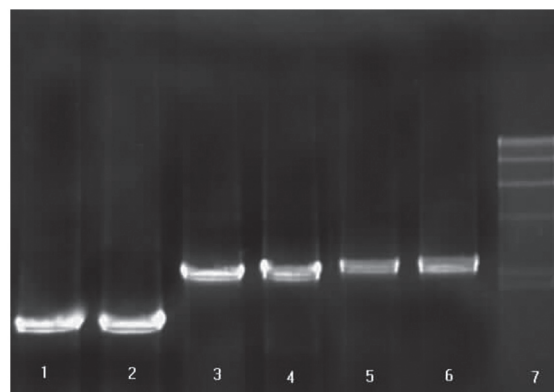


Рис. 2. Сравнительный анализ продуктов амплификации ДНК штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ, EV $\Delta lpxM::cat$ и EV $\Delta lpxM$:

Треки: 1, 2 – EV $\Delta lpxM$ (1268 п.н.); 3, 4 – EV $\Delta lpxM::cat$ (2198 п.н.); 5, 6 – EV НИИЭГ (2457 п.н.); 7 – ДНК λ гидролизованная рестриктазой HindIII. Электрофорез в 0,7 % агарозном геле

определение структуры полученных препаратов ЛПС с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с Фурье преобразованием и ионизацией электрораспылением (МС ИЭР) проводили, как описано ранее [10]. В качестве отрицательного контроля при изучении индукции цитокинов и определении летальной токсичности использовали ЛПС вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15/10, не обладающий эндотоксической активностью [3]. В качестве положительного контроля в экспериментах по индукции цитокинов использовали ЛПС штамма *E. coli* O55:B5 (Sigma).

Индукция TNF- α *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vivo* определяли количество TNF- α в сыворотке крови мышей BALB/c, сенсibilизированных актиномицином Д, после введения препаратов ЛПС в дозе 50 мкг/мышь. В экспериментах *in vitro* определяли количество TNF- α в супернатанте клеток млекопитающих после их инкубации с ЛПС в дозах от 3 до 300 нг/мл в течение 18 ч. Количество TNF- α в клеточном супернатанте или в сыворотке крови мышей методом иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы Bender MedSystems.

Определение летальной токсичности ЛПС. Токсичность ЛПС определяли по величине LD₅₀ после подкожного введения 5-кратных разведений препаратов ЛПС мышам линии BALB/c. Вычисление величин LD₅₀ и доверительных интервалов (для вероятности 95 %) определяли по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Оценка безвредности. Определение безвредности исследуемых штаммов проводили в соответствии с методическими указаниями МУ 3.3.1.1113-02 «Основные требования отбора новых вакцинных штаммов чумного микроба».

Результаты и обсуждение

Разработанная методология направленного конструирования лишенных маркеров антибиотикоустойчивости нереввертирующих мутантов *Y. pestis*,

сочетающая прямой сайт-направленный мутагенез, клонирование мутантной аллели $\Delta lpxM::cat$ в суицидном векторе pCVD442, гомологичную рекомбинацию *in vivo* и удаление кассеты устойчивости к антибиотику позволила нам получить $\Delta lpxM$ мутант вакцинного штамма EV линии НИИЭГ. Препарат ЛПС, выделенный из мутантного штамма, мигрировал в ДСН-ПААГ быстрее и с образованием более компактной полосы, чем препарат исходного штамма EV линии НИИЭГ, подтверждая меньший размер молекул. Согласно результатам проведенной МС ИЭР, масс-спектр липида A EV $\Delta lpxM$ включал только тетраацильные и пентаацильные варианты, в то время как в масс-спектре исходного штамма EV НИИЭГ присутствовали тетраацильные, пентаацильные и гексаацильные производные липида A.

Мы оценили TNF- α -индуцирующую активность препаратов ЛПС, выделенных из мутантного штамма *Y. pestis* EV $\Delta lpxM$ и вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, используя мышиную макрофагоподобную клеточную линию J774A.1 и линию человеческих промиелоцитов U937. Индукция синтеза TNF- α препаратом ЛПС из штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ для обеих клеточных культур была дозозависимой и не отличалась от таковой контрольного ЛПС штамма *E. coli* O55:B5. Модифицированный ЛПС слабее индуцировал синтез TNF- α макрофагами по сравнению с ЛПС «дикого типа». Использование клеток-мишеней различной видовой принадлежности позволило установить, что уменьшение эндотоксической активности мутантного ЛПС более выражено на человеческих, и менее – на мышинных клетках-мишенях (рис. 3). Количество TNF- α в супернатанте моноцитарных клеток U937 увеличивалось незначительно и практически не отличалось от уровня, индуцируемого ЛПС *F. tularensis* 15/10, который был использован в качестве отрицательного контроля. Выявленное различие провоспалительного ответа макрофагов разной видовой принадлежности на действие исходного и мутантного ЛПС, скорее всего,

обусловлено разной специфичностью рецепторов к ЛПС у человека и мыши [13].

Данные, полученные нами на мышиную макрофагоподобную клеточную линию J774A.1 *in vitro*, согласовались с данными, полученными на мышках линии BALB/c в экспериментах *in vivo*. Внутривентральное введение обоих препаратов ЛПС мышам, sensibilizированным актиномицином Д, приводило к индукции синтеза TNF- α . Уровень TNF- α в сыворотке мышей после введения ЛПС исходного вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ достоверно превышал аналогичный показатель для препарата ЛПС EV $\Delta lpxM$ – (52,9 $\pm$ 5,9) нг/мл и (38,0 $\pm$ 4,1) нг/мл соответственно. Уровень TNF- α у животных контрольной группы не поднимался выше 50 пкг/мл. Введение ЛПС *F. tularensis* не приводило к повышению уровня сывороточного TNF- α у мышей.

Уровни LD₅₀ для ЛПС родительского штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и мутантного штамма EV $\Delta lpxM$ для мышей линии BALB/c составили 648,3 (205–5149,3) и 129,7 (32,6–516,2) мг/мышь соответственно. Таким образом, делеция гена *lpxM* приводила к пятикратному снижению токсичности мутантного ЛПС.

Оценка безвредности штамма EV $\Delta lpxM$ для белых мышей линии BALB/c по сравнению с исходным штаммом EV НИИЭГ также продемонстрировала снижение его токсических свойств. Иммунизация мышей мутантным штаммом EV $\Delta lpxM$ не вызывала гибели животных при подкожном введении его в дозах от 10² до 10⁷ КОЕ, тогда как введение эталонного штамма EV НИИЭГ в дозах 10⁵ и 10⁷ КОЕ на мышь приводило к гибели 10 и 40 % животных.

Таким образом, разработанный комплекс методических приемов, препаратов ДНК и бактериальных штаммов обеспечивает контролируемое конструирование лишенных маркеров лекарственной устойчивости *lpxM* мутантов *Y. pestis* – кандидатов в вакцинные штаммы со сниженной реактогенностью, а также может быть легко адаптирован для других грамотрицательных бактерий. Созданный на основе

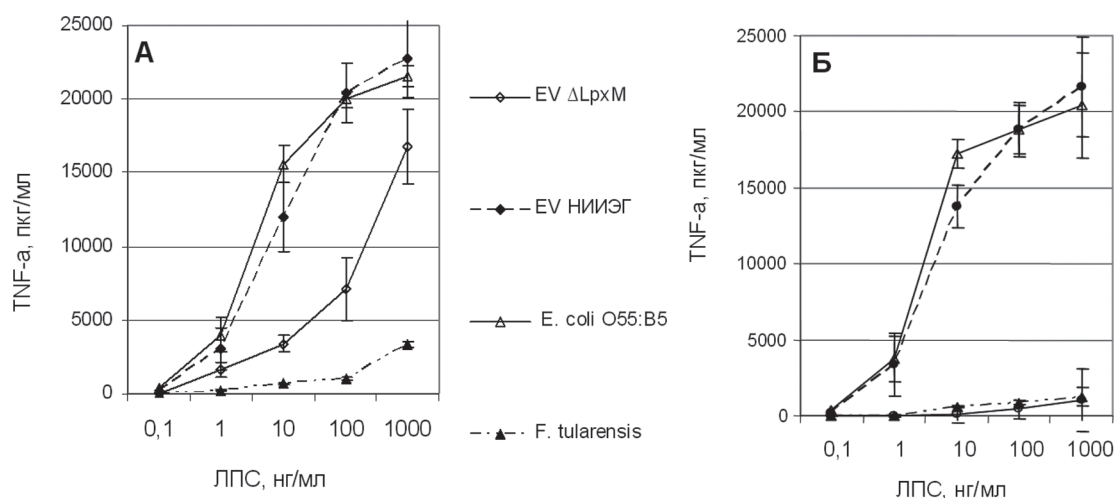


Рис. 3. Уровни TNF- α в супернатанте макрофагоподобных мышинных клеток J774.1A (А) и моноцитарных клеток человека U937 (Б) после стимуляции препаратами ЛПС из штаммов *Y. pestis* EV НИИЭГ и EV $\Delta lpxM$

вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ нокаутный мутант по гену *lpxM*, лишенный маркеров антибиотикоустойчивости, синтезировал ЛПС со сниженной способностью стимулировать продукцию TNF- α . Степень снижения провоспалительной активности ЛПС, синтезируемого мутантным штаммом *Y. pestis* EV Δ *lpxM*, была значительно выше в тестах на клетках-мишенях человека по сравнению с мышинной моделью.

Работа выполнена по государственным контрактам № 124-Д от 11.06.2009 г. и № 52-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государственное издательство медицинской литературы; 1962, 104 с.
2. Дентовская С.В., Шайхутдинова Р.З., Книрель Ю.А., Иванов С.А., Анисимов А.П. Конструирование вакцинных штаммов грамотрицательных бактерий со сниженной реактогенностью. Мол. генет. 2006; 2:3–8.
3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. и др. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis*. Биохимия. 2008; 73(2):237–46.
4. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
5. Anisimov A.P., Shaikhutdinova R.Z., Pan'kina L.N., Feodorova V.A., Savostina E.P., Byistrova O.V. et al. Effect of deletion of the *lpxM* gene on virulence and vaccine potential of *Yersinia pestis* in mice. J. Med. Microbiol. 2007; 56(4):443–53.
6. Datsenko K., Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000; 97:6641–45.
7. Donnenberg M.S., Kaper J.B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 1991; 29(12):4310–7.
8. Feodorova V.A., Pan'kina L.N., Savostina E.P., Sayapina L.V., Motin V.L., Dentovskaya S.V. et al. A *Yersinia pestis* *lpxM*-mutant live vaccine induces enhanced immunity against bubonic plague in mice and guinea pigs. Vaccine. 2006; 25:7620–8.
9. Frey J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. Vaccine. 2006; 25:5598–605.
10. Knirel' Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44(5):1731–43.
11. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning:

a laboratory manual. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982; 281 p.

12. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. 1972. 280 p.

13. Walsh C., Gangloff M., Monie T., Smyth T., Wei B., McKinley T.J. et al. Elucidation of the MD-2/TLR4 interface required for signaling by lipid IVA. J. Immunol. 2008; 181(2):1245–54.

S.A.Ageev, R.Z.Shaikhutdinova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, T.I.Kombarova, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

Construction of Candidate *Yersinia pestis* Vaccine Strains with Reduced Reactogenicity

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The technology of directed constructing of non-reverting *Y. pestis* Δ *lpxM* mutants, lacking antibiotic resistance markers was developed. It included direct site-specific mutagenesis, cloning of mutant Δ *lpxM::cat* allele in pCVD442 suicide vector, homologous recombination *in vivo* and deletion of the antibiotic resistance cassette. *lpxM* gene knockout mutant created on the basis of vaccine *Y. pestis* EV NIEG strain lacking antibiotic resistance markers synthesized a lipopolysaccharide (LPS) with reduced ability to stimulate TNF- α production. The level of reduction of anti-inflammatory activity of the LPS synthesized by the mutant *Y. pestis* EV Δ *lpxM* strain was significantly higher in the test with human target cells in comparison with mouse model.

Key words: *lpxM*, site-specific mutagenesis, lipopolysaccharide, endotoxic activity, *Yersinia pestis*.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. Leningrad: Gos. Izd. Med. Lit.; 1962. 104 p.
2. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Knirel' Yu. A., Ivanov S.A., Anisimov A.P. [Constructing of Gram-Negative Bacteria Vaccine Strains with Reduced Reactogenicity]. Mol. Gen. 2006; 2:3–8.
3. Dentovskaya S.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Shaikhutdinova R.Z., Kondakova A.N., Byistrova O.V., Lindner B., Knirel' Y.A., Anisimov A.P. [Structural Diversity and Endotoxic Activity of the Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*]. Biochemistry. 2008; 73(2):192–9.

Authors:

Ageev S.A., Shaikhutdinova R.Z., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kombarova T.I., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: anisimov@obolensk.org

Об авторах:

Агеев С.А., Шайхутдинова Р.З., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболеньск, Московская обл. E-mail: anisimov@obolensk.org

Поступила 27.01.11.

Е.А.Смолькова, Т.Н.Щуковская, А.Л.Кравцов, Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, А.К.Никифоров

ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК БИОМОДЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ИММУНИЗАЦИИ ПРЕПАРАТАМИ С-КОМПЛЕКСА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗЛИЧНЫХ ПОДВИДОВ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В динамике на модели аутбредных белых мышей изучено влияние препаратов С-комплекса туляремиального микроба, выделенного из вакцинного штамма 15 НИИЭГ, относящегося к голарктическому подвиду, вирулентного штамма 503 этого же подвида, штамма Acole неарктического подвида и штамма A179 подвида *mediasiatica* на апоптоз и пролиферативную активность клеток центрального (тимус) и периферического (селезенка) органов иммунной системы. Установлено существование различий в соотношении клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, в разные сроки после иммунизации исследуемыми препаратами, что может быть связано с их структурой в зависимости от источника получения. Показано отсутствие повреждающего действия всех препаратов на генетический аппарат иммунокомпетентных клеток белых мышей. Перспективно использование данного антигенного комплекса при конструировании химических вакцин нового поколения.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, антигены, иммунокомпетентные клетки, цитометрия.

Существование эндемичных очагов туляремии на территории Российской Федерации и сопредельных государств, а также формирование их в ранее неэндемичных районах определяют актуальность вакцинопрофилактики данного заболевания [3].

В России для этой цели среди населения эндемичных и энзоотических территорий, по эпидпоказаниям, применяется лицензированная живая вакцина отечественного производства на основе штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. За рубежом лицензированная туляремиальная вакцина отсутствует. В США разрабатывается живая туляремиальная вакцина на основе штамма LVS, которая находится на этапе доклинических испытаний [2].

Однако применение живых вакцин для специфической профилактики туляремии имеет определенные ограничения:

- накожный метод вакцинации, в результате которого достаточно сложно стандартизировать дозу вакцины, а также наличие риска контаминации бактериальными и вирусными инфекциями при скарификации кожных покровов;

- высокая реактогенность вакцины;

- существование пробела в расшифровке факторов, ответственных за вирулентность и генетическую стабильность *F. tularensis*;

- отсутствие полных знаний о молекулярных механизмах формирования иммунитета к туляремии.

В связи с этим стратегия создания нового поколения вакцин, в том числе туляремиальной, включает использование таких иммуногенов *F. tularensis*, как липополисахарид (ЛПС) и белки поверхностного слоя, в качестве потенциальных компонентов вакцинирующих препаратов. Эти компоненты могут быть выделены как непосредственно из микроорганизма, так и с применением рекомбинантных технологий. Так, ген, кодирующий мембранный белок *F. tularensis* – липопротейн массой 17 кДа, был клонирован в *Salmonella typhi murium*. В результате иммунизации

мышей этим рекомбинантным штаммом наблюдалось формирование напряженного противотуляремиального иммунитета [6].

С-комплекс туляремиального микроба, включающий ЛПС и белки наружной мембраны возбудителя, рассматривается как перспективный компонент разрабатываемых средств специфической профилактики туляремии. Установлено, что препарат С-комплекса, выделенный из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обладает протективностью для белых мышей при заражении штаммами голарктического и неарктического подвидов, а также характеризуется отсутствием токсичности, пирогенности и повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки лабораторных животных [1].

Одним из показателей, позволяющих оценить влияние какого-либо препарата на иммунную систему, является соотношение количества клеток иммунной системы, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, в том числе на стадии апоптоза, которая характеризует повреждающее действие препарата. Активацию иммунокомпетентных клеток отражает их число в стадии пролиферации. Кроме того, имеет значение баланс количества клеток, находящихся в стадии апоптоза и пролиферации [4].

Сведения о влиянии на апоптоз и пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток С-комплексов туляремиального микроба других подвидов отсутствуют.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния С-комплексов туляремиального микроба различных подвидов на апоптоз и пролиферативную активность клеток органов центральной и периферической иммунной системы.

Материалы и методы

Исследование проводилось на аутбредных белых мышках массой 18–20 г. Животные были разделены на

4 группы, каждая из которых была иммунизирована однократно подкожно одним из 4 С-комплексов туляремиального микроба: первая группа – С-комплексом, выделенным из вакцинного штамма 15 НИИЭГ (С-15), относящегося к голарктическому подвиду, вторая – С-комплексом из вирулентного штамма 503 этого же подвида (С-503), третья – С-комплексом из штамма *Acole* неарктического подвида (С-*Acole*), четвертая – С-комплексом штамма A179 подвида *mediasiatica* (С-A179). Группу контроля составили интактные животные.

Тимоциты и спленоциты получали на 1, 7, 14-е и 21-е сутки иммуногенеза общепринятыми методами. Содержание ДНК для дифференцирования диплоидных, пролиферирующих и апоптотических клеток определяли на импульсном проточном цитофлюориметре ICP-22 PHUYE. Для этого предварительно фиксированные охлажденным 70 % этанолом клетки обрабатывали бромидом этидия и митрамицином по методу Barlogie *et al.* [5]. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Excel».

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено достоверное снижение на 1-е сутки иммуногенеза количества спленоцитов в стадии апоптоза при иммунизации С-15 и С-*Acole*, и повышение его при иммунизации С-A179. Количество пролиферирующих клеток на 1-е сутки было достоверно выше у животных, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179. При этом увеличение числа пролиферирующих клеток при иммунизации С-15 и С-503 происходило за счет увеличения количества клеток в стадии митоза, а при иммунизации С-A179 – за счет клеток в стадии синтеза и митоза.

На 7-е сутки иммуногенеза количество спленоцитов в стадии апоптоза регистрировалось на уровне, или достоверно ниже (С-503) контрольных значений (рис. 1). Число пролиферирующих спленоцитов при иммунизации всеми препаратами, кроме С-503, отмечалось на уровне значений группы контроля, а при иммунизации С-503 было достоверно выше, чем в контрольной группе. При этом уровень клеток

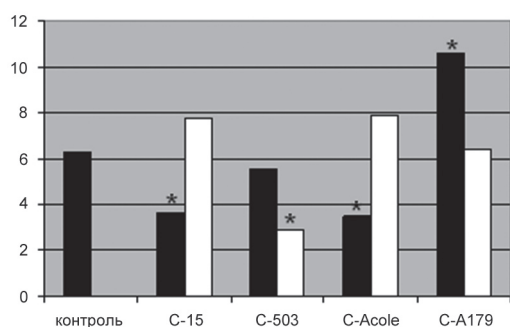


Рис. 1. Спленоциты в стадии апоптоза на 1-е и 7-е сутки иммуногенеза:

■ – 1-е сутки; □ – 7-е сутки; * – различия достоверны

в стадии митоза оставался достоверно повышен по сравнению с контролем и соответствовал значениям 1-х суток иммуногенеза у белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179. При иммунизации С-503 также отмечалось снижение количества клеток в стадии синтеза.

На 14-е сутки иммуногенеза отмечалось достоверное снижение уровня апоптотических клеток при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса туляремиального микроба по сравнению с контрольными значениями. Количество пролиферирующих клеток регистрировалось на уровне контрольных показателей.

К 21-м суткам иммуногенеза число спленоцитов в стадии апоптоза и пролиферации сохранялось на прежнем уровне. Отмечалось достоверное увеличение числа диплоидных клеток при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса. Количество клеток в стадии синтеза и митоза соответствовало контрольным значениям.

Как на 1-е, так и на 7-е сутки иммуногенеза регистрируемое количество тимоцитов в стадии апоптоза при иммунизации С-A179 было достоверно выше контрольных значений. Количество пролиферирующих тимоцитов на 1-е сутки иммуногенеза достоверно снижалось при иммунизации С-503 и С-A179 за счет уменьшения количества клеток в стадии митоза.

На 7-е сутки отмечалось снижение количества пролиферирующих тимоцитов при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса туляремиального микроба в сравнении с контролем (рис. 2), так же за счет уменьшения количества тимоцитов в митозе, хотя при иммунизации С-A179 отмечалось достоверное по сравнению с контрольными показателями увеличение количества тимоцитов в стадии синтеза. У белых мышей, иммунизированных С-*Acole*, на 7-е сутки иммуногенеза, в сравнении с 1-ми, отмечалось снижение уровня тимоцитов в стадии пролиферации за счет уменьшения количества клеток в митозе и увеличение числа диплоидных клеток.

На 14-е сутки иммуногенеза регистрировалось достоверное снижение в 2 раза количества тимоцитов в стадии апоптоза у белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179, по сравнению с контролем. Снижение количества тимоцитов в ста-

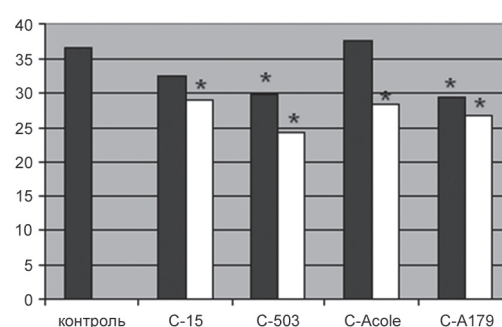


Рис. 2. Тимоциты в стадии пролиферации на 1-е и 7-е сутки иммуногенеза:

■ – 1-е сутки; □ – 7-е сутки; * – различия достоверны

дии апоптоза у белых мышей, иммунизированных C-Acole, было также двукратным, но недостоверным по сравнению с контрольными показателями. Однако в сравнении со значениями 7-х суток иммуногенеза, регистрировалось достоверное снижение уровня апоптотических тимоцитов, а также увеличение количества пролиферирующих тимоцитов за счет повышения уровня клеток в стадии митоза. У белых мышей, иммунизированных C-15, C-503 и C-A179, снижалось по сравнению с контролем количество пролиферирующих тимоцитов во всех случаях за счет уменьшения числа клеток в стадии митоза. У биомоделей, иммунизированных перечисленными препаратами, также возрастало количество диплоидных клеток.

К 21-м суткам после иммунизации описанные изменения сохранялись для тимоцитов белых мышей, иммунизированных C-15, C-503 и C-A179, и регистрировались у иммунизированных C-Acole в сравнении как с контрольными показателями, так и со значениями, отмечавшимися на 14-е сутки иммуногенеза. В то же время коэффициент отношения апоптотических клеток к пролиферирующим во всех случаях был меньше единицы, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемых препаратов на иммунокомпетентные клетки.

Таким образом, нами установлено неоднозначное влияние препаратов С-комплекса *F. tularensis* различных подвидов на распределение по клеточному циклу иммунокомпетентных клеток органов центральной и периферической иммунной системы биомоделей в ранние сроки наблюдения, что может быть обусловлено структурными особенностями антигенного комплекса, связанными с источником его получения. Возвращение всех регистрируемых показателей к контрольным значениям в последующие сроки с момента иммунизации (14 и 21-е сутки) свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемых препаратов на иммунокомпетентные клетки.

Работа выполнена по государственному контракту № 52-Д/1 от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Шепелев И.А., Фирстова В.В., Храмкова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. и др. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремии микроба, как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:16–21.
2. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофи-

лактики особо опасных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.

3. Топорков В.П., Величко Л.Н., Васенин А.С. Состояние заболеваемости туляремией в Федеральных округах Российской Федерации с 1998 по 2005 год. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):46–8.

4. Щуковская Т.Н., Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Козлова Е.А., Кутырев В.В. Модулирующее действие серотонина на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека, индуцированно-го иерсиниями. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 6:43–6.

5. Barlogie B., Spidzer G., Hart G.S., et al. DNA histogram analysis of human haemopoietic cells. Blood. 1976; 2(48):245–58.

6. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A. Humoral and Cell-Mediated Immunity in Mice to a 17-Kilodalton Lipoprotein of *Francisella tularensis* Expressed by *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 1992; 7(60):2855–62.

E.A.Smol'kova, T.N.Shchukovskaya, A.L.Kravtsov, E.M.Kuznetsova,
O.A.Volokh, A.K.Nikiforov

DNA Cytometry of Immunocompetent Cells of Biomodels under Conditions of Immunization by S-Complex Preparations of Different Tularemia Microbe Subspecies

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The effect of S-complex preparations of tularemia microbe upon apoptosis and proliferative activity of cells of central (thymus) and peripheral (spleen) organs of immune system has been studied in dynamics on the outbred white mice model. S-complex preparations were isolated from vaccine strain 15 NIEG of *holarctica* subspecies, virulent strain 503 of the same subspecies, strain Acole of *nearctica* subspecies and strain A 179 of *mediasiatica* subspecies. The ratio of cells being at different stages of cell cycle was shown to vary in different periods of time after immunization with the studied preparations. That can be associated with the structure of preparations depending on the source they were obtained from. All preparations demonstrated the lack of harmful effect upon genetic apparatus of white mice' immune cells. The application of the present antigenic complex in the construction of chemical vaccines of new generation is thought to be promising.

Key words: *Francisella tularensis*, antigens, immunocompetent cells, cytometry.

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

1. Volokh O.A., Shepelev I.A., Firsova V.V., Khramkova E.M., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. et al. [Evaluation of Immunobiological Activity of *Francisella tularensis* C complex preparations as promising component of subunit vaccines]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 3:16–21.
2. 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; 92:18–24.
3. Toporkov V.P., Velichko L.N., Vasenin A.C. [Present Status of Tularemia Morbidity in the Federal Districts of the Russian Federation from 1998 to 2005]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 93:46–8.
4. Shchukovskaya T.N., Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Kozlova E.A., Kutyrev V.V. [Modulating Effect of Serotonin on the Development of Human Leukocytes Apoptosis Induced by *Yersinia*]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 6:43–6.

Authors:

Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Kravtsov A.L., Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Кравцов А.Л., Кузнецова Е.М., Волох О.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 30.11.10.

А.Л.Кравцов, Т.П.Шмелькова, Т.Н.Щуковская

**ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОЧУМНОЙ ВАКЦИНАЦИИ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА**

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Важным показателем функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами, является секреторная дегрануляция нейтрофилов с высвобождением сериновых протеаз из гранул на поверхность клеток и во внеклеточное пространство. Методом проточной цитофлуориметрии в работе установлено, что гранулоциты крови лиц, привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ), отвечают дегрануляцией на контакт в условиях *in vitro* с аллергеном чумного микроба (микробным пестином), в отличие от гранулоцитов крови не вакцинированных людей. Степень активации клеток врожденного иммунитета по данному показателю зависела от срока, прошедшего после прививки. Полученные экспериментальные данные согласуются с современными представлениями о роли лейкоцитарных протеаз в развитии кожного аллергического воспаления и создают необходимую основу для дальнейших исследований, направленных на разработку быстрого инструментального теста оценки противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: чумной микроб, противочумный иммунитет, активация клеток врожденного иммунитета, дегрануляция нейтрофилов, проточная цитофлуориметрия.

У людей и животных, привитых живой чумной вакциной, а также у животных, выживших после заражения чумой, наблюдается повышенная чувствительность кожи к внутрикожному введению убитых клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ (микробный пестин). Развивающуюся кожную аллергическую реакцию используют в качестве показателя иммунитета при чуме [1]. Аллергическое воспаление тесно связано с функциональной активацией клеток врожденного иммунитета [7, 8, 12, 14], и альтернативой кожным пробам часто служат биологически безопасные методы оценки антибактериального иммунитета в условиях *in vitro*, основанные на выявлении особенностей морфологии активированных и поврежденных нейтрофилов [4], а также на количественном измерении степени дегенеративных изменений, развивающихся под влиянием специфического аллергена в ядерном хроматине и/или лизосомальных гранулах активированных нейтрофилов крови человека [4, 5]. Количественные методы цитологического анализа не применялись для изучения взаимодействия лейкоцитов цельной крови человека с аллергенами чумного микроба, и способы оценки противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro* в настоящее время не разработаны.

Анализ литературы за последнее десятилетие свидетельствует, что важным показателем функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами, является секреторная дегрануляция нейтрофилов с высвобождением сериновых лейкоцитарных протеаз из гранул на поверхность клеток и во внеклеточное пространство [6, 8]. Через 2 ч после внутрикожного введения аллергенов в коже человека резко повышается активность лейкоцитарной эластазы [14], являющейся биохимическим маркером воспалительного процесса [5–11]. Однако микробный пестин как индуктор деграну-

ляции нейтрофилов в образцах цельной крови лиц, привитых и не привитых ЖЧВ, не изучался. Целью работы явилось проведение таких сравнительных исследований с использованием быстрого проточно-цитофлуориметрического метода оценки интенсивности секреторной дегрануляции нейтрофилов крови человека.

Материалы и методы

В работе использовали дефибринированную кровь 17 человек: 12 доноров, накожно привитых ЖЧВ (3 млрд м.к.; вакцина серии 1 № 107) и 5 доноров, никогда не прививавшихся против чумы (группа сравнения). Группу вакцинированных делили на две подгруппы в зависимости от длительности срока, прошедшего после прививки, – от 1 до 4 (7 чел.) и от 12 до 18 месяцев (5 чел.).

Бактерии выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 48 ч, готовили в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) миллиардную взвесь по стандарту мутности ОСО-42-28-86П и убивали нагреванием при 100 °С в течение 30 мин. Эту взвесь для определения реакции гранул клеток врожденного иммунитета смешивали с цельной кровью человека в соотношении 1:1. Контролем служила кровь, в которую добавляли ЗФР без аллергена пестина. Опытные и контрольные образцы инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч. По истечении срока инкубации 100 мкл каждого образца добавляли к 3 мл раствора красителя (2 мкг акридинового оранжевого (АО) /мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 0,15 М NaCl) для суправитальной окраски лизосомальных гранул лейкоцитов в течение 8 мин при комнатной температуре [13]. Измерение в отдельных лейкоцитах интенсивности красной флуоресценции первичных гранул с эластазной активностью проводили со скоростью

500 кл./с на проточном цитофлуориметре ICP-22 PNYWE (Германия). Из распределений отдельных лейкоцитов по содержанию лизосом на клетку рассчитывали относительное содержание в крови гранулоцитов [13], а также долю гранулоцитов (в %), находящихся в состоянии секреторной азурофильной дегрануляции [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия *t* Стьюдента. Данные представляли в виде средней арифметической величины (*M*) и ошибки средней арифметической ($\pm m$). Различия считали достоверными при $P < 0,05$ [3].

Результаты и обсуждение

Оценивать степень нарушения стабильности лизосомальных мембран гранулоцитов крови человека (дегрануляцию) при воспалительных заболеваниях инфекционной и неинфекционной этиологии можно по уровню высвобождаемой из клеток протеолитической (эластазной) активности, либо более быстрым альтернативным способом – по снижению уровня аккумуляции в первичных гранулах нейтрофилов крови красителя АО. С помощью проточной цитофлуориметрии, микроскопии и биохимических методов анализа было установлено, что альтернативный цитологический показатель интенсивности дегрануляции строго коррелирует с высвобождением из гранул молекул лейкоцитарной эластазы и, как следствие, с повышением внеклеточной протеолитической активности [5].

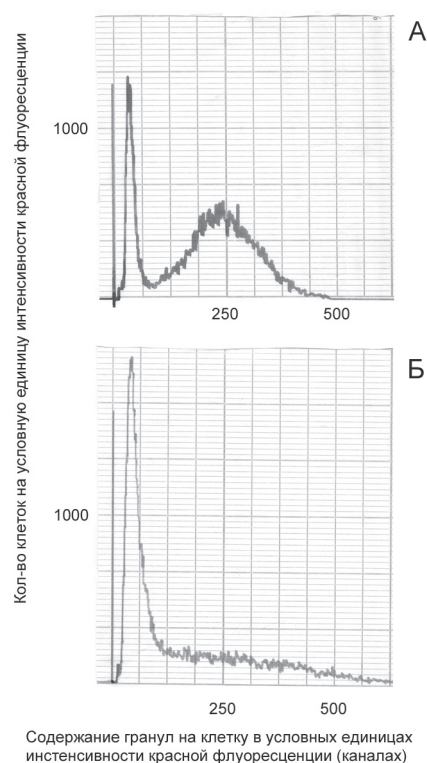
Изменение состояния лизосомальных гранул лейкоцитов крови одного из доноров, привитых ЖЧВ, под влиянием аллергена чумного микроба в условиях *in vitro* представлено на рисунке. Видно, что, когда аллерген в крови отсутствует, гранулоциты аккумулируют в первичных гранулах большое количество молекул АО и по интенсивности красной флуоресценции автоматически учитываются цитометром в области от 150 до 350 условных единиц (каналов). Контрольная гистограмма (А) иллюстрирует хорошо известную способность метода проточной цитофлуориметрии осуществлять быстрый мониторинг состояния лизосомального аппарата гранулоцитов непосредственно в цельной крови человека, без удаления эритроцитов, лимфоцитов и моноцитов [13]. Пик справа на контрольной гистограмме (А) соответствует, в основном, нейтрофилам [2], так как доля этих клеток в суммарной популяции гранулоцитов крови человека составляет более 95 % [8].

Аллерген чумного микроба вызывал дегрануляцию нейтрофилов – нарушение стабильности первичных гранул с эластазной активностью в гранулоцитах крови человека (гистограмма Б). О развитии в отдельных клетках процесса секреторной дегрануляции свидетельствовала утрата способности первичных гранул адсорбировать молекулы АО [5]. Доля гранулоцитов с исходно высокой степенью аккумуляции в гранулах АО в крови уменьшалась и, соот-

ветственно, повышалась доля клеток, обладающих после окраски АО слабой интенсивностью свечения в красной области спектра (от 0 до 150 условных единиц). На опытной гистограмме (Б) слабая интенсивность красной флуоресценции была характерна для лимфоцитов, моноцитов и активированных (дегранулированных) нейтрофилов [2], в то время как на контрольной гистограмме (А) – это только лимфоциты и моноциты [2, 13].

Способность аллергена чумного микроба активировать секреторную функцию нейтрофилов крови человека в условиях *in vitro* зависела от длительности срока, прошедшего после вакцинации и в подгруппе со сроком от 1 до 4 мес. была зарегистрирована более интенсивная активация клеток по данному показателю ($P < 0,001$), чем в подгруппе со сроком от 12 до 18 мес. В тех же условиях (через 2 ч инкубации крови при температуре 37 °С) нейтрофилы крови лиц, не привитых ЖЧВ, не отвечали дегрануляцией на контакт с аллергеном чумного микроба (таблица).

Известно, что непривитые фактически не реагируют на внутрикожное введение микробного пестина, и повышенная реактивность кожи к аллергену чумного микроба отчетливо выражена только тогда, когда есть основание предполагать наличие в организме выраженного противочумного иммунитета [1]. Полученные нами данные косвенно свидетельствуют, что продукты секреторной дегрануляции



Дегрануляция клеток врожденного иммунитета человека (гранулоцитов крови) под влиянием аллергена чумного микроба (пестина):

А – кровь без аллергена чумного микроба, которая содержит около 60 % гранулоцитов (преимущественно нейтрофилов); Б – кровь того же донора, привитого ЖЧВ, через 2 ч после добавления в нее микробного пестина

Влияние противочумной вакцинации на интенсивность дегрануляции клеток врожденного иммунитета, активированных аллергеном чумного микроба в образцах цельной крови человека

Образцы крови	Доля гранулоцитов в состоянии дегрануляции, ($M \pm m$) %
Через 1–4 мес после прививки ЖЧВ	49,2 $\pm$ 3,6*
Через 12–18 мес после прививки ЖЧВ	20,3 $\pm$ 5,9**
Невакцинированные	2,7 $\pm$ 1,1

*Уровень достоверности различий с группой сравнения $P < 0,001$;

** $P < 0,05$.

нейтрофилов могут участвовать в развитии кожной воспалительной реакции на месте внедрения аллергена чумного микроба.

При изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе развития аллергического воспаления, было установлено, что специфические аллергены активируют нейтрофилы крови сенсибилизированного организма через три типа поверхностных рецепторов к IgE (FcεRI, FcεRII/CD23 и Mac-2/εBP), запуская характерную дегрануляцию этих клеток с высвобождением лейкоцитарной эластазы из первичных (азурофильных) гранул [10]. Сериновые лейкоцитарные протеазы (эластаза, катепсин G и протеаза 3) являются триггерами и ключевыми регуляторами воспаления, что позволяет использовать интенсивность секреторной дегрануляции нейтрофилов в качестве показателя функциональной активации клеток врожденного иммунитета при воспалительных реакциях, индуцируемых специфическими аллергенами и бактериальными липополисахаридами [5, 6, 8, 10, 14].

Установлено, что лейкоцитарные протеазы сигнализируют о запуске в организме воспалительного процесса и иммунного ответа путем протеолитической активации специальных рецепторов (proteinase-activated receptors-PARs), экспрессируемых на поверхности тромбоцитов, лейкоцитов крови и макрофагов, а также эпителиальных, эндотелиальных, тучных и многих других клеток врожденного иммунитета [12]. Кроме того, они осуществляют тонкую регуляцию интенсивности инфекционного воспаления, модулируя продукцию и активность провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и др.), а также экспрессию и функцию клеточных рецепторов, ответственных за распознавание бактериальных липополисахаридов и иммунных комплексов (CD14, TLR4, FcR и др.) [6]. В частности, для активации и функционирования TLR4 клеток врожденного иммунитета и развития в организме под влиянием ЛПС синдрома системного воспалительного ответа требуется расщепление гепаран сульфата протеогликана субэндотелиального матрикса эндотелия сосудов лейкоцитарной эластазой [11].

Недавно установлен и подробно описан молекулярный механизм, с помощью которого лейкоцитарные протеазы (эластаза и протеаза 3) усиливают внутрикожное аллергическое воспаление [7]: «при-

мированные» цитокинами нейтрофилы при выходе из сосудистого русла высвобождают протеазы из гранул на клеточную поверхность, а также выделяют в околоклеточную среду супрессор кожного воспаления програнулин; активация нейтрофилов на начальном этапе их миграции в очаг воспаления полностью подавляется избыточным количеством програнулина, продуцируемого также кератиноцитами и кожными эпителиальными клетками; при высокой внутрикожной концентрации специфических иммунных комплексов (антиген-IgE) развивается интенсивная дегрануляция нейтрофилов с гиперсекрецией лейкоцитарных протеаз во внеклеточное пространство, что приводит к быстрому расщеплению супрессора воспаления и, как следствие, к развитию внутрикожной аллергической воспалительной реакции.

Таким образом, полученные в работе экспериментальные данные согласуются с современными представлениями о молекулярных механизмах развития инфекционного воспаления и в состоянии объяснить феномен повышенной чувствительности кожи лиц, привитых ЖЧВ, к микробному пестину. Они создают основу для дальнейших исследований, направленных на разработку быстрого инструментального теста оценки приобретенного противочумного иммунитета у людей в условиях *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коробкова Е.И. Кожная аллергическая реакция как показатель иммунитета при чуме. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.. 1955; 4:40–7.
2. Кравцов А.Л., Бобылева Е.В., Шмелькова Т.П., Куляш Ю.В. Развитие азурофильной дегрануляции нейтрофилов в крови человека, инфицированной *in vitro* стафилококком: эффект микробной нагрузки по данным проточной цитофлуориметрии. В кн.: Актуальные проблемы патологии. Межвуз. сб. науч. работ. Саратов; 2001. С.102–7.
3. Монцевичюте-Эрингене Е.В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 1964; 4:71–8.
4. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М.: Медицина; 1985.
5. Abrams W.R., Diamond L.W., Kane A.B. A flow cytometric assay of neutrophil degranulation. J. Histochem. Cytochem. 1983; 31:734–44.
6. Bank U., Ansorge S. More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control. J. Leukocyte Biology. 2001; 69:197–206.
7. Kessenbrock K., Frohlich L., Sixt M. et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating anti-inflammatory progranulin. J. Clin. Invest. 2008; 118:2438–47.
8. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2005; 53:505–17.
9. Lammers A. M., Van de Kerkhof P.C.M., Schalwijk J., Mier P.D. Elastase, a marker for neutrophils in skin infiltrates. British J. Dermatology. 2006; 115:181–6.
10. Monteseirin J., Bonilla I., Camacho M. J. et al. Specific allergens enhance elastase release in stimulated neutrophils from asthmatic patients. Int. Arch. Allergy Immunol. 2003; 131:174–81.
11. Rosenberg H.F. Toll-like receptors, endogenous ligands, and constitutive control (or, why I'm still standing at the podium): an interview with Dr. Jeffrey L. Platt. J. Leukocyte Biology. 2007; 82:286–7.
12. Steinhoff M., Buddenkotte J., Shpacovitch V. et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. Endocrine Reviews. 2005; 26:1–43.
13. Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. Methods in Cell Biology. 1994; 41:185–94.
14. Zweiman B., Kucich U., Shalit M. et al. Release of lacto-

ferrin and elastase in human allergic skin reactions. J. Immunology. 1990; 144:3953–60.

A.L.Kravtsov, T.P.Shmelkova, T.N.Shchukovskaya

Influence of the Anti-Plague Vaccination on the Functional Activity of Human Innate Immunity Cells

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The essential index of functional activity of innate immunity cells in inflammatory reactions, induced by specific allergens, is the secretory neutrophils degranulation with the release of serine proteases from granules on the cells' surface and into the extracellular space. Using flow cytofluorimetry blood granulocytes of persons, immunized with live plague vaccine, were shown to respond to *in vitro* contact with allergen of plague microbe (pestin) by degranulation, in contrast to those of unvaccinated people. The degree of the innate immunity cells activation, as regards this index, depends on the time period passed after the vaccination. The received experimental data agree with modern conceptions on the leukocytic proteases' role in the development of allergic inflammation of skin. They also provide the necessary basis for further investigations, required to develop rapid instrumental test for human anti-plague immunity assessment *in vitro*.

Key words: plague microbe, anti-plague immunity, innate immunity cells activation, neutrophils degranulation, flow cytofluorimetry.

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

1. Korobkova E.I. [Cutaneous Allergic Response as the Index of Immunity in Plague]. Zh. Microbiol., Epidemiol., Immunobiol. 1955; 4:40–7.
2. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Shmel'kova T.P., Kulyash Yu.V. [Development of Azurophilic Degranulation in Human Neutrophils Infected *in Vitro* with Staphylococcus: Effect of Microbial Load according to the Data Obtained by Flow Cytofluorimetry]. In: Aktual'nye Problemy Patologii. Mezhdvuz. Sborn. Nauch. Rabot. Saratov; 2001. P. 102–7.
3. Montsevichute-Eringe E.V. [Simple Mathematic Statistical Methods in Medical Research Work]. Zh. Patol. Physiolog. i Eksperiment. Terapiya. 1964; 4:71–8.
4. Fradkin V.A. [Diagnostic of Allergy by Reactions of Blood Neutrophils]. M.: Medicine; 1985.

Authors:

Kravtsov A.L., Shmelkova T.P., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кравцов А.Л., Шмелькова Т.П., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 07.02.10.

УДК 616.981.452:976.8.097.3

Е.В.Кравец¹, З.Ф.Дугаржапова¹, А.В.Родзиковский¹, А.Е.Хлынцева², Н.М.Лунева², Е.В.Белова²,
Н.В.Колосова², С.Ю.Рудницкий², П.В.Соловьев², Е.В.Баранова², С.Ф.Бикетов²

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КУЛЬТУР *BACILLUS ANTHRACIS* ПРИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РАССЛЕДОВАНИЯХ ВСПЫШЕК

¹ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ»,

²ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Проведена апробация экспериментальных серий тест-систем латекс-агглютинации и иммунохроматографии для идентификации спор и вегетативных клеток *Bacillus anthracis*, соответственно. Тест-системы пригодны для ускоренной диагностики сибирской язвы и обладают рядом преимуществ перед уже существующими коммерческими тестами.

Ключевые слова: сибирская язва, экспресс-методы, латекс-агглютинация, иммунохроматография.

В настоящее время в научных лабораториях многих стран постоянно разрабатываются и совершенствуются диагностические технологии для индикации и идентификации особо опасных этиологических агентов, одним из которых является и сибиреязвенный микроб (*Bacillus anthracis*). Для проведения эффективного мониторинга сибирской язвы необходима активная разработка новых методов, создание высокочувствительных тест-систем и диагностических препаратов. Наиболее актуальным направлением является разработка и совершенствование молекулярно-генетических и других методов ускоренной лабораторной диагностики [3, 4]. Роль экспресс-методов в диагностике особо опасных инфекционных болезней значима и особенно ценна при расследовании актов биотерроризма, спорадических случаев и вспышек среди людей и животных. При расшифровке вспышки сибирской язвы в Баргузинском районе Республики Бурятия в 2008 г. успешно применен целый комплекс методов экспресс-диагностики (молекулярно-генетический (ПЦР), иммунофлуоресцентный (МФА), бактериоскопический). Благодаря чему в ранние сроки (через 3–5 ч от начала исследования) удалось подтвердить клинический диагноз «сибирская язва» у заболевших людей, выявить источник инфекции (больное животное), определить фактор передачи (мясо) и оперативно доказать неблагополучную эпизоотолого-эпидемиологическую ситуацию на данной территории [1, 2].

Основное направление исследований по разработке тестов экспресс-диагностики ориентировано не только на сокращение времени учета результатов, повышение чувствительности, специфичности и воспроизводимости анализа, но и на максимальную простоту постановки реакций и сокращение энерго- и трудозатрат. Одними из последних примеров подобных разработок являются экспериментальные образцы «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» и

«Набор реагентов для быстрой идентификации вегетативной формы возбудителя сибирской язвы (Тест-полоска *B. anthracis*)», сконструированные в ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Принцип работы латексного диагностикума основан на специфическом взаимодействии спор *B. anthracis* с моноклональными антителами (МКА), сорбированными на латексе, что приводит к агглютинации латексных частиц. Учет результатов проводят визуально по четырехкрестовой системе. Чувствительность при выявлении спор *B. anthracis* методом латексной агглютинации составляет $2 \cdot 10^6$ спор/мл. Латексный сибиреязвенный диагностикум не выявляет гетерологичные культуры рода *Bacillus* в споровой форме в концентрации $2,5 \cdot 10^8$ спор/мл и ниже.

Иммунохроматографические тесты (ИХТ) – портативные индикаторные полоски – «стрипы». Принцип действия иммунохроматографического стрип-теста для выявления антигена состоит в том, что после погружения стрипа в суспензию (раствор) исследуемого материала, содержащего целевой антиген, происходит его связывание с первыми, мечеными коллоидным золотом, антителами. Коллоидное золото позволяет визуализировать образовавшиеся иммунные комплексы в виде полосы в тест-зоне индикаторной полоски. Учет результата проводят визуально через 15–20 мин. «Тест-полоска *B. anthracis*» обладает чувствительностью 10^9 м.к./мл и высоким уровнем специфичности – при использовании микробных взвесей штаммов близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* были получены только отрицательные результаты.

В июле 2010 г. в Тюкалинском районе Омской области зарегистрирована эпизоотия сибирской язвы с эпидемическими осложнениями. Из крови больного генерализованной формой сибирской язвы врачами-бактериологами ФГУЗ «Центр гигиены и

эпидемиологии в Омской области» была выделена культура, предположительно *B. anthracis*. Для дальнейшей идентификации культура направлена в ФГУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ. Для изучения культуры использованы различные методы лабораторной диагностики (ПЦР в «реальном времени», МФА, бактериоскопический, бактериологический, биологический), в том числе и реакция латекс-агглютинации и иммунохроматография. Результаты лабораторной диагностики однозначно подтвердили принадлежность исследуемой культуры к *B. anthracis*. Образцы экспериментальных тест-систем явились дополнением к комплексу уже существующих коммерческих тестов, обозначив при этом такие свои несомненные преимущества, как быстрота постановки и учета результатов, относительная дешевизна из-за малого состава набора реагентов и отсутствия необходимости в специальных приборах. К недостаткам тест-систем следует отнести некоторую субъективность оценки результатов в спорных моментах, что, безусловно, не является причиной для отказа от их использования, поскольку окончательный ответ дается на основании результатов, полученных комплексом методов лабораторной диагностики.

Испытанные экспериментальные серии тест-систем для ускоренной диагностики сибирской язвы могут быть внедрены в практическую работу для идентификации возбудителя сибирской язвы.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д/2 от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Мосорова А.В., Иванова Т.А., Кравец Е.В., Юзвик Л.Н., Колесникова О.Б. и др. Экспресс-диагностика сибирской язвы во время вспышки в Баргузинском районе Республики Бурятия. Журн. инф. патол. 2009; 16(1):31.
2. Балахонов С.В., Болошинов А.Б., Дугаржапова З.Ф., Шобоева Р.С., Родзиковский А.В., Иванова Т.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Республике Бурятия. Дез. дело. 2009; 2:44–7.
3. Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Молекулярные аспекты изучения возбудителей особо опасных бактериальных инфекций (обзор). Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:54–68.
4. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербак С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В. Актуальные направления

совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(99):5–10.

E.V.Kravets, Z.F.Dugarzhapova, A.V.Rodzikovskiy, A.E.Khlyntseva, N.M.Luneova, E.V.Belova, N.V.Kolosova, S.Yu.Rudnitsky, P.V.Solov'ev, E.V.Baranova, S.F.Biketov

Application of Latex Agglutination and Immune Chromatography Methods for Rapid Identification of *Bacillus anthracis* Cultures in the Epidemiological Investigation of Outbreaks

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East; State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Approbation of the experimental series of latex agglutination and immune chromatography test-systems was carried out for identification of *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells respectively. These test-systems are suitable for rapid diagnostics of anthrax and have a number of advantages over already-existing commercial tests.

Key words: anthrax, rapid tests, latex agglutination, immune chromatography.

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

1. Balakhonov S.V., Mosorova A.V., Ivanova T.A., Kravets E.V., Yuzvik L.N., Kolesnikova O.B. et al. [Express-Diagnostics of Anthrax during the Outbreak in the Barguzinsky District of the Republic of Buryatia]. Zh. Infek. Patol. 2009; 16(1):31.
2. Balakhonov S.V., Boloshinov A.B., Dugarzhapova Z.F., Shoboeva R.S., Rodzikovskiy A.V., Ivanova T.A. et al. [Epidemiological Situation on Anthrax in the Republic of Buryatia]. Dез. Delo. 2009; 2:44–7.
3. Yeroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Molecular Aspects of Studying of Particularly Dangerous Infections]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; 86:54–68.
4. Onishchenko G.G., Kouzkin B.P., Kutyrev V.V., Scherbakova S.A., Pakskina N.D., Toporkov A.V. [Current Trends of Perfection of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 99:5–10.

Authors:

Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Rodzikovskiy A.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Kolosova N.V., Rudnitsky S.Yu., Solov'ev P.V., Baranova E.V., Biketov S.F. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Колосова Н.В., Рудницкий С.Ю., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Бикетов С.Ф. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 18.01.11.

**О ВСЕРОССИЙСКОМ СЕМИНАРЕ ЗООЛОГОВ
ПО ВОПРОСАМ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМИ
ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

В соответствии с пунктом 5.3.9. Плана основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2010 г. и Приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 291 от 21.07.2010 г., 24–25 ноября 2010 г. в Воронеже состоялся всероссийский семинар зоологов. Целью семинара было освещение вопросов модернизации и совершенствования медико-биологических исследований, необходимых для эффективного эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации.

В качестве основных рассмотрены следующие вопросы:

1. Роль эколого-эпизоотологического мониторинга в комплексе эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Российской Федерации.

2. Современная нормативно-методическая база организации эпизоотологических исследований и неспецифической профилактики заболеваний в природных очагах инфекционных болезней.

3. Совершенствование материально-технической базы и методов эпизоотологического обследования природных очагов инфекционных болезней.

В семинаре приняли участие 109 специалистов, представляющих учреждения Роспотребнадзора в 58 субъектах Российской Федерации. К работе семинара были привлечены ведущие эпидемиологи, эпизотологи и экологи из ИПВЭ РАМН им. М.П.Чумакова, ИПЭиЭ РАН им. А.Н.Северцова, РосНИПЧИ «Микроб», руководящие специалисты Федерального центра гигиены и эпидемиологии, Противочумного центра. В течение 2 дней было заслушано 17 сообщений, состоялось обсуждение проблем, связанных с подготовкой кадров, организационным и материально-техническим обеспечением зоологических исследований, необходимостью повышения их уровня, совершенствования нормативно-методической базы.

На семинаре было отмечено, что в настоящее

время проводится большой объем полевых и лабораторных исследований, позволяющих отслеживать активность природных, природно-антропургических и антропургических очагов опасных природно-очаговых инфекционных болезней, состояние популяций животных, их резервуаров и переносчиков, на территории Российской Федерации. Дальнейшее совершенствование эпизоотологического обеспечения эпидемиологического надзора, ориентированного на снижение заболеваемости опасными природно-очаговыми инфекционными болезнями в Российской Федерации, требует модернизации работы зоологических формирований учреждений Роспотребнадзора, осуществляющих эпизоотологическое наблюдение в природных очагах инфекций.

Она предусматривает:

- укомплектование квалифицированными кадрами зоологов;

- укрепление материально-технической базы зоогрупп;

- усиление эпидемиологической направленности работ эколого-эпизоотологического профиля (выявление факторов, времени, места и контингентов риска заболевания природно-очаговыми инфекционными болезнями);

- создание базы данных для типизации и районирования природных очагов инфекционных болезней с применением современных компьютерных технологий;

- разработку и внедрение унифицированных форм отчетности для краткосрочного и среднесрочного прогнозирования эпидемиологической обстановки;

- разработку и внедрение в практику современных методов неспецифической профилактики опасных природно-очаговых инфекционных болезней.

На семинаре определены основные направления по совершенствованию обследовательских и профилактических мероприятий, призванных обеспечить эпидемиологическое благополучие населения на территории России.

**ПАМЯТИ БОРИСА ФЕДОРОВИЧА СЕМЕНОВА
(1929 – 2010)**



15 декабря 2010 г. скончался Борис Федорович Семенов, академик Российской академии медицинских наук, член Международной академии наук, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РСФСР, лауреат Премий Совета Министров

СССР и Правительства Российской Федерации.

Ушел из жизни один из патриархов отечественной медицинской науки, выдающийся ученый, крупный специалист в области иммунологии и вакцинологии, талантливый педагог, известный общественный деятель.

Борис Федорович Семенов более 30 лет возглавлял Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, был главным редактором Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии и бюллетеня «Вакцинация», председателем правления Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов им. И.И.Мечникова, председателем Научного совета РАМН по вакцинологии.

С именем Б.Ф.Семенова неразрывно связаны такие успехи отечественной медицины, как создание технологии рестриктирующих ферментов для исследований в молекулярной биологии и геной инженерии, тест-систем для скрининга и подтверж-

дения ВИЧ-инфекции, методов коррекции вторичных иммунодефицитов разного происхождения. Огромный вклад внесен им в разработку, научное обоснование и внедрение системы защиты населения Российской Федерации от биологических угроз. Фундаментальные научные труды Б.Ф.Семенова, посвященные клеточным и молекулярным основам иммунитета, стали учебными пособиями для исследователей и врачей. Свой богатейший опыт он передавал молодому поколению врачей и ученых, возглавляя курс «Вакцинопрофилактика» на базе НИИ им. И.И.Мечникова.

Заслуги Б.Ф.Семенова перед отечественной медицинской наукой и здравоохранением были по достоинству оценены Родиной – он награжден орденом Почета, орденом «За заслуги перед Отечеством IV степени», рядом медалей.

Борис Федорович Семенов уделял большое внимание деятельности научно-исследовательских противочумных институтов, работе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации Роспотребнадзора и РАМН, оказывал неоценимую помощь и поддержку.

Отечественная медицина понесла тяжелую утрату. В лице Бориса Федоровича Семенова мы потеряли прекрасного ученого, талантливого организатора и педагога, обаятельного интеллигентного человека.

Светлый образ Бориса Федоровича Семенова сохранится в памяти его благодарных учеников, соратников и друзей.