

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 1968 году

Главный редактор академик 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(111)

март · 2012

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

З.Л.Девдариани, докт. мед. наук, профессор
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук
Т.Б.Караваяева (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.А.Антонов, докт. мед. наук, профессор (Волгоград)
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва)
С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск)
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад)
И.В.Борисевич, докт. мед. наук, профессор (Москва)
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Оболensk)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, академик РАМН (Саратов)
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
А.Б.Мазрухо, канд. мед. наук (Ростов-на Дону)
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
А.Н.Сергеев, докт. мед. наук, профессор (Кольцово)
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)

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

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

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2012

March 2012, Issue 111

Problems of Particularly Dangerous Infections

Scientific and Practical Journal
Issued quarterly. Founded in 1968

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

Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

Editorial Council

Antonov V.A., Doctor of Medical Science, Professor (Volgograd)
Bezsmertny V.E., Candidate of Medical Science (Moscow)
Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science (Sergiev Possad)
Borisevich I.V., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Corresponding Member
of the RAMS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
Kutyrev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Saratov)
L'vov D.K., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Mazrukho A.B., Candidate of Medical Science (Rostov-on-Don)
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Sergeev A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Koltsovo)
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)

Editorial Office Address:

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

Подписной индекс в каталоге «Почта России» – 24687

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

Адрес редакции: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru. Сайт: microbe.rospotrebnadzor.ru
Зав. редакцией Л.С.Пронина. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. Март 2012. Вып. 111. 1–104
Редактор Т.А.Поршакова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваяевой, А.П.Рыжовой, А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 02.03.12. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,8. Гарнитура Таймс. Заказ 196
Журнал отпечатан в ООО «ИППО/ЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Обзоры и прогнозы

Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Попов В.П., Вержущий Д.Б., Немченко Л.С., Шилова Л.Д., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Адамов А.К., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2011 г. и прогноз на 2012 г.

5

Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне

11

Антонов В.А., Смоленский В.Ю., Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Смелянский В.П., Яковлев А.Т., Мананков В.В., Погасий Н.И., Красовская Т.Ю. Эпидемиологическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2011 году на территории Российской Федерации и прогноз ее развития

17

Василенко Н.Ф., Смоленский В.Ю., Волюнкина А.С., Варфоломеева Н.Г., Заикина И.Н., Малецкая О.В., Ашибокhov У.М., Тохов Ю.М., Ермаков А.В., Куличенко А.Н. Особенности эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2011 г.

22

Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Русанова Д.В., Головнёва С.И., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Об эпидемической ситуации и заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2011 г. и прогноз на 2012 г.

26

Носков А.К., Никитин А.Я., Пакскина Н.Д., Сидорова Е.А., Чеснокова М.В., Андаев Е.И. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации (2009–2011 гг.) и прогноз на 2012 г.

30

Окунев Л.П., Мазепа А.В., Чеснокова М.В., Вержущий Д.Б. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация в природных очагах туляремии Сибирского и Дальневосточного федеральных округов в 2011 г. и прогноз на 2012 г.

34

Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Аксенова Л.Ю., Цыганкова О.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости сибирской язвой в 2011 г. и прогноз на 2012 г.

37

Эпидемиология

Дубянский В.М., Малецкая О.В. Методика оценки биологической опасности внутренних и внешних угроз в субъекте Российской Федерации

39

Кол Н.А., Чульдун А.Ф., Ростовцев М.Г., Калущ Ю.А. Линейные регрессионные модели для описания многолетнего эпизоотического процесса (Каргинский участок Тувинского природного очага чумы)

43

Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Куклев Е.В., Коротков В.Б., Мезенцев В.М., Попов Н.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Перспективы ГИС-паспортизации природных очагов чумы Российской Федерации

48

Микробиология

Говорунова В.А., Говорунов И.Г., Фирстова В.В., Зырина Е.В. Исследование взаимодействия бромистого этидия с клетками бактерий рода *Yersinia* в лиофилизированных/регидратированных препаратах

54

Reviews and Prognoses

Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Knyzeva T.V., Popov V.P., Verzhutsky D.B., Nemchenko L.S., Shilova L.D., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Adamov A.K., Kutyrev V.V. Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D. Cholera in the Early XXI Century: Global Prognosis

Antonov V.A., Smolensky V.Yu., Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Smelyansky V.P., Yakovlev A.T., Manankov V.V., Pogasy N.I., Krasovskaya T.Yu. West Nile Fever Epidemic Situation in the Russian Federation Territory in 2011 and Prognosis of its Development

Vasilenko N.F., Smolensky V.Yu., Volynkina A.S., Varfolomeeva N.G., Zaikina I.N., Maletskaya O.V., Ashibokov U.M., Tokhov Yu.M., Ermakov A.V., Kulichenko A.N. Peculiar Aspects of Epidemiological Situation on Crimean Hemorrhagic Fever in the Russian Federation in 2011

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Rusanova D.V., Golovneva S.I., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. Brucellosis Epidemiological Situation and Its Morbidity in the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

Noskov A.K., Nikitin A.Ya., Pakskina N.D., Sidorova E.A., Chesnokova M.V., Andaev E.I. Epidemiological Situation on the Tick-Borne Viral Encephalitis in the Russian Federation in 2009–2011 and Prognosis for 2012

Okunev L.P., Mazepa A.V., Chesnokova M.V., Verzhutsky D.B. Epizootiological-and-Epidemiological Situation in Natural Tularemia Foci of the Siberian and Far Eastern Federal Districts in 2011, and Prognosis for 2012

Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova E.A., Aksenova L.Yu., Tsygankova O.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Kulichenko A.N. Analysis of the Anthrax Morbidity Rate in the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

Epidemiology

Dubyansky V.M., Maletskaya O.V. Method of Biohazard Evaluation Regarding Internal and External Threats at the Level of Constituent Entity of the Russian Federation

Kol N.A., Chul'dum A.F., Rostovtsev M.G., Kalush Yu.A. Linear Regression Models Used for the Description of Long-Term Epizootic Process in Tuvian Natural Plague Focus (Karginsk Mezofocus)

Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Kuklev E.V., Korotkov V.B., Mezentsev V.M., Popov N.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Prospects of GIS-Passportization of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation

Microbiology

Govorunova V.A., Govorunov I.G., Firstova V.V., Zyrina E.V. Investigation of Ethidium Bromide Interaction with *Yersinia* Bacterial Cells in Lyophilized/Rehydrated Preparations

Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эль-тор

57

Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Мазрухо А.Б., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Изучение биологического действия цитотонического фактора CEF холерных вибрионов на моделях *in vitro* и *in vivo*

62

Шишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Влияние дождевых червей на находящиеся в почве споры сибиреязвенного микроба

66

Диагностика

Гришина М.А., Кочубеева Е.Н., Вьючнова Н.В., Антонов В.А., Ткаченко Г.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Лабораторная диагностика кокцидиомикоза

70

Шпынов С.Н., Полещук Е.М., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Кумпан Л.В., Коломеев А.Н., Сидоров Г.Н., Ткачев С.Е., Грибенча С.В. Применение молекулярных методов типирования при изучении штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки и вируса бешенства

77

Иммунология, патогенез

Микеров А.Н. Факторы, участвующие в модулировании механизмов иммунной защиты легких при пневмонии

81

Попова П.Ю., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Новикова Л.В., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А., Смолькова Е.А., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н. Влияние протективного антигена, синтезируемого аспорогенным рекомбинантным штаммом *Bacillus anthracis*, на иммунную систему экспериментальных животных

84

Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юрганова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян

88

Краткие сообщения

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Патогенетическое обоснование принципов депотенцирования летального эффекта токсинов *Yersinia pestis*

92

Кочетов Е.Н., Богачева А.И., Андрущенко Ю.В. Подготовка специализированных формирований ЦГиЭ в Республике Мордовия

94

Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Никифоров А.К. Создание и функционирование системы менеджмента качества производства МИБП в РосНИПЧИ «Микроб»

96

Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В., Данчинова Г.А. Находка клеща *Amblyomma americanum* L., 1758 в Восточной Сибири (Россия)

99

Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Шарапова Н.А., Валова Т.В., Кутырев В.В. Разработка ПЦР с универсальными праймерами для выявления различных вариантов гена *tcpA*

102

Правила для авторов

104

Zadnova S.P., Shashkova A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Phenotypic and Genetic Analysis of Altered Variants of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor

Monakhova E.V., Fedorenko G.M., Mazrukho A.B., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Markina O.V., Alekseeva L.P. Study of Biological Effect of CHO-Cell Elongating Factor of *Vibrio cholerae* on Models *in vitro* and *in vivo*

Shishkova N.A., Marinin L.I., Mokrievich A.N. Interaction between Earthworms and Soil-Inhabiting Anthrax Microbe Spores

Diagnostics

Grishina M.A., Kochubeeva E.N., V'yuchnova N.V., Antonov V.A., Tkachenko G.A., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V. Laboratory Diagnostics of Coccidioidomycosis

Shpynov S.N., Poleshchuk E.M., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Kolomeets A.N., Sidorov G.N., Tkachev S.E., Gribencha S.V. Application of Molecular Typing Methods for Analysis of Strains of Rickettsiae of the Spotted Fever Group and Rabies Virus

Immunology, Pathogenesis

Mikerv A.N. Factors Participating in Modulating the Mechanisms of Immune Protection of Lungs during Pneumonia

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Novikova L.V., Kashtanova T.N., Popov Yu.A., Smol'kova E.A., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N. Influence of the Protective Antigen, Produced by *Bacillus anthracis* Asporogenic Recombinant Strain, on the Immune System of Laboratory Animals

Sergeev Al.A., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev Ar.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Tumanov Yu.V., Yurganova I.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Sensitivity of Different Animal Species to Monkeypox Virus

Brief Communications

Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P. Pathogenetic Grounds of Principles of Depotentiation of Lethal Effects *Y. pestis* toxins

Kochetov E.N., Bogacheva A.I., Andrushchenko Yu.V. Training of Specialized Teams of Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia

Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Nikiforov A.K. Development and Implementation of the Quality Management System as Applied to the Production of Medical Immunobiological Preparations at the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Lyapunov A.V., Khasnatinov M.A., Arbatskaya E.V., Danchinova G.A. Findings of *Amblyomma americanum* L., 1758 in the Territory of Eastern Siberia (Russia)

Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Sharapova N.A., Valova T.V., Kutyrev V.V. Development of the PCR Assay with Universal Primers for the Detection of Different *tcpA* Gene Variants

Instruction to Authors

УДК 616.981.452(471)

Н.В.Попов¹, В.Е.Безсмертный², А.Н.Матросов¹, А.А.Кузнецов¹, Т.В.Князева¹, В.П.Попов²,
Д.Б.Вержущий³, Л.С.Немченко³, Л.Д.Шилова¹, В.М.Дубянский⁴, О.В.Малецкая⁴, В.П.Топорков¹,
А.В.Топорков¹, А.К.Адамов¹, В.В.Кутырев¹

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2011 г. И ПРОГНОЗ НА 2012 г.

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

²ФКУЗ «Противочумный центр Роспотребнадзора», Москва; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск;

⁴ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Обобщены данные по состоянию численности основных носителей и переносчиков и эпизоотической активности природных очагов чумы различного типа на территории Российской Федерации в 2011 г. Составлен прогноз эпизоотической обстановки на энзоотичной по чуме территории России на 2012 г.

Ключевые слова: природные очаги чумы, эпизоотическая активность, численность носителей и переносчиков чумы, эпизоотологический прогноз.

N.V.Popov¹, V.E.Bezsmertny², A.N.Matrosov¹, A.A.Kuznetsov¹, T.V.Knyzeva¹, V.P.Popov², D.B.Verzhutsky³,
L.S.Nemchenko³, L.D.Shilova¹, V.M.Dubyansky⁴, O.V.Maletskaia⁴, V.P.Toporkov¹, A.V.Toporkov¹,
A.K.Adamov¹, V.V.Kutyrev¹

Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²Rospotrebnadzor Plague-Control Center, Moscow;

³Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk;

⁴Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Carried out is the assessment of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation and in the Republic of Kazakhstan during the period of 2000–2010. It is specified that 38 plague microbe strains have been isolated in the territory of the Russian Federation, the total area of epizooties being 882,5 km². Plague microbe strains are isolated in the territory of East-Caucasian high-mountain and Altai mountain natural foci. Identified are the reasons of low epizootic activity of plain and low-mountain natural plague foci in the Russian Federation. Outlined is the role of climatic factors in the development of current intense depression in numbers of carriers and vectors of plague. Put forward is the prognosis on the low epizootic activity of the natural plague foci in the Russian Federation in 2012. It is substantiated that the emergence of local epizooties in 2012 is to take place in the territory of Altai mountain, Tuvin mountain and East-Caucasian high-mountain natural plague foci.

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

В текущем десятилетии в природных очагах чумы, расположенных в границах степной и полупустынной ландшафтно-географических зон России и других стран СНГ, сохранялся межэпизоотический период [3, 5, 6]. В горных и высокогорных ландшафтах проявления чумы носили постоянный характер. На территории северной подзоны пустынь Казахстана, на фоне общей низкой эпизоотической активности природных очагов чумы сусликового и песчаночьевого типов (рис. 1) впервые наблюдается длительный (с 2002 г.) межэпизоотический период в Урало-Эмбенском пустынном очаге чумы [1, 7]. Напротив, в 2010–2011 гг. на территории южной подзоны пустынь Казахстана и, возможно, Узбекистана отмечена тенденция роста эпизоотической активности природных очагов чумы, максимум которой прогнозируется на 2012–2014 гг. [2, 4].

Всего в 2000–2010 гг. на энзоотичной по чуме территории России было выделено 1332 штамма

чумного микроба в 8 природных очагах. Эпизоотии чумы были выявлены на площади 16487 кв. км. При этом высокая эпизоотическая активность отмечена для Алтайского горного, Тувинского горного, Центрально-Кавказского высокогорного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы, с территории которых выделено 1269 штаммов чумного микроба, что составило 95,3 % от общего числа таковых, выделенных на территории России в этот период. В Дагестанском равнинно-предгорном, Терско-Сунженском низкогорном, Восточно-Кавказском высокогорном и Волго-Уральском песчаном природных очагах спорадически регистрировали локальные проявления чумы. На территории Прикаспийского Северо-Западного (с 1991 г.), Волго-Уральского (в границах РФ с 1976 г.), Забайкальского (с 1971 г.) степных природных очагов чумы имело место сохранение межэпизоотического периода.

Основной причиной низкой эпизоотической

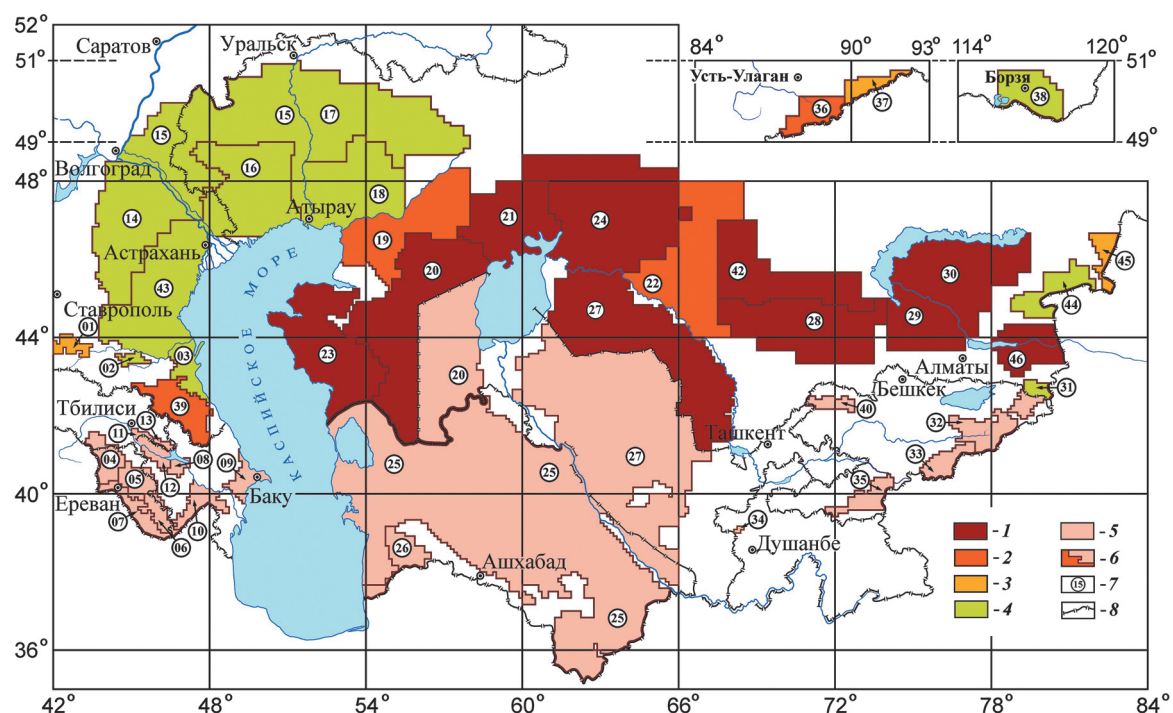


Рис. 1. Эпизоотическая активность природных очагов чумы на территории стран СНГ в 2011 г.

Регистрация: 1 – разлитых (более 1 тыс. кв. км) и 2 – локальных (менее 1 тыс. кв. км) эпизоотий или единичных штаммов; 3 – положительных серологических реакций; 4 – возбудитель и его следы не обнаружены; 5 – информация о состоянии очагов или их частей, находящихся на территории различных государств, не представлена; 6 – границы очагов; 7 – шифры очагов; 8 – государственные границы

активности природных очагов чумы на территории Российской Федерации в 2000–2010 гг. явились погодные условия последнего десятилетия (повышение температуры зимних месяцев, развитие весенне-летних засух, изменение сезонных показателей выпадения осадков и др.), обусловившие низкий уровень численности носителей и переносчиков этой инфекции. Все это привело к значительному снижению эпизоотической активности большинства природных очагов чумы. В 2011 г. погодные условия на всей территории России приближались к среднееголетним показателям. Это определило наличие благоприятных условий жизни популяций мелких млекопитающих и их эктопаразитов – носителей и переносчиков возбудителя чумы.

Прогноз эпизоотической активности на территории природных очагов чумы Российской Федерации на 2011 г. [5], в целом, оправдался. В 2011 г. было выделено 38 штаммов чумного микроба, общая площадь эпизоотий составила 882,5 кв. км. Эпизоотии чумы зарегистрированы в Восточно-Кавказском высокогорном (3 штамма, площадь эпизоотии 200 кв. км) и Алтайском горном (35 штаммов, площадь эпизоотии 523 кв. км) природных очагах. Причем, на территории Алтайского горного очага зарегистрировано участие в эпизоотии синантропных видов грызунов (домовая мышь со стоянки животноводов). Иммунодиагностическими методами подтверждена циркуляция микроба чумы в Центрально-Кавказском высокогорном (2 пробы от горных сусликов) и Тувинском горном (16 проб от длиннохвостых сусликов) природных очагах. На территории Прикаспийского песчаного природного очага мето-

дом ПЦР выявлены 2 положительные пробы на ДНК возбудителя чумы от субстрата гнезд полуденной песчанки.

Центрально-Кавказский высокогорный очаг (01) с 1970 г. характеризовался постоянной эпизоотической активностью вплоть до 2007 г. В 2011 г. на территории Карачаевского района Карачаево-Черкесской Республики серологическим методом выявлены переболевшие чумой горные суслики на площади 8,5 кв. км.

В 2011 г. общая площадь, заселенная горным сусликом, составила менее 50 тыс. га. Средняя численность зверьков составляла 21,0 ос./га, что соответствовало многолетней норме. Некоторое повышение численности горного суслика отмечено в Верхне-Кубанском и Малко-Баксанском районах, где имеются крупные поселения этого грызуна, в то время как в Кубано-Малкинском районе плотность зверьков снизилась до 17,5 ос./га. Индекс доминирования основного переносчика *Citellophilus tesquorum* в шерсти сусликов составил 93,2 %; в норах – 88,0 %; в гнездах – 67,6 %. Максимальные показатели общего запаса блох достигали в поясе горных степей (ур. Пёрк) – 1300; в альпийских лугах (ур. Караныкол) – 990; в субальпийских лугах (ур. Кырбаши) – 1260 экз./га. Средний показатель численности мышевидных грызунов составил 6,2 % попадания в орудия лова. Индексы обилия блох на мышевидных грызунах не превышали 1,0. Численность мышевидных грызунов в населенных пунктах колебалась в пределах 4,0–12,5 % попадания в орудия лова. Отмечено обитание серой крысы в различных типах объектов на терри-

тории г. Тырныауз и п. Былым. Блох в жилье человека не обнаружено.

В 2012 г. ожидается стабилизация численности горного суслика на уровне среднемноголетних значений. Показатели общего запаса блох существенно не изменятся. На фоне сохранения низкой эпизоотической активности очага возможны единичные находки зараженных чумой животных.

Терско-Сунженский низкогорный очаг (02). С 2001 г. зараженных животных на территории очага не зарегистрировано. В 2011 г., впервые с 2000 г., эпизоотологическое обследование проведено на территории Республики Ингушетия.

Популяции малого суслика продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии. Общая площадь сохранившихся поселений малого суслика составляет 212 га с низкой плотностью зверьков – 1,1 ос./га. Численность блох сусликов также низкая и равняется 47 экз./га. Средний процент попадания мышевидных грызунов в открытых биотопах составил 5,5. Индексы обилия блох на мышевидных грызунах повсеместно низкие – 0,1–0,2. В населенных пунктах блох не обнаружено.

В 2012 г. в очаге сохранится низкий уровень численности малого суслика и его блох. Численность мышевидных грызунов также останется невысокой. Обострения эпизоотической обстановки не ожидается.

Дагестанский равнинно-предгорный очаг (03). С 2004 г. проявлений чумы на территории очага не отмечено. В 2011 г. наблюдался низкий уровень численности фоновых видов грызунов и их блох. Тем не менее, уровень численности малого суслика по сравнению с 2010 г. несколько возрос: в равнинной части очага он составил в среднем 3,8, в предгорной – 9,4 ос./га. В Аграханских песках средняя численность гребенщиковой песчанки как весной, так и осенью составляла 4,3 ос./га; в Кумторкалинских песках осенью она не превышала 1,2 ос./га. Численность мышевидных грызунов повсеместно низкая.

В равнинной части очага индексы обилия блох малого суслика снизились до уровня ниже среднемноголетних значений. В предгорной зоне показатели численности блох достигали весной 519 экз./га, летом – 238 экз./га. Численность блох гребенщиковой песчанки, несмотря на тенденцию роста, сохранилась на уровне значительно ниже средней многолетней нормы. Индексы обилия блох мышевидных грызунов повсеместно низкие. Блох в населенных пунктах не обнаружено.

В 2012 г. показатели численности малого суслика могут превысить среднемноголетнюю норму, которая в этом очаге достаточно низкая. Сохранится тенденция некоторого роста численности гребенщиковой песчанки. Численность мышевидных грызунов существенно не изменится. Индексы обилия блох малого суслика превысят среднемноголетний уровень. Численность блох гребенщиковой песчанки приблизится к средней многолетней норме. На этом

фоне не следует ожидать развития эпизоотий чумы, хотя возможно выявление единичных зараженных зверьков и эктопаразитов на локальных участках.

Прикаспийский Северо-Западный степной очаг (14) с 1991 г. находится в состоянии межэпизоотического периода. Популяции малого суслика остаются в депрессии. Фоновая численность малого суслика весной в западной части очага не превышала 5,0; в восточной – 7,9 ос./га. Численность малых песчанок весной по валам оросительных каналов составила 1,1 %; осенью – до 4,3 % попадания в орудия лова. Численность мышевидных грызунов в зональных природных биотопах весной составляла в среднем 0,7 %, в интразональных и азональных биотопах достигала в среднем 4,9 % попадания в орудия лова. Осенью показатели численности мышевидных грызунов возросли в зональных биотопах до 4,0 %, в азональных и пойменных – до 16,1 % попадания в орудия лова. Численность мышевидных грызунов в скирдах составила весной 6,5, осенью – 10,6 %, в населенных пунктах – весной – 6,2, осенью – 8,0 % попадания при заселенности домов грызунами от 15,2 до 53,3 %. Численность специфических эктопаразитов малого суслика в 2011 г., хотя и достигла среднего многолетнего уровня, составив 384 экз./га, все же остается низкой. Индексы обилия блох на мышевидных грызунах повсеместно низкие. В населенных пунктах блох не зарегистрировано.

С учетом полученных данных, численность малого суслика весной 2012 г. может несколько возрасти, но не достигнет среднего многолетнего уровня. Численность мышевидных грызунов в природных биотопах приблизится к многолетней норме. Численность блох ожидается на низком уровне. На таком фоне развитие эпизоотий чумы маловероятно.

Волго-Уральский степной очаг (15). В очаге эпизоотии не выявляют с 2002 г., в границах очаговой территории России – с 1975 г. (ур. Тугай-Худук). В 2011 г. средний показатель численности малого суслика составил 3,3 ос./га. Численность мышевидных грызунов весной в зональных степных биотопах не превышала 1,0 %, увеличившись к осени до 12,2 % попадания в орудия лова. В интразональных и азональных биотопах весной этот показатель достигал 13,0, осенью – 18,2 %. В населенных пунктах численность мышевидных грызунов осенью составляла 3,6 % попадания при 14 % заселенности объектов. Численность блох малого суслика продолжает оставаться на низком уровне. Общий запас составил 118 экз./га, что втрое ниже среднемноголетней нормы. В населенных пунктах блох не обнаружено.

В 2012 г. сохранится низкий уровень численности малого суслика и его блох. Уровень численности мышевидных грызунов может несколько возрасти. В этих условиях на российской территории очага маловероятно развитие эпизоотий чумы.

Тувинский горный очаг (37). В 2010–2011 гг. выделить штаммы чумного микроба в очаге не удалось. В 2011 г. получено 15 серопозитивных результатов

на антитела к чумному микробу от длиннохвостых сусликов и одна положительная проба на чуму в реакции РНАт из субстрата гнезда основного носителя. Серопозитивные находки выявлены в материале, собранном в пределах Монгун-Тайгинского и Барлыкского участков очаговости. Кроме того, один зверек с антителами к возбудителю чумы обнаружен в ур. Чолдак-Оруг, расположенном в пределах территории Верхне-Барлыкской популяции суслика, где ранее проявления чумы не регистрировались. Суммарная площадь участков, где отмечено присутствие возбудителя чумы, составила 151 кв. км.

Численность длиннохвостого суслика возросла до 2,6 ос./га, что приближается к многолетней норме (3,0). Зарегистрирован повсеместный взрывной рост численности монгольской пищухи. В мае–июне в Монгун-Тайгинском мезоочаге численность этого зверька увеличилась по сравнению с прошлым годом с 0,21 до 5,6 жилых колонии на 1 га, в Саглинском – с 0,25 до 2,7. Плотность населения даурской пищухи находится на предельно низком уровне, не изменившись с прошлого года – 0,3 жилых колонии на 1 га. Отмечен незначительный рост численности в природных биотопах тарбагана и плоскочерепной полевки.

В поселках численность мышевидных грызунов находилась на низком уровне (п. Мугур-Аксы – от 0 до 3,2 % попадания), на чабанских стоянках в Монгун-Тайгинском кожууне (районе) значительно возросла – 21,2 % (2010 г. – 2,7 % попадания).

Численность блох длиннохвостого суслика снизилась – индексы обилия равнялись 3,8 на зверьках (2010 г. – 5,0) и 0,2 во входах нор (2010 г. – 0,4). Падение показателей блох произошло, в первую очередь, за счет сокращения численности *C. tesquorum* – основного переносчика и хранителя чумы в очаге. Отмечено уменьшение на длиннохвостом суслике численности и других групп эктопаразитов: вшей (с 6,2 в 2010 г. до 2,0 в 2011 г.), гамазовых (с 0,4 до 0,2) и иксодовых (с 11,4 до 9,2) клещей. Спад индексов обилия эктопаразитов отмечен по всей территории очага, кроме Барлыкского участка очаговости, где наблюдалось значительное повышение численности как блох, так и других эктопаразитов. Индексы обилия эктопаразитов на второстепенных носителях находились в 2011 г. на низком уровне. В населенных пунктах блох не обнаружено.

В 2012 г. ожидается стабилизация численности длиннохвостого суслика и незначительное увеличение запаса блох на территории Монгун-Тайгинского, Саглинского, Толайлыгского и Барлыкского мезоочагов. В этой связи существенные изменения в эпизоотической активности на большей части очага маловероятны, возможны обнаружения лишь единичных зараженных носителей и переносчиков на локальных участках.

Забайкальский степной очаг (38) в прошлом один из наиболее активных очагов чумы, но с 1971 г. обнаружить чумной микроб в очаге не удастся. В 2011 г. на фоне низкой численности носителей и перенос-

чиков возбудитель чумы при бактериологическом и серологическом обследовании также не выделен.

В очаге сохраняется низкий уровень численности носителей и переносчиков чумы. Популяции основного носителя – даурского суслика находятся в глубокой депрессии. Поселения его малочисленны и разобщены. В 2011 г. летняя численность этого вида в поселениях составила 0,7 ос./га, что выше прошлогоднего показателя (0,3) и близко к средней многолетней за последнее десятилетие (0,6). По-прежнему регистрируется низкая численность даурской пищухи – 0,3 жилых колонии на га, полевки Брандта – 0,1; стадной полевки – 0,5; монгольской песчанки – до 0,4 жилых нор на 1 га. В оптимальных биотопах попадаяемость даурского хомячка (2,4 %) соответствовала среднемноголетней численности, а у джунгарского (0,8 %) – была заметно ниже. Обычная численность отмечена у домового мыши (3,1 % попадания) и низкая – у серой крысы (0,1 %).

Численность блох даурского суслика оставалась на низком уровне. В 2011 г. их общий запас в микробиотопе (определенный по среднемноголетним индексам приуроченности) составил на Торейском участке 60 экз. (среднемноголетний показатель – 90 экз.), на Харанорском – 50 экз. (среднемноголетний – 70 экз.). Показатели численности блох на других носителях были либо низкими, либо находились на среднем уровне, что, учитывая предельно низкую плотность населения их прокормителей, позволяет однозначно оценивать общий запас блох этих видов, как крайне малый.

В 2012 г. существенного роста численности носителей и переносчиков чумы не произойдет. В этой связи нет оснований ожидать эпизоотических проявлений в очаге.

Волго-Уральский песчаный очаг (16). В границах очага эпизоотии чумы не регистрируют с 2007 г.; на очаговой территории России – с 2006 г. В очаге сохраняется низкий уровень численности фоновых видов грызунов и их блох.

В 2011 г. весной средняя численность полуденной песчанки составила 1,7; гребенщиковой – 3,9 ос./га. Осенью эти показатели возросли незначительно, составив 2,2 и 4,8 ос./га соответственно. Мышевидные грызуны в песках оставались малочисленными. В населенных пунктах численность домового мыши не превышала 2,0 % попадания в орудия лова, при заселенности жилых объектов в холодное время года 16,0 %. Численность блох песчанок остается на уровне прошлых лет: весной – 67, осенью – 296 экз./га. Весной доминировали блохи *Nosopsyllus laeviceps*, а осенью доли *Xenopsylla conformis* и *N. laeviceps* сравнялись. Индексы обилия блох как в шерсти, так и в норах были выше показателей прошлых лет.

Весной 2012 г. показатели численности песчанок и их блох останутся низкими. Численность мышевидных грызунов существенно не изменится. Обострения эпизоотической обстановки не ожидается.

Прикаспийский песчаный очаг (43). В 2011 г. эпи-

зоотий чумы не выявлено. В 2010 г. на фоне низкой численности носителей и переносчиков отмечались локальные эпизоотии в Приморском ландшафтном районе.

В 2011 г. после глубокой депрессии 2010 г. наблюдалось восстановление численности грызунов. Средняя численность полуденной песчанки весной составила 2,2 ос./га, гребенщиковой – 1,6 ос./га. К осени средняя плотность зверьков увеличилась незначительно: до 2,3 ос./га у полуденной и 3,2 ос./га у гребенщиковой песчанок. Численность мышевидных грызунов весной составила 3,0 %, однако к осени возросла до 11,5 %. Весенний запас блох песчанок несколько превышал прошлогодние показатели, однако к осени их численность значительно снизилась – до 12 экз./га. Следует подчеркнуть, что этот показатель один из самых низких в ряду лет наблюдений. В текущем году доминирующими видами блох на песчанках оставались *N. laeviceps* (80,0 %) и *X. conformis* (14,0 %).

В 2012 г. сохранится низкий уровень численности песчанок и их блох. Численность мышевидных грызунов существенно не изменится. Сохраняется вероятность обнаружения единично зараженных животных на участках стойкого проявления чумы.

Восточно-Кавказский высокогорный очаг (39). В 2008–2010 гг. в очаге зарегистрированы локальные эпизоотии чумы. В 2011 г. в Кулинском районе Республики Дагестан выделено 3 штамма возбудителя чумы, в том числе от трупа обыкновенной полевки – 1, от блох *Stenophthalmus intermedius* из гнезд обыкновенной полевки – 2.

Условия перезимовки отрицательно повлияли на состояние популяций обыкновенной полевки и ее блох. Показатели численности полевки весной повсеместно резко снизились, в том числе в горной зоне до 2,5 ос./га. В осенний период численность этих зверьков значительно возросла и достигала в горной зоне 13,2; в предгорной – 8,4 ос./га. В открытых биотопах показатели численности других мышевидных грызунов были низкими: в горной зоне – 3,9 %, в предгорной – 1,4 % попадания в орудия лова. В населенных пунктах их численность не превышала 0,5–1,0 %.

Показатели численности блох обыкновенной полевки в горной зоне весной снизились до 4, в предгорной – до 24 экз./га. В осенний период в предгорной зоне численность блох обыкновенной полевки возросла до 51 экз./га. Индексы обилия блох мышевидных грызунов низкие. В населенных пунктах блох не обнаружено.

В 2012 г. весной ожидается относительно низкий уровень численности обыкновенной полевки и ее блох. Выявление локальных проявлений чумы наиболее вероятно на Кокмадагском участке очага.

Алтайский горный очаг (36). В 2011 г. в очаге сохранялась высокая эпизоотическая активность: эпизоотии зарегистрированы на 11 участках общей площадью 532 кв. км. Всего было выделено 35 культур чумного микроба, в том числе: от монгольских

пищух – 4, от блох с монгольских пищух – 23, от блох из входов нор монгольских пищух – 5, от плоскочерепной полевки – 2, от джунгарского хомячка – 1. По результатам иммунодиагностических исследований установлено вовлечение в эпизоотию чумы домовых мышей (Кош-Агачский район, стоянка животноводов).

Численность основного носителя – монгольской пищухи на территории очага возросла и весной 2011 г. составила 8,1 жилых нор на 1 га, осенью – 10,5 нор/га, превысив среднееголетние показатели (4,1 и 6,4 соответственно). Плотность нор даурской пищухи весной была 1,4 нор/га, осенью возросла до 1,6 нор/га, чуть превысив среднееголетнюю норму (1,5). Численность длиннохвостого суслика равнялась весной 3,8 ос./га, осенью – 4,2 (многолетная норма – 3,2 и 5,5 соответственно). Попадаемость в ловушки плоскочерепной полевки весной составила 20,0 %, осенью – 37,6 %, что существенно выше среднееголетних значений (8,6 и 22,5 % соответственно). Численность алтайского сурка весной – 0,4 и осенью – 0,6 жилых бутан на 1 га (среднееголетние показатели – 0,8 и 0,8). Обследование стоянок животноводов дало следующие результаты: в мае-июне численность мышевидных грызунов составляла 2,0 %, отлавливались только плоскочерепные полевки; в сентябре-октябре на стоянках животноводов этот показатель увеличился до 5,5 %. В отловах доминировала плоскочерепная полевка, реже регистрировались джунгарский хомячок (2,0 %) и домовая мышь (0,6 %).

Численность переносчиков в 2011 г. на разных видах носителей изменялась разнонаправленно. Отмечен продолжающийся рост плотности населения блох монгольской пищухи – индекс обилия блох в шерсти зверьков за сезон достиг 6,8 (2010 г. – 6,4; среднееголетний показатель – 5,2). Численность большинства массовых видов находилась на среднем и высоком уровне. Существенных изменений в структуре таксоценоза блох монгольской пищухи за год не произошло, кроме заметного снижения индексов обилия и доминирования блохи *Amphalius runatus*. На даурской пищухе среднесезонный индекс обилия составил 3,3 (в прошлом году – 3,9; среднееголетнее значение – 2,6). На плоскочерепной полевке численность блох составила 1,1 (2010 г., среднееголетний уровень – 1,9). На длиннохвостом суслике индекс обилия блох за сезон увеличился до 1,7 (прошлогодний показатель – 1,2), но пока не достиг среднееголетнего уровня (1,9).

В 2012 г. есть все основания предполагать дальнейший рост численности основного и второстепенных носителей и переносчиков чумы. В этой связи ожидается сохранение высокой эпизоотической активности очага.

Представленные выше материалы позволяют заключить, что в 2012 г. эпизоотическая обстановка в природных очагах чумы на территории России существенно не изменится. Согласно прогнозу на 2012 г.

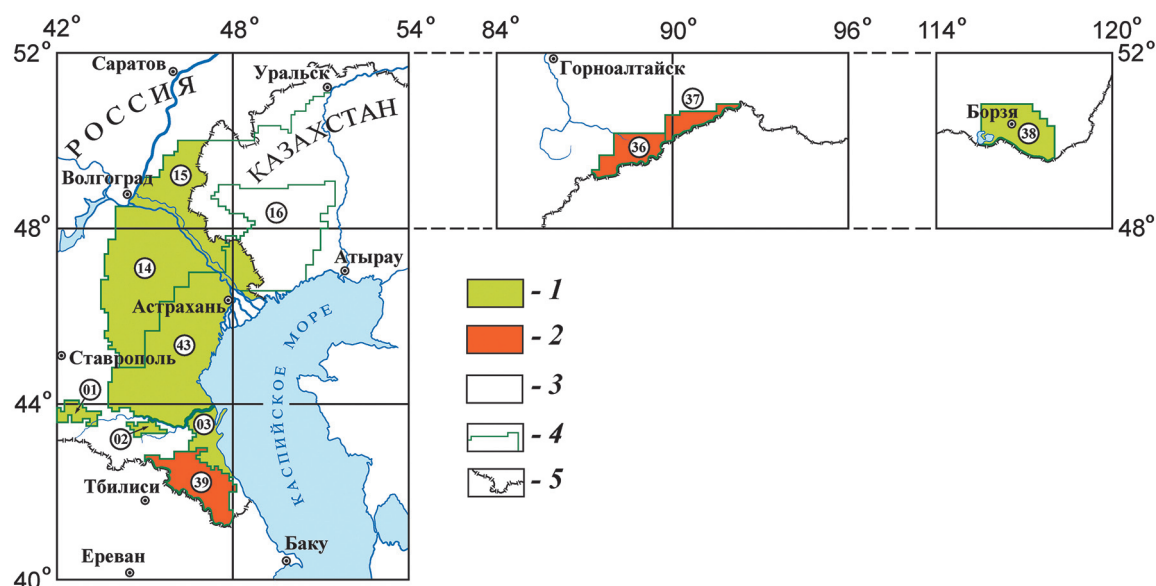


Рис. 2. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации в 2012 г.:

1 – развитие эпизоотий чумы маловероятно; 2 – возможны локальные эпизоотии или обнаружение единичных культур;
3 – неочаговая территория; 4 – границы природных очагов чумы; 5 – граница Российской Федерации

(рис. 2), развитие локальных эпизоотий ожидается на территории Алтайского, Тувинского горных и Восточно-Кавказского высокогорного природных очагов чумы. На всей остальной энзоотичной территории сохраняется вероятность обнаружения единично зараженных животных в местах стойкого проявления чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атишбар Б.Б., Аубакиров С.А., Бурделов Л.А., Жумадилова З.Б., Агеев В.С., Утешева Г.С. Состояние природных очагов чумы Казахстана и перспективы сотрудничества с ведущими научно-исследовательскими центрами России по их изучению. В кн.: Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера. Матер. Круглого стола сан.-эпид. служб Российской Федерации и Республики Казахстан. Астрахань, 2011. С. 48–52.
2. Барчук Т.Г. Чума в Каратал-Аягузском междуречье. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы, 2010; 1–2 (21–22):43–9.
3. Гражданов А.К. Современные факторы эпидемического потенциала в природных очагах чумы на западе Казахстана. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):16–8.
4. Копбаев Е.Ш. Эпидемический потенциал очагов чумы в Балхаш-Алакольской впадине. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы, 2010; 1–2 (21–22):28–33.
5. Попов Н.В., Безсмартный В.Е., Матросов А.Н. и др. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):31–7.
6. Попов Н.В., Безсмартный В.Е., Топорков В.П. и др. Причины низкой эпизоотической активности природных очагов чумы на территории России в начале XXI столетия. ЖМЭИ. 2011; 5:23–6.
7. Сараев Ф.А., Скляренко Г.П. Возможные причины депрессии эпизоотической активности очагов чумы на территории деятельности Атырауской ПЧС. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы, 2010; 1–2 (21–22):66–70.

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

1. Atishtabar B.B., Aubakirov S.A., Burdelov L.A., Zhumadilova Z.B., Ageev V.S., Atesheva G.S. [Current state of natural plague foci in the Republic of Kazakhstan and the prospective of collaboration with leading research centers of the Russian Federation to exercise their examination]. In: [Issues of emergency response to situations of sanitary-epidemiological character]. Papers Reviewed at the Penal Discussion between Sanitary-Epidemiological

Services of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan. Astrakhan; 2011. P. 48–52.

2. Barchuk T.G. [Plague in the territory of Karatal-Ayaguz interfluv]. Karant. Zoonoz. Inf. v Kazakhstane. Almaty, 2010; 1–2 (21–22):43–9.

3. Grazhdanov A.K. [Present-day factors that predetermine epidemic potential of the natural plague foci in the Western Kazakhstan]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; 89:16–18.

4. Kopbaev E.Sh. [Epidemic potential of natural plague foci in the Balkhash-Alakolsk Valley]. Karant. Zoonoz. Inf. v Kazakhstane. Almaty, 2010; 1–2 (21–22):28–33.

5. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., et al. [Epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:31–7.

6. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P. et al. [The reasons of low epizootic activity of natural plague focuses in the territory of the Russian Federation in early XXI century]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 5:23–6.

7. Saraev F.A., Sklyarenko G.P. [Possible reasons of epizootic activity depression in natural plague foci in the territory supervised by the Atyrau plague control station]. Karant. Zoonoz. Inf. v Kazakhstane. Almaty, 2010; 1–2 (21–22):66–70.

Authors:

Popov N.V., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Knyzeva T.V., Shilova L.D., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Adamov A.K., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

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

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

Dubyansky V.M., Maletskaya 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., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Топорков В.П., Топорков А.В., Адамов А.К., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Безсмартный В.Е., Попов В.П. Противочумный центр Роспотребнадзора. 119121, Москва, Погодинская ул., 10, с. 4. E-mail: protivochym@nln.ru

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

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

Поступила 16.01.12.

Э.А.Москвитина, А.Б.Мазрухо, О.Л.Адаменко, В.Д.Кругликов

ХОЛЕРА В НАЧАЛЕ XXI ВЕКА. ПРОГНОЗ НА ГЛОБАЛЬНОМ УРОВНЕ*ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону*

Прогноз холеры на 2011 год оправдался: в мире сохранилась тенденция роста заболеваемости за последнее десятилетие (2002–2011 гг.). Заносы холеры, приводящие к крупным вспышкам и эпидемиям (страны Карибского бассейна, Азии), формирование эндемичных очагов в ряде стран Азии и Африки, наличие предпосылок к развитию эпидемий (природные и социальные условия, военные конфликты, экономическая и политическая нестабильность), широкое распространение измененных в геноме вариантов *V. cholerae* eltor и *V. cholerae* O139 с эпидемическим и пандемическим потенциалом определяют, в целом, неблагоприятный прогноз по холере на глобальном уровне.

Ключевые слова: холера, эпидемии, заносы, природные и социальные условия, холерные вибрионы, измененные в геноме варианты *V. cholerae* eltor и *V. cholerae* O139, прогноз.

E.A.Moskvitina, A.B.Mazrukho, O.L.Adamenko, V.D.Kruglikov

Cholera in the Early XXIst Century: Global Prognosis*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don*

The prognosis for cholera on 2011 proved true: the tendency of morbidity growth remained in the last decade (2002–2011) worldwide. Imported cholera cases caused large outbreaks and epidemics in the Caribbean countries and Asia. Formation of endemic foci in a number of countries of Asia and Africa took place, where favorable conditions for epidemics development (environmental and social conditions, military conflicts, economical and political instability) existed. Wide spread of genetically altered *V. cholerae* eltor and *V. cholerae* O139 variants with epidemic and pandemic potential was observed. All the events mentioned above predetermine the unfavorable prognosis for cholera on a global level.

Key words: cholera, epidemics, imported cases, environmental and social conditions, *Vibrio cholerae*, genetically altered *V. cholerae* eltor and *V. cholerae* O139 variants, prognosis.

В мае 2011 г. Всемирная Ассамблея Здравоохранения признала эпидемиологическую обстановку по холере на современном этапе седьмой пандемии как серьезную проблему для мирового здравоохранения и приняла резолюцию WHA 64.15, призывающую к применению интегрированного глобального подхода к борьбе с этой опасной инфекцией. Существует необходимость в переходе от реагирования на вспышки к их предупреждению [46].

Необходимо отметить, что в начале XXI века во многих странах мира продолжали существовать потенциальные и реальные риски возникновения различных по происхождению чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение, проявляющихся в виде интенсивных и масштабных эпидемий и вспышек холеры. С 2002 по 2011 год (неуточненные данные) поступила информация в ВОЗ о 2062217 больных холерой из 58 стран мира. В структуре мировой заболеваемости наибольший удельный вес за последнее десятилетие приходится на страны Африки – 70,41 % (1452088 больных холерой) и Америки – 26,04 % (536918), в Азии он составил 3,0 % (61749), Австралии с Океанией – 0,54 % (11198) и в Европе – 0,01 % (246).

Вместе с тем, в связи с событиями по холере в регионе Карибского бассейна, самый высокий удельный вес больных холерой в 2010 и 2011 гг. выявлен в Америке – 56,558 (179594 больных холерой)

и 82,856 % (357166), в Африке он составил 36,249 (115106) и 16,881 % (72773), Азии – 4,355 (13819) и 0,199 % (856), Австралии с Океанией – 2,833 (8997) и 0,056 % (242), в Европе – 0,005 (15) и 0,008 % (34) соответственно.

Прогноз холеры [4] на 2011 г. оправдался. При слежении за динамикой заболеваемости на глобальном уровне с использованием проблемно ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Мир. Эпидемиологический анализ заболеваемости» установлено, что в мире сохранилась тенденция роста заболеваемости в 2011 г. относительно 2002 г. (по прямолинейной, степенной и полиномиальной линиям тренда относительно эмпирической динамики заболеваемости) со средним ежегодным темпом прироста – 11,860 % (рис. 1).

Показатель заболеваемости холерой в 2011 г. составил 7,244_{0,0000}, превысив значения за предшествующие годы. Анализ динамики заболеваемости на глобальном уровне свидетельствует о факторах, оказывающих длительное действие на эпидемический процесс, и демонстрирует связь между изменениями уровня заболеваемости и активностью причинных факторов. Основными из них, обусловившими в последние годы рост заболеваемости, явились завозы инфекции в результате миграции населения, являющейся косвенным регулятором эпидемического процесса.

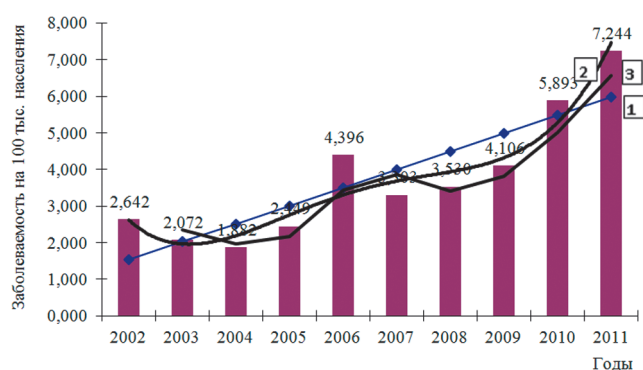


Рис. 1. Динамика заболеваемости холерой в мире. 2002–2011 гг.:

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

Установленный факт завоза холеры в Гаити (2010 г.) из Непала [31] на фоне разрушительного землетрясения в западной части острова, практически полного разрушения инфраструктуры столицы Гаити – Порт-о-Пренса и других населенных пунктов, скученности населения в лагерях беженцев, ухудшения водоснабжения и санитарных условий, обусловили широкомасштабную эпидемию в стране и показали, насколько быстро инфекционные болезни, в частности холера, могут распространяться с одного континента на другой в результате миграции населения.

Высказывание, сделанное Ф.Ф.Эрисманом в 1887 г.: «Холера представляет собой явление в высшей степени сложное, загадочное. Это, в буквальном смысле слова, – сфинкс, который нас приводит в ужас своим смертоносным взглядом ... и разгадкой его заняты тысячи ученых во всех странах мира», – остается актуальным и в современный период. По данным Haitian Ministry of Public Health and Population (министерства общественного здравоохранения и народонаселения Гаити), с 18.10.2010 по 21.12.2011 год зарегистрировано 515696 больных холерой и 6942 чел. умерли от этой инфекции, эпидемия продолжается [30]. Из Гаити зарегистрированы завозы холеры в США (штаты Флорида и Майами), Доминиканскую Республику с последующим распространением инфекции в 28 провинциях из 32 (20584 больных), а также Канаду, Англию и Германию [2, 18, 19]. Из Доминиканской Республики холера завезена в 2011 г. в Венесуэлу (452 больных), а также США (Нью-Йорк и штат Массачусетс), Мексику и Испанию [1, 16].

Следует отметить, что с 2002 по 2011 год в мире зарегистрировано 1173 межконтинентальных, меж- и внутригосударственных импортированных случаев инфекции. В структуре завозов холеры по континентам наибольший удельный вес приходится на страны Азии – 65,5 % (768 завозов), Европы – 18,2 % (214), Северной, Южной и Центральной Америки – 9,2 % (108), Африки – 5,6 % (66), Австралии и Океании – 1,5 % (17). При этом продолжалось вовлечение в пандемию новых стран в Северной Америке (Гаити,

Доминиканская Республика, Мартиника, 2010; Пуэрто-Рико, 2011 г.) и, как мы указывали ранее, стран Африки, Азии и Европы [3]. Это свидетельствует о расширении социально-экологической глобальной системы эпидемического процесса за счет функционирования территориальных, региональных и континентальных соцэкосистем, в том числе завозного происхождения.

Одними из основных факторов в пусковом механизме возникновения крупных эпидемий и вспышек на Африканском континенте, занимающем в последнее десятилетие наибольший удельный вес в структуре мировой заболеваемости, а также в Азии являются природно-климатические и социальные условия и их сочетанное влияние. Активизация эпидемического процесса в Азии (Индия, Бангладеш, Пакистан и другие страны) и Африке (Нигерия, Зимбабве, Замбия, Чад, Эфиопия, Камерун, Джибути, Сомали, Конго и др.) отмечается, как правило, после наводнений, сезона дождей, приводящих к контаминации холерными вибрионами различных источников водоснабжения и водопользования, а также связана с неудовлетворительной очисткой и отсутствием питьевой воды [15, 17, 21, 28, 46]. При рассмотрении влияния природно-климатических условий на риск эпидемий в регионах Южной Азии и Восточной Африки, помимо наличия территориальных рисков, обусловленных географическим положением стран, климатическими поясами с экваториальным, экваториально-муссонным, субэкваториальным и муссонным типами климата, высокими показателями суммы эффективных температур, количеством осадков, водонасыщенностью территорий [7, 20], следует учитывать «временные риски», связанные с климатическим явлением ENSO, несущим засухи и наводнения, и как следствие – эпидемии холеры [28, 33].

Риск эпидемий связан с различными видами миграции, урбанизацией и перенаселенностью в крупных городах и мегаполисах. Политическая нестабильность и военные конфликты (Судан, 2006, 2007 гг.; Ирак, 2007, 2008 гг.), небывалая засуха в Сомали (2011 г.), приведшая к голоду населения, наводнение в Намибии (2011 г.) способствовали перемещению людей, отсутствию возможности получить медицинскую помощь, использованию воды для питья из случайных источников, также проживанию в переполненных, с антисанитарными условиями, недостаточным и некачественным водоснабжением лагерях беженцев, возникновению крупных вспышек и эпидемий [41].

Состояние и тенденции в динамике мировой заболеваемости холерой определяют также наличие стойких и временных вторичных эндемичных очагов в странах Африки и Азии с сезонными подъемами заболеваемости ежегодно и выносами на другие территории, откуда идет отсчет новых эпидемий. Нами установлено, что к 2012 г. в пяти странах Южной, Юго-Западной и Центральной Азии (Индия, Бангладеш, Иран, Афганистан и Китай), 29 странах

Восточного (Замбия, Зимбабве, Малави, Мозамбик, Сомали, Уганда, Эфиопия и другие), Западного (Бенин, Гвинея, Гана, Гвинея-Бисау, Либерия, Нигер, Нигерия, Сенегал, Сьерра-Леоне и другие), Центрального (Ангола, Заир, Камерун) и Южного (ЮАР) регионов Африки сформировались эндемичные очаги, где холеру регистрируют ежегодно без завозов извне от пяти до десяти и более лет. Удельный вес больных холерой в странах Африки с эндемичными очагами составил 95,5 %. В этом плане заслуживают внимания данные E.Guevart *et al.* [26] о наличии эндемичного очага с 1971 г. на западе Центральной Африки (Камерун), а также эндемичных территорий на востоке Африки, в районе Великих озер [39], где холеру регистрируют ежегодно.

На долю больных холерой в странах Азии со стойкими (Индия, Бангладеш) и временными (Иран, Афганистан и Китай) эндемичными очагами приходится 54,2 %.

Исследователи, занимающиеся проблемой эпидемической и эндемичной холеры, отмечают, что безусловную и определяющую роль в формировании эндемичных территорий, возникновении и прогнозировании вспышек холеры играют экологические условия водных объектов, благоприятные для накопления, сохранения возбудителя за счет различных параметров окружающей среды: планктона, концентрации хлорофилла в прибрежных экосистемах, водяного гиацинта, покрывающего всю кенийскую часть озера Виктория, возможного формирования холерными вибрионами биопленки [23, 25, 27, 32, 36]. Установлено, что температура водной среды, в том числе у поверхности, — один из важных экологических параметров, регулирующих выживание и размножение *Vibrio cholerae*, и взаимосвязан с эпидемиями холеры в Индии и Бангладеш [29, 36]. Глобальное потепление может создать благоприятную среду для возбудителя и повышения заболеваемости холерой в эндемичных местностях. С использованием регрессионной модели Пуассона установлено достоверное влияние на уровень заболеваемости холерой ежегодного изменения температур воздуха и воды у поверхности моря в региональном масштабе и масштабе полушария с 1971 по 2006 год в Юго-Восточной Африке [42]. По мнению S.Paz [42], несмотря на неопределенность прогнозов на будущее, изменчивость климата следует принимать во внимание в прогнозировании вспышек холеры в Африке, что поможет обеспечить более высокий уровень готовности.

Холера является зависящей от климата инфекционной болезнью. Факторы окружающей среды и социальные условия жизни населения используются как предикторы для прогнозирования вспышек с использованием спутников и других систем наблюдения [20], для построения моделей эпидемий [24], при создании геоинформационных систем [41].

Следует отметить, что показатели в динамике мировой заболеваемости за указанный период обусловлены не только воздействием на эпидеми-

ческий процесс природных и социальных факторов, определяющих функционирование социально-экологической системы, но и были взаимосвязаны с биологическими свойствами возбудителя.

Американскими исследователями [14] при секвенировании геномных ДНК штаммов *V. cholerae* eltor биотипа O1 серогруппы H1 и H2 (Гаити, 2010 г.), C6 (Перу, 1991 г.), M4 (Бангладеш, 2008 г.), N5 (Бангладеш, 1971 г.) и сравнении их с эталонными последовательностями геномов штаммов N16961 (Бангладеш, 1971 г.), GIRS-101 (Бангладеш, 2002 г.) и MJ-1236 (Бангладеш, 1994 г.) установлено, что холерные вибрионы близкородственны штаммам из Бангладеш 2002 г. (GIRS-101) и 2008 г. (M4), а не латиноамериканским (C6), вошедшим в группу, куда включены штаммы из Африки. Это согласуется с выдвинутой ранее гипотезой C.Lam *et al.* о завозе их с данного континента [34]. Установлено также присутствие в геноме холерных вибрионов из Гаити и Южной Азии островов пандемичности VSP-1 и VSP-2, обеспечивающих высокий уровень адаптации к условиям внешней среды, их пандемический потенциал, наличие гена *ctxB* холерного токсина классического биовара, способного вызывать более тяжелое клиническое течение со смертельными исходами в первые часы после появления клинических признаков, а также наличие SXT интегративного конъюгативного элемента, обуславливающего резистентность к нескольким антибиотикам.

Ch-Sh.Chin *et al.* [14] показали, что эпидемия является клональной на основании сравнения данных секвенирования геномов штаммов H1 и H2 и выделенных в Гаити трех штаммов холерных вибрионов, которые были введены CDC в базу данных GenBank. A.Ali *et al.* [13] с использованием VNTR-генотипирования подтверждено, что эпидемия в Гаити была вызвана одним клоном, у которого, по мнению исследователей, было недостаточно времени, чтобы подвергнуться дивергенции и приобрести разные типы последовательностей, чего можно было бы ожидать от штаммов, в течение длительного времени персистирующих в природном резервуаре. Существует мнение [14] о вероятности того, что экосистемы Карибского бассейна могут стать «хозяином» для ряда генов, включая гены холерного токсина классического биовара и SXT элемента, которые отсутствовали в этом регионе.

К настоящему времени установлено, что вспышки или завозные случаи холеры, обусловленные изменениями в геноме вариантами *V. cholerae* eltor, наблюдались с 1991 г. в странах Азии (Индия, Бангладеш, Таиланд, Шри-Ланка, Малайзия, Вьетнам, Китай, Гонконг, Япония, Кувейт, Непал, Узбекистан) [12, 37, 38, 40, 43, 44, 45], Африки (Алжир, Гвинея, Замбия, Марокко, Мозамбик) [27, 31, 35, 45], Америки (Гаити, Доминиканская Республика, Мексика, Венесуэла, США) [13, 14] и Европы (Румыния [37], Украина, Россия) [6, 12]. Цитируемыми выше авторами установлено разнообразие штаммов, обусловленное ва-

риабельностью геномов профага СТХф, кодирующего биосинтез холерного токсина, и острова пандемичности VSP-2.

Заслуживают внимания сведения M.H.Fazil *et al.* [22] о выявлении гена *ctxB* классического типа в профагах СТХф^{Eltor} и СТХф^{Calc} *V. cholerae* O139 при секвенировании их генома.

Холера, обусловленная *V. cholerae* O139, с 1992 г. вызывает различные по интенсивности эпидемические осложнения наряду с холерой эльтор на исторической родине классических холерных вибрионов. Некоторые штаты Индии и регионы Бангладеш стали эндемичными по холере, обусловленной вибрионами O139 серогруппы. В течение ряда последних лет вспышки холеры Бенгал наблюдались в Китае, ранее – в странах Азии (Пакистан, Непал, Шри-Ланка, Таиланд, Малайзия, Мьянма), и завозы в Гонконг, Японию, Киргизию, Узбекистан, Казахстан, страны Европы (Эстония, Германия, Великобритания, Дания, Франция и Россия), а также в страны Америки (США) и Африки.

Среди известных в настоящее время 206 серогрупп заслуживают внимания холерные вибрионы O9, O15, O28, O74, O37 и O75 (ранее O141) серогрупп, содержащие ген холерного токсина и являющиеся этиологическим агентом диарей, в том числе с тяжелым клиническим течением.

Необходимо отметить, что страны СНГ с приобретением независимости резко расширили свои международные связи, в том числе со странами, неблагополучными по холере, что увеличило не только риск, но и завозы этой опасной инфекции, прежде всего в страны Центральноазиатского региона (Узбекистан, Кыргызстан) из стран Азии (Пакистана, Индии, Китая, Ирана, Индонезии). Имевшие место эпидемические осложнения по холере в Таджикистане в 1990-е годы были обусловлены контаминацией холерными вибрионами р. Кокча, протекающей по территории Афганистана и впадающей в р. Пяндж. Начавшаяся во время эпидемии массовая миграция населения, на фоне гражданской войны в Таджикистане (1993 г.), способствовала распространению холеры в Узбекистан и Казахстан [11].

С использованием информационного фонда проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ. России» выявлена за последнее десятилетие (2002–2011 гг.) тенденция роста заболеваемости (темп – 56,71 %), что связано со вспышкой холеры на Украине в Донецкой области (2011 г.). По данным государственной санитарно-эпидемиологической службы Украины, с 29.05 по 09.09.2011 г. было зарегистрировано 33 больных и 24 вибриононосителя с выделением из клинического материала *V. cholerae* eltor серовара Огава. Ранее имели место завозы холеры в 2001 и 2007 гг. без распространения возбудителя инфекции. За указанный период информировали ВОЗ о холере Таджикистан и Казахстан (2005, 2008 гг.). Завозы холеры на фоне изоляции в указанных и дру-

гих странах СНГ атоксигенных гемолизположительных холерных вибрионов O1 из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды позволяют в целом, оценить ситуацию как нестабильную.

Начало седьмой пандемии холеры в России и все последующие вспышки и спорадические случаи были связаны, в основном, с завозами из-за рубежа и распространением возбудителя инфекции с формированием местных очагов [5, 7, 8]. В настоящее время существует реальная угроза завоза холеры всеми видами международного транспорта на любую административную территорию независимо от типа по эпидемическим проявлениям холеры. Подтверждением этому являются завозы холеры в Башкортостан (2004, 2008 гг.), Мурманскую область (2006 г.) и Москву (2010 г.) из Индии; в Тверскую область, Москву, Ростовскую область – из Таджикистана (2005 г.), что определяет, в целом, неустойчивую эпидемиологическую обстановку в стране.

Предпосылками для возникновения вспышек водного происхождения были и остаются экологогигиенические условия поверхностных водоемов, благоприятные для размножения возбудителя холеры в концентрациях, достаточных для инфицирования населения, использующего водные объекты для водоснабжения, организованного и неорганизованного рекреационного водопользования. Вспышкам, как правило, предшествовал скрытый период накопления возбудителя в поверхностных водоемах, куда попали стоки [9, 10].

Благодаря существующей в стране системе эпидемиологического надзора продолжалось ежегодное выделение холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды (рис. 2). С 2002 по 2011 год в 31 субъекте Российской Федерации, различных по типам эпидемических проявлений холеры, выделено 644 штамма холерных вибрионов O1 серогруппы гемолизположительных, не содержащих *ctxAB* и *tcpA* генов, два штамма холерных вибрионов O1 *ctxAB*⁺ и *tcpA*⁺ и 17 штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы, преимущественно в субъектах III типа подтипа А, для которых характерны завозы без распространения холеры (рис. 3).

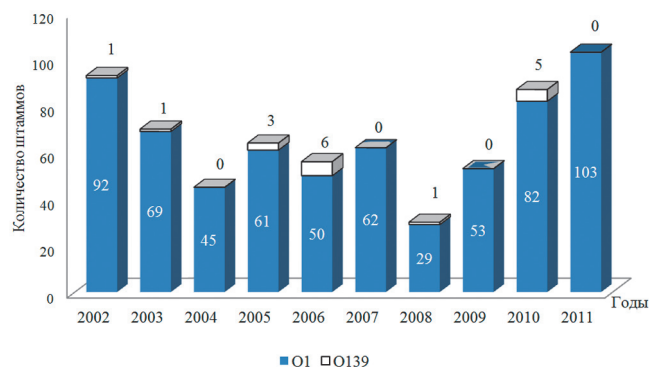


Рис. 2. Динамика выделения холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды. Российская Федерация. 2002–2011 гг.

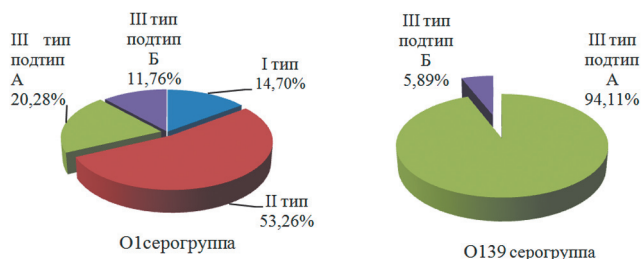


Рис. 3. Удельный вес штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды в субъектах Российской Федерации, различных по типам эпидемических проявлений холеры. 2011 г.

При этом холерные вибрионы O1 серогруппы изолированы (2007–2011 гг.) в зонах водозаборов для водоснабжения населения (Приморский край, 2007, 2008 гг.; Республика Калмыкия, 2010 г.), в зонах организованного (Ростовская область, 2011 г.; Республика Калмыкия, 2007, 2010 гг.; Краснодарский край, 2007 г.; Забайкальский край, 2007, 2008, 2009 гг.; Свердловская область, 2008 г.; С-Петербург, Архангельская область, 2009 г.; Липецкая и Иркутская области, 2011 г.) и неорганизованного рекреационного водопользования (Ростовская область, 2011 г.; Республика Калмыкия, 2008–2011 гг.; Приморский край, 2007–2009, 2011 гг.; Москва, 2010, 2011; Вологодская область, 2010; Новосибирская область, 2008, 2009 гг.; Республика Коми, 2010 г.; Республика Татарстан, 2011 г.; Свердловская область, 2008 г.; Забайкальский край, 2009 г.; Алтайский край, Кемеровская область, 2011 г.), в местах сброса сточных вод (Ростовская область, 2007–2011 гг.; Республика Калмыкия, 2009–2011 гг.; Приморский край, 2007–2008, 2010 гг.; Москва, 2011 г.; Республика Татарстан, 2011 г.; Забайкальский край, 2007, 2009, 2011 гг.; Алтайский край, 2009 г.; Тюменская область, 2008 г.; Иркутская область, 2009–2010 гг.; Республика Саха (Якутия), 2009 г.).

Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы выделены в зонах неорганизованного рекреационного водопользования (Москва, 2008 г.) и в местах сброса сточных вод – 5 (Челябинская область, 2010 г.).

По мнению экспертов ВОЗ [15], стратегия эпидемиологического надзора на международном и национальном уровнях должна быть сконцентрирована на определении территорий с наиболее высоким эпидемическим потенциалом. В этом плане исследования, направленные на выявление предпосылок возникновения эпидемий и вспышек, использование комплекса показателей, характеризующих интенсивность и типы эпидемического процесса, завозы и другие, продолжают оставаться актуальными и первоочередными. Факт очевидного завоза холеры в Гаити подчеркивает, что прогнозирование вспышек инфекционных болезней диктует необходимость оценки факторов риска не только на местном, но и на глобальном уровне.

Таким образом, затронутые актуальные во-

просы холеры в современный период указывают на значимость этой инфекции на глобальном уровне. Сохраняющаяся тенденция роста заболеваемости, завозы холеры, приводящие к крупным вспышкам и эпидемиям, формирование эндемичных очагов в ряде стран Азии и Африки, наличие предпосылок к развитию эпидемий (природные и социальные условия, военные конфликты, экономическая и политическая нестабильность), распространение измененных вариантов холерных вибрионов эльтор с эпидемическим и пандемическим потенциалом определяют, в целом, неблагоприятный прогноз по холере на глобальном уровне. Это диктует необходимость осуществления регламентированного объема мероприятий, предусмотренных системой эпидемиологического надзора при холере, обеспечения готовности медицинских учреждений специального назначения, в том числе бактериологических лабораторий, различных по территориальным уровням, предусмотренных для проведения диагностических исследований на холеру и индикации возбудителя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власти Венесуэлы заявили о победе над доминиканской холерой. Медицинский портал: МедНовости. 22.02.2011 [дата обращения 09.06.2011]. <http://medportal.ru/mednovosti/news/2011/02/22/cholera/>
2. Количество больных холерой в Венесуэле увеличилось до 239 человек. Российская газета [сайт]. 04.02.2011 [дата обращения 09.06.2011]. <http://m.rg.ru/2011/02/04/venes-anons.html>
3. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Арешина О.А., Адаменко О.Л. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):16–9.
4. 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.
5. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 6:63–71.
6. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* EL Tor при эпидемических осложнениях в Сибири и на дальнем востоке. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 5:12–8.
7. Москвитина Э.А. Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):22–6.
8. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Фёдоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале XXI века. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
9. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Протетной В.И. и др. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctx⁺ tcr⁺. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:23–9.
10. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кологоров А.И., Морозов В.В., Пигалова Н.В., Заатдинов В.Б. и др. Вспышка холеры в Казани в 2001 году. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):15–26.
11. Семиотрочев В.Л., Огарков П.И. Эпидемиологическая ситуация по холере в странах Центральноазиатского региона (1992–1996 гг.). Эпидемиол. и инф. бол. 1998; 1:10–2.
12. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шапкова Л.В., Кутырев В.В. Вариативность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. Журн. мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 3:11–8.
13. Ali A., Chen Y., Johnson J.A., Redden E., Mayette Y., Rashid M.H. et al. Recent clonal origin of cholera in Haiti. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17(4):699–701.
14. Chin Ch-Sh., Sorenson J., Harris J.B., William M.D., Robins P.D., Charles R.C. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. N. Engl. J. 2011; 364:33–42.
15. Cholera, Pakistan. Wkly Epidem. Rec. 2010; 85(44):438.
16. Cholera, diarrhea and dysentery update 2011 (23): Haiti,

- Dominican Republic. ProMED-mail [Internet] 26 Jul 2011 [cited 24 Jul 2011]. Archive Number 20110726.2253 Available from: <http://www.promedmail.org>
17. Cholera, 2010. Wkly Epidem. Rec. 2011; 86 (31):325–40.
18. Cholera – Canada: (QC) ex Haiti. ProMed-mail [Internet]. 03 Feb 2011[cited 24 Jul 2011]. Archive Number 20110203.0396 Available from: <http://www.promedmail.org>
19. Cholera – Haiti (21): USA (FL). ProMed-mail [Internet]. 17 Nov 2010 [cited 09 Jun 2011]. Archive Number 20101117.4171. Available from: <http://www.promedmail.org>
20. Emch M., Feldacker C., Yunus M., Streatfield P.K., DinhThiem V., Canh do G. et al. Local environmental predictors of cholera in Bangladesh and Vietnam. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 78(5):823–32.
21. Emch M., Yunus M., Escamilla V., Feldacker C., Ali M. Local population and regional environmental drivers of cholera in Bangladesh. Environ. Health. 2010; 9(1):2.
22. Fazil M.H., Bhanumathi R., Pandey H.P., Singh D.V. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 belonging to multiple ribotypes and isolated from diarrhoeal patients in Kerala, southern India. Infect Genet Evol. 2011; 11(2):454–9.
23. Feikin D.R., Tabu C.W., Gichuki J. Does water hyacinth on East African lakes promote cholera outbreaks? Ann. J. Trop. Med. Hyg. 2010; 83(2):370–3.
24. Fernandez L.M.A., Bauernfeind A., Jimenez J.D., Gil C.L., Omeiri N.E., Guibert D.H. Influence of temperature and rainfall on the evolution of cholera epidemics in Lusaka, Zambia, 2003–2006: analysis of a time series. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 103(2):137–43.
25. Fong J.C., Syed K.A., Klose K.E., Yildiz F.H. Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. Microbiol. 2010; 156(9):2757–69.
26. Guevart E., Noeske J., Solle J., Essomba J.M., Edjenguele M., Bitia A. et al. Factors contributing to endemic cholera in Douala, Cameroon. Med. Trop. (Mars.) 2006; 66(3):283–91.
27. Halder K., Das B., Nair G.B., Bhadra R.K. Molecular evidences favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain. Microbiol. 2010; 156(1):99–107.
28. Hashizume M., Armstrong B., Hajat S., Wagatsuma Y., Faruque A.S., Hayashi T. The effect of rainfall on the incidence of cholera in Bangladesh. Epidemiology. 2008; 19(1):103–10.
29. Hashizume M., Faruque A., Terao T., Yunus M., Streatfield K., Yamamoto T. et al. The Indian ocean dipole and cholera incidence in Bangladesh: a time series analysis. Environ. Health Perspect. 2011; 119 (2):239–44.
30. Health cluster Bulletin. Cholera and post-earthquake response in Haiti – 21 December 2011 – #30. 28 Dec 2011 [cited 08 Jan 2012]. Available from: http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/Full_Report_3209.pdf
31. Hendriksen R.S., Price L.B., Schupp J.M., Gillette J.D., Kaas R.S., Engelthaler D.M. et al. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. MBio. 2011; 2(4):e00157–11.
32. Jutla A.S., Akanda A.S., Islam S. Tracking cholera in coastal regions using satellite observations. J. Am. Water Resour. Assoc. 2010; 46(4):651–62.
33. Kovats R.S., Bouma M.J., Hajat S., Worrall E., Haines A. El Nino and health. Lancet. 2003; 362(9394):1481–9.
34. 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.
35. Lee J.H., Han K.H., Choi S.Y., Lucas M.E., Mondlane C., Ansaruzzaman M. et al. Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination Group. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 EL Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. J. Med. Microbiol. 2006; 55: 165–70.
36. Magny de C.G., Murtugudde R., Sapiiano M.R., Nizam A., Brown C.W., Busalacchi A.J. et al. Environmental signatures associated with cholera epidemics. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008; 105(6):17676–81.
37. Na-Ubol M., Sriramanote P., Chongsang-nguan M., Indrawattana N., Sookkrung N., Tapchaisri, Yamasaki S. et al. Hybrid and El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. Indian J. Med. Res. 2011; 133:387–94.
38. 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.
39. Ndiokubwayo J.-B., Niyongabo T., Ndayiragije A. Le cholera des Grands-Lacs. Mol. trop. (France). 2001; 61(3):266.
40. Okada K., Chantaroj S., Roobhaisong A., Hamada S., Sawanpanyalert P. A cholera outbreak of the *Vibrio cholerae* O1 El tor variant carrying classical CtxB in northeastern Thailand in 2007. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2010; 82(5):875–8.
41. Osei F.B., Duker A.A. Spatial and demographic patterns of cholera in Ashanti region – Ghana. Int. J. Health Geogr. 2008; 7(1):44.
42. Paz S. Impact of temperature variability on cholera incidence in Southeastern Africa, 1971–2006. Ecohealth. 2009; 6(3):340–5.
43. Rajinder M., Joshi R.M., Albert M.J. Hybrid El Tor *Vibrio cholerae* O1, Kuwait. 2009; 15(11):1879–80.
44. Raychoudhuri A., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Nandy R.K., Takeda Y., Nair G.B. Biotyping of *Vibrio cholerae* O1: time to redefine the scheme. Indian J. Med. Res. 2008; 128:695–8.
45. Safa A., Sultana J., Dac Cam P., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid EL Tor strains, Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:987–8.
46. WHA64.15. Холера: механизм борьбы и профилактики. Шестидесят четвертая сессия Всемирной Ассамблеи Здравоохранения. 24 мая 2011г. www.who.int/entity/cholera/technical/A64_R15-ru.pdf.

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

1. [Venezuela's government declared about the victory over cholera imported from Dominican Republic]. Med. portal: Med Novosti. 22 Feb 2011. [cited 09 Jul 2011]. <http://medportal.ru/mednovosti/news/2011/02/22/cholera/>
2. [Cholera cases rise to 239 in Venezuela]. Ros. Gazeta [site]. 04 Feb 2011 [cited 09 Jun 2011]. <http://m.rg.ru/2011/02/04/venez-anons.html>
3. 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]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:16–19.
4. 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.
5. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V., Kulikalova E.S. [Evolution of the epidemiology of cholera]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 6:63–71.
6. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S. et al. [Detection of “hybrid” *Vibrio cholerae* eltor strains during epidemic complications in Siberia and Far East]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 5:12–18.
7. Moskvitina E.A. [Current trends in the evolution of the seventh cholera pandemics]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 95:22–6.
8. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Fedorov Yu.M., Podosinnikova L.S., Gorobets A.V. [Cholera at the beginning of the XXI century. Prognosis]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 3:44–8.
9. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I. et al. [Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 ctx-tcp⁺]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 1:23–9.
10. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Kologorov A.I., Morozov V.V., Pigalova N.V., Zaidinov V.B. et al. [Cholera outbreak in Kazan in 2001]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 82:15–26.
11. Semiotrochev V.L., Ogarkov P.I. [Epidemiological situation with regard to cholera in the countries of Central Asia (1992–1996)]. Epidemiol. Infek. Bolezn. 1998; 1:10–2.
12. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova L.V., Kutyrev V.V. [Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 3:11–8.

Authors:

Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D. 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:

Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 18.01.12.

В.А.Антонов¹, В.Ю.Смоленский², Е.В.Путинцева¹, А.В.Липницкий¹, В.П.Смелянский¹, А.Т.Яковлев¹,
В.В.Мананков¹, Н.И.Погасий¹, Т.Ю.Красовская³

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЛИХОРАДКЕ ЗАПАДНОГО НИЛА В 2011 ГОДУ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И ПРОГНОЗ ЕЕ РАЗВИТИЯ

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград;

²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

³ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлена характеристика эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила (ЛЗН) на территории Российской Федерации в 2011 г. Выявлены расширение границ территорий, охваченных эпидемическим процессом, формирование «новых» очагов ЛЗН. Приведены данные по заболеваемости ЛЗН в период с июня по октябрь 2011 г. в 10 регионах России. Описаны клинико-эпидемиологические особенности ЛЗН в 2011 г. Отмечено, что маркеры возбудителя ЛЗН обнаружены на территории 38 субъектов Российской Федерации, что свидетельствует о его циркуляции на значительной территории страны. Прогноз эпидемиологической ситуации по ЛЗН на территории Российской Федерации будет зависеть от многих факторов, наиболее глобальным из которых является потепление климата. Ожидается возникновение природных очагов и появление клинических случаев ЛЗН в ближайшие годы в центральных районах Европейской части России и лесостепной зоне юга Сибири. Широкое внедрение диагностики ЛЗН может способствовать увеличению числа официально зарегистрированных случаев этой инфекционной болезни и выявить расширение границ территорий, эндемичных по ЛЗН.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, заболеваемость населения, прогноз развития эпидемиологической ситуации.

V.A.Antonov¹, V.Yu.Smolensky², E.V.Putintseva¹, A.V.Lipnitsky¹, V.P.Smelyansky¹, A.T.Yakovlev¹,
V.V.Manankov¹, N.I.Pogasy¹, T.Yu.Krasovskaya³

West Nile Fever Epidemic Situation in the Russian Federation Territory in 2011 and Prognosis of its Development

¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd; ²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow; ³Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is characteristic of West Nile Fever (WNF) epidemiologic situation in the Russian Federation in 2011. Expansion of the territories involved in the epidemic process and formation of the "new" WNF foci are observed. Data on WNF morbidity in June–October 2011 in ten regions of Russia are presented. Described are clinical and epidemiologic peculiarities of WNF morbidity in 2011. WNF agent markers are detected in the territory of 38 regions of Russia, suggesting its circulation on the vast areas of the country. Prognosis on WNF epidemic situation in the Russian Federation is considered to be dependent on many factors, climate warming being the most global one. Natural foci emergence and WNF cases registration are expected in the near future in the central regions of European part of Russia and forest-steppe area of Southern Siberia. WNF diagnostics improvement is thought to confer for better registration of the cases and detection of further enlargement of endemic territories.

Key words: West Nile fever, morbidity, prognosis of epidemiological situation development.

В 2010–2011 гг. эколого-климатические условия в странах Центральной Европы и Средиземноморья, а также в центральных и южных регионах России оказались весьма благоприятными для формирования новых очагов лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и роста заболеваемости населения. В данный период случаи заболевания ЛЗН были зарегистрированы в Греции (2010 г. – 261, 2011 г. – 69 случаев), Румынии (2010 г. – 57, 2011 г. – 10), Италии (2009 г. – 68, 2010 г. – 3, 2011 г. – 14), Венгрии (2010 г. – 3), Португалии (2010 г. – 1), Албании (2011 г. – 2), Македонии (2011 г. – 4), Израиле (2011 г. – 33), России (2010 г. – 524, 2011 г. – 163), Украине (2011 г. – 8), Тунисе (2011 г. – 3), Турции (2011 г. – 3) [6, 11, 12].

В период с июня по октябрь 2011 г. на территории России было зарегистрировано 163 случая заболевания ЛЗН в 10 регионах, в том числе в Волгоградской

(61), Воронежской (50), Астраханской (18), Ростовской (16) областях, Краснодарском крае (7), Республике Татарстан (4), Челябинской (2), Тамбовской (1) областях, Республике Калмыкия (1). Три завозных случая заболевания (из Венесуэлы, Таиланда и эндемичных районов Российской Федерации) были выявлены в Москве. По сравнению с эпидемическим сезоном 2010 г., когда было зарегистрировано 524 случая заболевания ЛЗН в 9 регионах Российской Федерации, а на долю Волгоградской области пришлось 78,8 % случаев, в сезон 2011 г. заболевшие в Волгоградской области составили 37,0 %.

Увеличилось количество территорий, на которых выявлены случаи ЛЗН. Наряду с регистрацией больных на территории «старых» очагов (в Астраханской области с 1996 г., Волгоградской с 1999 г., Ростовской с 2000 г.), случаи ЛЗН второй год подряд были от-

мечены в Воронежской и Челябинской областях, Краснодарском крае и Республике Калмыкия. Если в 2010 г. в Республике Татарстан был выявлен 1 завозной случай ЛЗН, то в 2011 г. зарегистрировано уже 4 случая заражения. В Тамбовской области в 2011 г. заболевание было диагностировано впервые. Все вышесказанное свидетельствует о формировании «новых» очагов ЛЗН.

Общее число зарегистрированных случаев заболевания ЛЗН в 2011 г. на территории государств Европейского союза было также существенно ниже предыдущего года, а сезонная динамика заболеваемости имела традиционный характер – первые заболевшие зарегистрированы в июле, пик заболеваемости наблюдался в августе, постепенное снижение числа выявленных случаев инфекционной болезни происходило в течение сентября [12]. Случаи заболевания зарегистрированы как на территориях, затронутых эпидемическим подъемом ЛЗН в 2010 г. (Греция, Румыния, Италия, Турция, Израиль), так и в регионах, в последнее время не сообщавших о выявлении ЛЗН (Республика Македония, Тунис). Данное обстоятельство, а также сведения о расширении границ затронутых этой инфекционной болезнью территорий в отдельных странах, в частности Греции и Турции [12], свидетельствуют о постепенном увеличении ареала ЛЗН в европейском регионе. Особенно отчетливо это проявляется на примере Греции, где большое число больных ЛЗН в 2011 г. наблюдалось как в провинции Центральная Македония (здесь зарегистрирована основная доля случаев ЛЗН в 2010 г.), так и в ряде южных префектур государства, в которых в 2010 г. были выявлены лишь единичные случаи заболевания [13]. Аналогичная тенденция динамики формирования «новых» очагов ЛЗН отмечена и на Северо-Американском континенте (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/Mapsactivity/surv&control11MapsAnybyState.htm>, 28 Dec 2011)

Отличительные особенности заболеваемости ЛЗН в России в 2011 г. Изменились клинические проявления заболевания: увеличилась доля больных с поражением центральной нервной системы, она составила 30,2 % (в 2010 г. – 9,9 %). В «новых» очагах в Краснодарском крае на формы заболевания с поражением центральной нервной системы пришлось 85,7 %, в Воронежской, Челябинской областях и Республике Татарстан – 50 %. На территории «старого» очага в Волгоградской области больные с нейроинвазивными формами ЛЗН составили лишь 3,3 %. Увеличилась доля заболевших молодого возраста: в сезон 2011 г. по России больные в возрасте до 50 лет составили 58,6 %, тогда как в 2010 г. – 3,8 %. На территориях «новых» очагов в Челябинской области, республиках Татарстан, Калмыкия и Краснодарского края доля больных ЛЗН в возрасте до 50 лет доходила до 100 %. В Волгоградской и в Воронежской областях среди заболевших ЛЗН доля лиц в возрастной группе до 50 лет составила 50–55 %.

Наблюдались также изменения условий и мест

заражения. Если основная группа заболевших в сезон 2010 г. была связана с пребыванием на дачных участках (42 %), то в сезон 2011 г. эта группа составила лишь 8 %. Наибольшая часть заболевших в 2011 г. заразилась по месту проживания в сельской местности (31,5 %).

Регистрировались случаи завоза ЛЗН в различные регионы Российской Федерации в результате заражения во время пребывания на эндемичных территориях. В 2011 г. заражение происходило как на территориях зарубежных стран (Таиланда, Венесуэлы, Украины, Турции), так и при выезде на очаговые территории России (в Астраханскую, Волгоградскую, Ростовскую области).

В 2011 г. в Российской Федерации значительно улучшилась работа по обследованию больных, имеющих сходную с ЛЗН клиническую симптоматику. В 2011 г. в эту работу с разной степенью активности включились 47 субъектов Российской Федерации (в 2010 г. – 11). Согласно представленной в Референс-центр по мониторингу за лихорадкой Западного Нила (на базе ФКУЗ «Волгоградский НИПЧИ» Роспотребнадзора) информации, по 1 больному обследовано в Московской, Калужской областях, республиках Саха, Дагестан, Еврейском АО, по 2–5 больных в Тверской, Кировской областях и Карачаево-Черкесской республике. На остальных территориях было обследовано от 5 до 500 больных, в зависимости от напряженности эпидемиологической ситуации.

Мониторинговые обследования природных очагов ЛЗН и проведение работ по изучению эндемичности регионов привели к выявлению расширения границ территорий, где обнаружены маркеры вируса Западного Нила (ВЗН) в суспензиях переносчиков и органов носителей вируса, а также специфические антитела у населения. На сегодняшний день маркеры возбудителя обнаружены на территории 38 субъектов Российской Федерации, что свидетельствует о циркуляции ВЗН на значительной территории страны.

В ходе проведенных исследований по изучению эндемичности территории выявлена РНК ВЗН в суспензиях насекомых – переносчиков вируса – и суспензиях органов мелких млекопитающих и, таким образом, подтверждено наличие природных очагов ЛЗН низкой интенсивности в отдельных районах Забайкальского края и Томской области. По мнению специалистов ГНЦ ВБ «Вектор», можно предположить формирование местного очага ЛЗН в Новосибирской области, а также лесостепной и степной зонах юга Западной Сибири [5].

В эпидемический сезон 2011 г. наблюдение за природными очагами ЛЗН и изучение эндемичности территории отдельных регионов страны по этой инфекционной болезни (включая сбор насекомых-переносчиков с последующей их видовой идентификацией и определением вирусформности, а также исследование материала от животных, являющихся резервуаром ВЗН в природе) проводились с разной

степенью активности в 32 субъектах Российской Федерации. Работа выполнялась, в основном, территориальными ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии». В ряде регионов согласно трехсторонним соглашениям с территориальными ФБУЗ «ЦГиЭ» и Управлениями Роспотребнадзора привлекались к этой работе противочумные, научные и образовательные учреждения (ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», ФКУЗ Причерноморская ПЧС, ФКУЗ Астраханская ПЧС, ФКУЗ Хабаровская ПЧС, ФКУЗ Читинская ПЧС, Уральский федеральный Университет им. Б. Ельцина, ФКУЗ Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций и др.).

По данным Управлений Роспотребнадзора, антигены ВЗН в суспензиях органов птиц найдены в Ставропольском крае; в суспензиях органов мелких млекопитающих – в Ставропольском, Краснодарском, Забайкальском краях; в суспензиях комаров – в Астраханской, Волгоградской, Иркутской областях, республиках Калмыкия, Хакасия; в суспензиях клещей – в Воронежской области и Ставропольском крае. РНК ВЗН выявлена в суспензиях клещей, собранных в Томской области и Республике Хакасия, в суспензиях комаров в Астраханской области. Кроме этого, на 24 территориях проводились исследования на наличие иммунитета к ВЗН у населения (обследовали доноров, животноводов и другие группы населения). IgG к ВЗН выявлены в сыворотках крови жителей Курской, Калининградской, Саратовской, Рязанской, Сахалинской, Ярославской, Тульской, Оренбургской, Омской, Волгоградской, Воронежской, Ростовской областей, Ставропольского, Забайкальского краев, республик Адыгея, Марий-Эл, Дагестан.

На территориях 28 субъектов Российской Федерации в эпидемический сезон 2011 г. проводились профилактические дезинсекционные (ларвицидные) обработки водоемов. Финансовые средства на эти мероприятия закладывались как в бюджеты муниципальных образований, так и предприятий негосударственных форм собственности при организации мест массового отдыха населения, включая летние оздоровительные учреждения для детей и подростков.

В соответствии с Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14 апреля 2011 г. № 31 «О совершенствовании эпидемиологического надзора и профилактике лихорадки Западного Нила», в эпидемический сезон 2011 г. в субъектах Российской Федерации активизировалась разъяснительная работа с населением по профилактике инфекций, передающихся комарами. Большинство территориальных Управлений

Роспотребнадзора представило информацию в Референс-центр по мониторингу за лихорадкой Западного Нила о проведенной работе, основными формами которой были публикации статей в местной печати, выступления по радио, телевидению, размещение сообщений на сайтах Управлений, выпуск памяток для населения. По информации из Тульской, Самарской, Новосибирской областей, Алтайского края, Карачаево-Черкессии, Ингушетии использовались и новые формы санитарно-просветительной работы с населением (пресс-релиз по постановлению Главного государственного санитарного врача, тематические передачи в программе ТВ «Свое мнение», специальные ролики-сюжеты на ТВ, передачи «Круглый стол»).

Клиническая картина ЛЗН при заражении человека ВЗН различных генотипов и геновариантов является предметом изучения специалистов всего мирового сообщества. Современной наукой выделяется как минимум 5 генотипов ВЗН. Установлено, что вирусы трех из них (1, 2 и 5) вызывают у человека клинические проявления наибольшей тяжести, и, по-видимому, вирусы каждого из генотипов обуславливают свои клинические особенности течения заболевания [3, 4]. Очевидно, что эпидемиологический надзор, противоэпидемические мероприятия и лечение должны быть ориентированы на генетический вариант ВЗН, преобладающий в определенное время и на конкретной территории.

ВЗН генотипа 1 наиболее широко распространен. Самые крупные вспышки ЛЗН в 1996–2004 гг. в США, Канаде, Румынии, Израиле, Египте и на территории России (Волгоградская, Астраханская области) были вызваны различными геновариантами генотипа 1.

В 2002–2004 гг. специалистами ГНЦ ВБ «Вектор» впервые показано, что ВЗН циркулирует как среди мигрирующих, так и среди оседлых видов птиц и млекопитающих на юге (в лесостепной и степной зонах) Западной Сибири и Приморском крае [1, 7]. Генотипирование изолятов ВЗН показало их сходство с астраханскими и волгоградскими изолятами и принадлежность к генотипу 1а. Предполагается, что ВЗН 1а генотипа из прикаспийских регионов быстро распространился на территорию южных районов Азиатской части России, вплоть до Тихого океана [4]. В 2008 г. при проведении эпизоотологического обследования зеленой зоны Томска и его пригородов впервые была выявлена РНК ВЗН в суспензиях клещей *Ixodes pavlovskyi* и *Ixodes persulcatus*. Последующие исследования показали принадлежность ВЗН к генотипу 1а и гомологию со штаммом вируса, циркулирующим в Волгоградской области в 1999–2006 гг. [2].

ВЗН генотипа 2, ранее встречавшийся только в Африке, был выявлен у птиц на территории Венгрии в 2004 г. и с тех пор регулярно регистрируется в популяциях птиц других стран Центральной Европы. В 2004 г. РНК ВЗН генотипа 2 была обнаружена у боль-

ных ЛЗН в Ростовской области. В 2007 г. заболеваемость населения Волгоградской области ЛЗН была вызвана ВЗН 2 генотипа (геновариантом, схожим с ростовским изолятом 2004 г.). Заболеваемость ЛЗН населения Волгоградской, Ростовской и Воронежской областей в 2010–2011 гг. также была вызвана вирусом генотипа 2, как и в некоторых странах Европы (Греция 2010–2011 гг., Италия 2011 г.) [6, 11, 12].

Следует отметить, что заболеваемость населения ЛЗН в Астраханской области до настоящего времени обусловлена ВЗН 1 генотипа (астраханским геновариантом 1а), однако в комарах видов *Culex richardii* и *Anopheles hyrcanus* в единичных случаях обнаружены РНК ВЗН генотипов 2 и 4. ВЗН генотипа 3, который выявлен в Чехии в комарах *Culex pipiens* и *Aedes rossicus* [9], на территории России не обнаружен. РНК ВЗН генотипа 4 была выделена от комаров *Uranotaenia unguiculata* и озерных лягушек *Rana ridibunda* в Краснодарском крае и в Волгоградской области [4]. Штаммы ВЗН генотипа 5 изолированы в Индии [10].

Вспышки ЛЗН могут возникать после длительных периодов спорадической заболеваемости или ее отсутствия, что свидетельствует о важности непрерывного эпидемиологического надзора за этой инфекционной болезнью.

Прогноз эпидемиологической ситуации по ЛЗН на территории Российской Федерации будет зависеть от многих факторов. Наиболее глобальными являются последствия потепления климата. В четвертом Докладе Межправительственной группы экспертов по изменению климата однозначно утверждается факт неуклонного потепления климата практически во всем мире, причем потепление ускоряется. Одиннадцать из 12 последних лет стали самыми теплыми за весь период инструментальных наблюдений за глобальной температурой (с 1850 г.). По прогнозу экспертов этой группы, более частыми станут периоды жары и сильных осадков, увеличится сила ураганов, изменится годовое распределение осадков. В течение ближайшего столетия возможен рост средней температуры Земли на 1,8–4 °С и повышение уровня океана на 18–59 см [8].

Американскими исследователями показано, что повышенная температура воздуха была самым значимым индикатором увеличения уровня инфицирования людей ВЗН комарами *Culex pipiens* и *Culex restuans* в штате Иллинойс в 2004–2008 гг. [14].

По данным, представленным в докладе Росгидромета «Изменение климата и их последствия на территории России в XX и XXI веках» [8], количество экстремальных метеорологических явлений с 1991 г. в России возрастает. От наводнений в последние годы более всего пострадало население Республики Якутия, Ставропольского и Краснодарского краев, Приморья; ожидается увеличение числа наводнений в Санкт-Петербурге, на Северном Кавказе, Дальнем Востоке, в бассейнах рек Лена и Енисей.

Потепление климата и затопление территорий ведет к расширению ареала, увеличению численности комаров и пролонгированию периода их потенциальной инфекционной опасности.

Смягчение и увлажнение климата на Урале и в Сибири является причиной значительного увеличения численности клещей. Так, в 1993–2003 гг. в Иркутской области температура февраля повысилась на 6 °С и достигла минус 11 °С, а длительность безморозного периода увеличилась с 90–100 до 120–130 дней. По многолетним (1956–2003 гг.) наблюдениям на территории Иркутска и Иркутской области численность иксодовых клещей возросла в 57,5, а заболеваемость клещевым энцефалитом в 40,2 раза [8].

Маркеры ВЗН в Иркутской области найдены у перелетных и оседлых птиц и лошадей. Таким образом, можно предположить появление случаев заболевания людей ЛЗН в данном регионе в ближайшие годы.

В Волгоградской области произошли эпидемические вспышки ЛЗН в 1999, 2007, 2010 и 2011 гг., что также связано с изменением климатических условий. В конце XX – начале XXI века в Волгоградском регионе наблюдается рост среднегодовой температуры воздуха, при этом на начало XXI века (2000–2010 гг.) приходится 6 абсолютных температурных максимумов по месяцам: абсолютный рекорд января (2007 г.), мая (2007 г.), июля (2011 г.), августа (2010 г.), сентября (2010 г.) и ноября (2010 г.). На начало XXI века приходится и абсолютный минимум января (отмечен в 2006 г.). Самыми теплыми за историю метеонаблюдений в Волгограде стали январь 2007 г., март 2008 г., июль 2011 г., август, ноябрь и декабрь 2010 г. В то же время самые холодные месяцы наблюдались в XX веке (последний раз самым холодным стал июнь 1997 г.).

Как указывалось выше, потепление климата ведет к улучшению условий обитания комаров, являющихся переносчиками арбовирусов. Расширение границ распределения видов, которые сейчас встречаются исключительно в районах с более мягким климатом, будет способствовать формированию новых природных очагов «комариных лихорадок», в том числе и ЛЗН, не только в южных, но и центральных районах европейской части России и южных территориях Сибири. Ожидается возникновение природных очагов и появление клинических случаев ЛЗН в ближайшие годы в Саратовской, Самарской, Оренбургской, Курской, Белгородской, Омской, Новосибирской областях, Алтайском крае и Приморье [3]. Регистрация случаев заболевания населения ЛЗН в Воронежской области и республиках Татарстан и Калмыкия в 2011 г. подтверждает прогноз расширения ареала ЛЗН.

Важным аспектом эпидемиологического надзора за ЛЗН является готовность как клиницистов, так и специалистов лабораторной службы к диагностике этой инфекции. Широкое внедрение диагностики ЛЗН может способствовать увеличению числа официально зарегистрированных случаев этой инфекционной болезни и выявить расширение границ терри-

торий, эндемичных по ЛЗН. Импульс к повышению эффективности противоэпидемических и профилактических мероприятий дало Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14 апреля 2011 г. № 31 «О совершенствовании эпидемиологического надзора и профилактике лихорадки Западного Нила».

Для уменьшения негативных социальных последствий увеличения заболеваемости населения ЛЗН в России необходимо внедрение широкого комплекса профилактических мероприятий, организационных схем действий различных служб в соответствии с уровнем эпидемиологической опасности на территориях. Эти схемы охватывают широкий спектр мероприятий: готовность медицинских учреждений к выявлению больных ЛЗН наличие средств диагностики и подготовленного персонала; определение тактики лечения тяжелых нейровирусных форм заболевания и наличие медицинского оборудования для проведения интенсивного лечения; осуществление постоянного мониторинга возбудителей ЛЗН с целью своевременного планирования или корректировки профилактических мероприятий; регулирование численности переносчиков инфекции в населенных пунктах, рекреационных зонах, оздоровительных учреждениях и др.; комплексное взаимодействие всех заинтересованных ведомств и органов исполнительной власти.

Работа выполнена при финансовой поддержке РГНФ и администрации Волгоградской области в рамках научно-исследовательского проекта «Социально-медицинские аспекты распространения вируса лихорадки Западного Нила в городской агломерации крупного промышленного центра Поволжья», № 11-16-34011 а/В

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононова Ю.В., Терновой В.А., Шелканов М.Ю., Протопопова Е.В., Золотых С.И., Юрлова А.К. и др. Генотипирование вируса Западного Нила в популяции диких птиц наземного и древесно-кустарникового комплексов на территории Барабинской лесостепи и Кулундинской степи (2003–2004 гг.). *Вопр. вирусол.* 2006; 4:19–23.
2. Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Терновой В.А., Иванова Н.В., Протопопова Е.В., Кравченко Л.Б. и др. Выявление вируса Западного Нила и его генотипирование в иксодовых клещах (Parasitiformes: Ixodidae) в Томске и его пригородах. *Паразитология.* 2008; 42(3):210–25.
3. Платонов А.Е. Влияние погодных условий на эпидемиологию трансмиссивных инфекций (на примере лихорадки Западного Нила в России). *Вестник РАМН.* 2006; 2:25–9.
4. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М., Русакова Н.М. и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 2:29–37.
5. Платонова Л.В., Михеев В.Н., Локтев В.Б., Кононова Ю.В., Шестопалов А.М., Дунал Т.А. О первых результатах эпидемиологического мониторинга лихорадки Западного Нила в Новосибирской области. *Сибирь-Восток.* 2006; 3:45–8.
6. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.А., Антонов В.А., Мананков В.В. и др. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 году. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):38–41.
7. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Липницкий А.В., Алексеев В.В. Прогноз эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации на 2010 год. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 2(104):14–7.
8. Ревич Б.А. Изменение здоровья населения России в условиях меняющегося климата. *Пробл. прогнозирования.* 2008; 3:140–50.
9. Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(2):225–31.
10. Bondre V.P., Jodi R.S., Mashra A.C., Yergolkar P.N., Arankalle V.A. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *Gen. Virol.* 2007; 88(30):875–84.
11. European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Annual epidemiological report 2011: Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data [Internet]. 10 Nov 2011 (cited 25 Nov 2011). Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_isp_Form.aspx?ID=767.
12. European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: End of West Nile virus transmission season in Europe 2011 [Internet]. 25 Nov 2011 (cited 25 Nov 2011). Available from: http://ecdc.europa.eu/en/activities/diseaseprogrammes/emerging_and_vector_borne_diseases/Pages/West_Niles_fever_Risk_Maps.aspx.
13. Hellenic Centre for Disease Control and Prevention (KEELPNO). Weekly epidemiological surveillance report – West Nile virus infection in Greece – 15 September 2011 [Internet]. 29 Sep 2011 (cited 03 Oct 2011). Available from: <http://www.keelpno.gr/en-us/epidemiologicalstatisticaldata.aspx>.
14. Ruiz M. O., Chaves L.F., Hamer G.L., Brown W.M., Walker E.D., Harmis L. et al. Local impact of temperature and precipitation on West Nile virus infection in Culex species mosquitoes in northeast Illinois, USA. *Parasit Vectors.* 2010; 3(1):19.

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

1. Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Shchelkanov M.Yu., Protopopova E.V., Zolotykh S.I., Yurlov A.K. et al. [West Nile virus genotyping among wild birds belonging to ground and tree-brush bird populations on the territories of the Baraba forest-steppe and Kulunda steppe (2003–2004)]. *Vopr. Virusol.* 2006; 4:19–23.
2. Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ternovoy V.A., Ivanova N.V., Protopopova E.V., Kravchenko L.B. et al. [Detection of the West Nile virus and its genetic typing in ixodid ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Tomsk City and its suburbs]. *Parazitologiya.* 2008; 42(3):210–25.
3. 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.
4. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopen'skaya T.A., Fedorova M.V., Kolyasnikova N.M., Rusakova N.M. et al. [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 2:29–37.
5. Platonova L.V., Mikheev V.N., Loktev V.B. et al. [About first results of epidemiological monitoring of West Nile fever in Novosibirsk region] *Zh. Sibir-Vostok.* 2006; 3:45–8.
6. Putintseva E.V., Lipnitskiy A.V., Alekseev V.V., Smelyanskiy V.P., Antonov V.A., Manankov V.V. et al. [Dissemination of the West Nile fever in the Russian Federation and in the world in 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 107:38–41.
7. Putintseva E.V., Smelyanskiy V.P., Antonov V.A., Lipnitskiy A.V., Alekseev V.V. Prognosis of epidemiologic situation of West Nile fever in the territory of the Russian Federation for 2010. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 104:14–7.
8. Revich B.A. [Alteration of the Russian population health in conditions of changing climate]. *Probl. Prognoz.* 2008; 3:140–50.

Authors:

Antonov V.A., Putintseva E.V., Lipnitskiy A.V., Smelyanskiy V.P., Yakovlev A.T., Manankov V.V., Pogasy N.I. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru
Smolenskiy V.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow. Russia.
Krasovskaya T.Yu. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Антонов В.А., Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Смелянский В.П., Яковлев А.Т., Мананков В.В., Погасий Н.И. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru
Смоленский В.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.
Красовская Т.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 23.01.12.

Н.Ф.Василенко¹, В.Ю.Смоленский², А.С.Волынкина¹, Н.Г.Варфоломеева¹, И.Н.Заикина¹,
О.В.Малецкая¹, У.М.Ашибок¹, Ю.М.Тохов¹, А.В.Ермаков³, А.Н.Куличенко¹

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ ПО КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2011 г.

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

²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

³Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю, Ставрополь

Представлен анализ эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ) на юге Российской Федерации в 2011 г. Рассмотрены причины внутрибольничной вспышки КГЛ в МУЗ «ЦРБ Сальского района» Ростовской области. На основании эпизоотологического мониторинга представлен прогноз по КГЛ на 2012 г.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, эпидемиологическая обстановка, заболеваемость, иксодовые клещи, зараженность.

N.F.Vasilenko¹, V.Yu.Smolensky², A.S.Volynkina¹, N.G.Varfolomeeva¹, I.N.Zaikina¹, O.V.Maletskaia¹,
U.M.Ashibokov¹, Yu.M.Tokhov¹, A.V.Ermakov³, A.N.Kulichenko¹

Peculiar Aspects of Epidemiological Situation on Crimean Hemorrhagic Fever in the Russian Federation in 2011

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; ²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow; ³Administration in the Stavropol Region, Stavropol

Outlined is the analysis of epidemiological and epizootiological situation on Crimean hemorrhagic fever (CHF) in the south of the Russian Federation in 2011. Discussed are the causes of nosocomial outbreak of CHF at the Salsk district central hospital, the Rostov Region. Prognostication on CHF situation for 2012 is made based on the epizootiological monitoring.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, epidemiological situation, morbidity, Ixodic ticks, infectiousness.

В последнее десятилетие отмечается активизация природных очагов трансмиссивных клещевых инфекционных болезней, обусловленная комплексным воздействием биотических и абиотических факторов. Одной из наиболее актуальных по эпидемическим проявлениям инфекций на юге европейской части Российской Федерации является Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) [1, 2]. Эпидемиологическая обстановка по КГЛ в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах (ЮФО и СКФО) Российской Федерации продолжает оставаться нестабильной: в 2011 г. наблюдается рост заболеваемости КГЛ по сравнению с 2010 г. на 43,5 %. С 1999 по 2011 год эпидемические проявления КГЛ зарегистрированы в Ставропольском крае, Астраханской, Волгоградской, Ростовской областях, в Республиках Калмыкия, Дагестан, Ингушетия. Два завозных случая КГЛ (из Ставропольского края) отмечены в Карачаево-Черкесской республике. Случаи завоза инфекции выявлены в Москве (из Республики Ингушетия) [3]. Для Ростовской области и Ставропольского края КГЛ следует расценивать как «возвращающуюся» инфекционную болезнь, для Волгоградской области, Республик Калмыкия, Дагестан, Ингушетия и Карачаево-Черкесской республики – как «новую» инфекционную болезнь.

За 13 лет в ЮФО и СКФО выявлен 1501 больной КГЛ, у 68 из них (4,5 %) заболевание закончи-

лось летальным исходом. Наибольшее количество случаев заболевания отмечено в Ставропольском крае, где за указанные годы зарегистрировано 548 больных, что составило 36,5 % от общего числа больных, выявленных в ЮФО и СКФО, Ростовской области – 23,5 % от всех случаев заболевания КГЛ и в Республике Калмыкия – 19,9 %. Рост заболеваемости наблюдался с 1999 по 2007 и с 2008 по 2010 год уровень заболеваемости КГЛ снижался, а в 2011 г. возрос почти в 1,5 раза.

В 2011 г. зарегистрировано 99 случаев заболевания (в 2010 г. – 69), из них 5 с летальным исходом (в 2010 г. – 1). Уровень летальности по сравнению с 2010 г. возрос и составил 5,1 %, что незначительно выше среднего уровня летальности за 13 лет (4,5 %). Наиболее значительный рост заболеваемости наблюдался в Ростовской области, по сравнению с 2010 г.

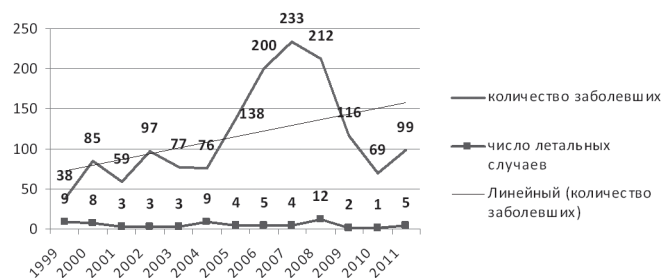


Рис. 1. Заболеваемость КГЛ на юге России с 1999 по 2011 год

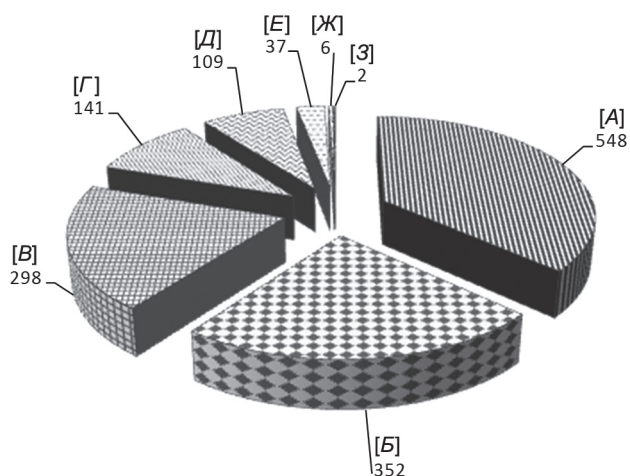


Рис. 2. Число заболевших КГЛ в субъектах РФ с 1999 по 2011 год:

А – Ставропольский край, Б – Ростовская область, В – Республика Калмыкия, Г – Астраханская область, Д – Республика Дагестан, Е – Волгоградская область, Ж – Республика Ингушетия, З – Карачаево-Черкесская Республика

число случаев заболевания КГЛ возросло в 3 раза, что связано, в первую очередь, с резко возросшей зараженностью иксодовых клещей вирусом ККГЛ на данной территории, по сравнению с 2010 г. – в 2,92 раза, а также с внутрибольничной вспышкой КГЛ в МУЗ «ЦРБ Сальского района» Ростовской области.

Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения в субъектах ЮФО и СКФО незначительно снизился или остался на уровне предыдущего года, кроме Ростовской области, где он значительно возрос и составил 1,13 (2010 г. – 0,37).

Сезонность заболевания во всех регионах, эндемичных по КГЛ, соответствовала многолетней. Первый больной (по дате заболевания) был зарегистрирован в 3-й декаде апреля в Унцукульском районе Республики Дагестан. Заболеваемость нарастала с апреля, пик пришелся на май–июнь (36,4 и 39,4 % от всех больных), спад – на август. Последний случай заболевания отмечен в 3-й декаде августа в Астрахани.

Заболеваемость регистрировалась во всех возрастных группах, однако наиболее часто происходи-

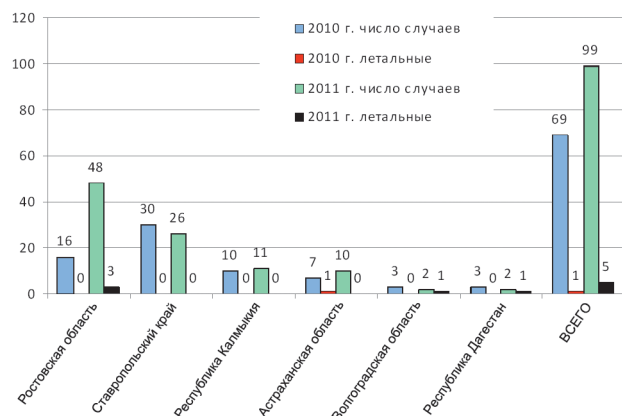


Рис. 3. Число случаев заболеваний КГЛ в субъектах ЮФО и СКФО в 2010–2011 гг.

ло инфицирование людей трудоспособного возраста от 20 до 60 лет. Наиболее высокий уровень заболеваемости отмечался в возрастных группах 30–39 (28,3 %) и 50–59 лет (29,3 %).

Большую часть больных КГЛ составили жители сельской местности (77,8 %), трудовая деятельность которых связана с животноводством и полевыми работами. Заражение городских жителей (22,3 %) происходило во время отдыха на природе или при выездах на дачные участки. Среди больных преобладали мужчины (66,7 %).

В профессиональном составе больных КГЛ преобладали неработающие лица (40,5 % – в 2011 г., 45 % – в 2010 г.), как правило, являющиеся владельцами индивидуального поголовья сельскохозяйственных животных, а также работники фермерских хозяйств. В 2011 г. достаточно высокий процент больных пришелся на долю медицинских работников (8,1).

Инфицирование людей происходило, в основном, при укусах клещами (56,5 %) и при снятии клещей незащищенными руками (19,2 %).

Ведущим механизмом передачи инфекции остается трансмиссивный (66,7 %). В 15,1 % случаев механизм заражения не установлен. Наряду с этим, в 2011 г. значительный процент случаев инфицирования произошел контактным (18,2 %) и, возможно, воздушно-капельным путями передачи инфекции в результате нарушения противоэпидемического режима при уходе за больной КГЛ в МУЗ «ЦРБ Сальского района» Ростовской области (заразились 8 медработников, что составило 8,1 % от всех случаев инфицирования и 53,3 % от всех случаев инфицирования контактным путем).

По факту внутрибольничного инфицирования КГЛ медицинского персонала МУЗ «ЦРБ Сальского района» Ростовской области проведено эпидемиологическое расследование, в результате которого установлено, что при оказании медицинской помощи тяжелой больной были инфицированы 8 медицинских работников стационара: 4 врача, 3 медицинских сестры, 1 санитарка.

Условиями, способствующими инфицированию медицинских работников, явились: развитие геморрагического синдрома у больной с кровоизлиянием в легкие и выделение мокроты, содержащей кровь; период максимальной виремии (вирусемии) – пятый день болезни, при отсутствии противовирусного лечения (в связи с беременностью больной); использование ингалятора – небулайзера Nebulflaem для лечения явилось непреднамеренным фактором риска в создании аэрозоля.

Создавшиеся условия в непроветриваемой небольшой палате способствовали возможности реализации воздушно-капельного пути передачи возбудителя КГЛ и инфицированию медицинских работников.

Вероятными факторами передачи инфекции явились кровь и биологические жидкости от больной и воздух палаты с высокой концентрацией вируса ККГЛ, а также нарушения дезинфекционного

режима и биологической безопасности при оказании реанимационной помощи больной с использованием аппаратуры (ингалятора-небулайзера, отсутствие проведения бактерицидного облучения воздуха палаты в течение 5 дней).

В связи с возникновением внутрибольничной вспышки КГЛ и в целях недопущения формирования внутрибольничных очагов указанной инфекции, специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем КГЛ (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт») и Управления Роспотребнадзора по Ростовской области разработаны изменения и дополнения к действующим методическим указаниям «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки» (МУ 3.1.1.2488-09).

Анализ клинических проявлений КГЛ в 2011 г. показал, что у 62,6 % больных наблюдалась клиническая форма без геморрагических проявлений, у 37,4 % – с геморрагическими проявлениями. В то же время в Астраханской области в 70,0 % случаев зарегистрирована клиническая форма болезни с геморрагическим синдромом. Наибольшую долю составили больные со средне-тяжелым течением болезни (82,8 %), доля случаев тяжелого течения болезни снизилась (в 2010 г. – 26,0 %, в 2011 г. – 15,2 %).

Количество случаев позднего обращения людей за медицинской помощью (на 5-й день от начала заболевания и позже), в целом, незначительно возросло – 23 случая (23,2 %) против 20 (29 %) в 2010 г. В день обращения были госпитализированы 64,6 % заболевших. Факты поздней госпитализации выявлены у 11,1 % больных, обратившихся за медицинской помощью. Первичный диагноз КГЛ при обращении за медицинской помощью был поставлен лишь в 56,5 % случаев. Доля поздней диагностики (на 4-й день после госпитализации и позже) составила 17,2 %.

Количество лиц, обратившихся в лечебно-профилактические учреждения по поводу укусов клещами, в 2011 г. возросло до 24940, в том числе детей 7755 (2010 г. – 22192 и 6728 соответственно).

Погодно-климатические условия зимы 2010–

2011 гг. способствовали благоприятной перезимовке иксодовых клещей. Активизация иксодид в 2011 г. на территориях большинства регионов произошла в конце III декады марта – начале I декады апреля, в те же сроки, что и в 2010 г. Пик численности иксодовых клещей пришелся на май.

В 2011 г., в целом, численность клещей в субъектах ЮФО и СКФО не превышала показателей 2010 г. В марте и апреле во всех регионах индексы обилия клещей на животных в 2011 г. были значительно ниже, чем в предыдущем. Это связано с низкими средними суточными температурами в ранний весенний сезон. Однако в мае–июне индексы обилия клещей на крупном рогатом скоте (КРС) достигли прошлогодних значений, а в июле–августе в некоторых регионах даже превысили их: в Республике Калмыкия индекс обилия клещей на КРС в августе был в 2 раза выше, чем в 2010 г., в Ставропольском крае – в 1,6 раза.

В период эпидсезона КГЛ на базах лабораторий особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации и противочумных станциях в регионах было исследовано 4815 проб иксодовых клещей на наличие антигена вируса ККГЛ, выявлено 367 положительных (7,6 %), в 2010 г. – 5452 проб, из них 453 положительных (8,3 %). Антиген вируса ККГЛ в иксодовых клещах, кроме того, был выявлен в Кабардино-Балкарской республике (зараженность клещей 16,0 %), Республике Ингушетия (26,7 %) и Краснодарском крае (0,9 %), хотя случаев заболевания там не наблюдалось (таблица).

Высокая зараженность имаго и преимагинальных фаз иксодовых клещей, достигающая по отдельным субъектам ЮФО и СКФО от 3,3 % (Астраханская область) до 18,1 % (Ростовская область), свидетельствует об активной циркуляции вируса ККГЛ в природном очаге.

Эпизоотологическое обследование стационарных участков природного очага КГЛ в Ставропольском крае показало, что массовая активность нимф основного резервуара и переносчика возбудителя КГЛ, клеща *Hyalomma marginatum*, отмечалась в начале третьей декады июля, индекс обилия соста-

Зараженность иксодовых клещей вирусом ККГЛ на юге России

Субъект РФ	2010 г.			2011 г.		
	всего исследовано	из них положительных	% положительных	всего исследовано	из них положительных	% положительных
Ставропольский край	1311	84	6,4	1254	116	9,3
Ростовская область	273	17	6,2	177	32	18,1
Республика Калмыкия	537	15	2,8	292	43	14,7
Астраханская область	530	8	1,5	368	12	3,3
Республика Дагестан	573	242	42,2	255	35	13,7
Волгоградская область	126	23	18,3	514	8	1,6
Республика Ингушетия	169	58	34,3	90	24	26,7
КБР	3	0	0,0	60	37	16,0
Краснодарский край	473	6	1,3	217	2	0,9
ИТОГО	5452	453	8,3	4815	367	7,6

вил 14,0 экз. на грачах и 7,4 экз. на домашней птице. Индекс обилия преимагинальных фаз *H. marginatum* на птицах семейства врановых превысил показатель 2010 г. в 3,3 раза, что предполагает высокую численность имаго в 2012 г.

Согласно прогнозу, составленному специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем КГЛ на основании эпизоотологического обследования природного очага КГЛ юга европейской части России, уровень эпизоотической активности в 2012 г. ожидается не ниже показателей 2011 г. В случае несвоевременного проведения профилактических мероприятий в субъектах ЮФО и СКФО, предусмотренных методическими указаниями «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки» (МУ 3.1.1.2488-09), в первую очередь, акарицидных обработок сельскохозяйственных животных, барьерных акарицидных обработок летних оздоровительных учреждений и природных биотопов, заболеваемость Крымской геморрагической лихорадкой может превысить уровень 2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А. и др. Эпидемиологическая обстановка по Крымской геморрагической лихорадке на Юге России в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):13–5.
2. Малецкая О.В., Харченко Т.В., Брюханова Г.Д., Бейер А.П., Василенко Н.Ф., Антоненко А.Д., Куличенко А.Н. Эпидемическая ситуация и заболеваемость Крымской геморрагической лихорад-

кой в Южном федеральном округе. Здоровье населения и среда обитания. 2010; 5(206):35–7.

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

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

1. Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Tokhov Yu.M., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A. et al. [Epidemiological situation of Crimean hemorrhagic fever in the South of Russia in 2010 and prognosis for the year of 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:13–15.
2. Maletskaya O.V., Kharchenko T.V., Bryukhanova G.D., Beyer A.P., Vasilenko N.F., Antonenko A.D., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation and Crimean hemorrhagic fever morbidity rate in the Southern Federal District]. Zdor. Nas. Sreda Obit. 2010; 5(206):35–7.
3. Onishchenko G.G., Efremenko V.I. [Crimean-Congo hemorrhagic fever in Southern Russia]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 4:86–90.

Authors:

Vasilenko N.F., Volynkina A.S., Varfolomeeva N.G., Zaikina I.N., Maletskaya O.V., Ashibokov U.M., Tokhov Yu.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Smolensky V.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russia.

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

Об авторах:

Василенко Н.Ф., Волынкина А.С., Варфоломеева Н.Г., Заикина И.Н., Малецкая О.В., Ашибокров У.М., Тохов Ю.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Смоленский В.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.

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

Поступила 14.02.12.

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

ОБ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2011 г. И ПРОГНОЗ НА 2012 г.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Представлен анализ заболеваемости людей и животных бруцеллезом в Российской Федерации в 2007–2011 гг., дана оценка эпизоотической и эпидемической ситуации по бруцеллезу. Показано, что эпидемическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации остается напряженной и имеет тенденцию к ухудшению. Прогнозируется увеличение количества заболеваний людей бруцеллезом в 2012 г.

Ключевые слова: бруцеллез, заболеваемость, эпидемический, эпизоотический процесс.

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

Brucellosis Epidemiological Situation and Morbidity in the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol

Presented is the analysis of brucellosis morbidity, both in humans and animals, in the Russian Federation in 2007–2011. Evaluated is epizootic and epidemic situation on the disease. Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation remains unfavorable and has a tendency to deterioration. Moreover, it is expected that the incidence of brucellosis in humans will rise in 2012.

Key words: brucellosis, morbidity, epidemic, epizootic process.

Бруцеллез остается одной из наиболее распространенных инфекций в группе особо опасных зоонозов, имеющих значительный удельный вес в инфекционной патологии человека [2, 4]. По уровню наносимого экономического ущерба бруцеллез продолжает занимать среди зоонозных инфекций одно из ведущих мест, а его ликвидация остается актуальной проблемой [3, 5, 7].

Происходящие изменения социально-экономического уклада в сельском хозяйстве в Российской Федерации и в сопредельных государствах, связанные с увеличением количества индивидуальных, крестьянских (фермерских) хозяйств, акционерных обществ, развитием малого и среднего бизнеса в сельскохозяйственной отрасли, продолжающаяся реализация сельскохозяйственных животных с нарушением санитарно-ветеринарных норм и правил, активизация миграционных процессов населения и животных способствуют ухудшению эпизоотической и эпидемической обстановки по бруцеллезу.

Развитие и расширение партнерских экономических связей между странами-участниками Содружества Независимых Государств, создание Таможенного союза Республики Беларусь, Республики Казахстан и Российской Федерации, упрощение процедуры пограничного контроля товаров и грузов при пересечении границ создают условия, при которых возрастает риск завоза большого бруцеллезом поголовья крупного (КРС) и мелкого рогатого скота (МРС), а также животноводческой продукции на территорию приграничных районов Российской Федерации.

В этих условиях необходимо продуктивное взаи-

модействие таможенных органов, территориальных органов управления здравоохранением, санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора по обеспечению эпизоотического и эпидемического благополучия по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных и предупреждению заражения людей.

Целью настоящего исследования был анализ эпизоотической и эпидемической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2007–2011 гг. и прогноз вероятного развития эпидемической ситуации в 2012 г.

Материалы и методы

Источником информации для оценки состояния эпидемической и эпизоотической обстановки по бруцеллезу в субъектах Российской Федерации служили официальные статистические данные Роспотребнадзора, Россельхознадзора, ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации за 2007–2011 гг.

Результаты и обсуждение

В последние 5 лет эпизоотическая и эпидемическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации остается напряженной [5].

По данным ФГУ «Центр ветеринарии» Минсельхоза России [1], в 2011 г. (11 мес.) выявлено 312 новых неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС, что на 18,3 % больше, чем за аналогич-

ный период 2010 г.

В 2011 г. (11 мес.) выявлено 273 неблагополучных пункта по бруцеллезу КРС, что на 24,1 % больше, чем в 2010 г. (207 пунктов). Неблагополучные пункты по бруцеллезу КРС зарегистрированы в 29 субъектах Российской Федерации: в Ставропольском крае – 80 пунктов, в Астраханской области – 72, в Республике Ингушетия – 23, в Краснодарском крае – 18, в Карачаево-Черкесской Республике – 13, в Ростовской области – 10, в Республике Дагестан – 7, в Саратовской области, республиках Бурятия, Калмыкия, Приморском крае – по 6, в Чеченской Республике, Забайкальском крае, Оренбургской области – по 4 пункта; в остальных 15 субъектах выявлены единичные неблагополучные пункты.

Количество выявленных неблагополучных пунктов по бруцеллезу МРС в 2011 г. (11 мес.) (39 пунктов) увеличилось на 11,4 % по сравнению с аналогичным периодом 2010 г. (35 пунктов). Наибольшее их количество зарегистрировано в 8 субъектах Российской Федерации: в Ставропольском крае – 6 пунктов, в Орловской области – 5, в Тульской области, республиках Хакасия, Дагестан, Калмыкия, Красноярском и Приморском краях – по 3 пункта. В остальных шести регионах выявлены единичные неблагополучные пункты по бруцеллезу МРС.

В неблагополучных пунктах по бруцеллезу КРС и МРС в 2007–2011 гг. ежегодно регистрируется от 7000 до 11000 больных бруцеллезом животных.

Приведенные данные свидетельствуют, что эпизоотическая ситуация по бруцеллезу в России продолжает ухудшаться, тренды по неблагополучию возрастающие (рис. 1).

Неблагополучными территориями Российской Федерации по бруцеллезу животных являются Северо-Кавказский (СКФО), Сибирский (СФО) и Южный (ЮФО) федеральные округа. Эти территории характеризуются разнообразием климатогеографических условий, национальных особенностей и экономического уклада. Однако общим для всех является интенсивное развитие животноводства, сопровождающееся распространением бруцеллеза среди КРС и МРС.

Вместе с тем заболевания людей бруцеллезом в 2007–2011 гг. выявлялись также в субъектах Российской Федерации, в которых, по данным Россельхознадзора, больные бруцеллезом сель-

скохозяйственные животные не регистрировались (Воронежская область – 13 больных, Томская область – 2, Республика Саха (Якутия), Республика Татарстан, Магаданская и Кировская области – по 1 больному), вследствие перемещения больных сельскохозяйственных животных между субъектами Российской Федерации с нарушением санитарно-ветеринарных правил.

Распространению бруцеллезной инфекции среди животных способствует также наличие скрытых бруцеллоносителей среди МРС из-за длительно сохраняющихся поствакцинальных реакций, не подлежащих надежной дифференциации с помощью существующих диагностических методов, несвоевременная сдача животных на убой, отказ от предоставления животных для проведения ветеринарных обработок, подворный убой больных бруцеллезом животных, отсутствие должного контроля со стороны муниципальных органов за вводом и регистрацией нового поголовья.

При современных условиях ведения животноводства в зоне повышенного риска заражения бруцеллезом находится, в основном, население, имеющее непосредственное отношение к разведению и содержанию животных в индивидуальных и крестьянских (фермерских) хозяйствах и употребляющие в пищу производимую животноводческую продукцию.

Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации является отражением негативных тенденций в эпизоотической обстановке.

Наблюдается тенденция к увеличению количества людей с впервые выявленным бруцеллезом: в 2007 г. – 296 больных (интенсивный показатель (ИП) на 100 тыс. населения – 0,21), в 2008 г. – 410 (ИП – 0,29), в 2009 г. – 409 (ИП – 0,29), в 2010 г. – 431 (ИП – 0,30), в 2011 г. – 487 случаев (ИП – 0,34), что на 11,4 % больше, чем в 2010 г. (рис. 2).

В 2011 г. по сравнению с 2010 г. увеличилось на 48,8 % количество заболевших бруцеллезом детей. Тренды заболеваемости бруцеллезом взрослого и детского населения возрастающие (рис. 3).

Больные бруцеллезом зарегистрированы на территории 35 субъектов Российской Федерации. Основная часть больных бруцеллезом людей (более 90 %) выявлена в СКФО (57,8 %), СФО (21,0 %) и ЮФО (13,12 %).



Рис. 1. Динамика регистрации неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС в 2007–2011 гг.

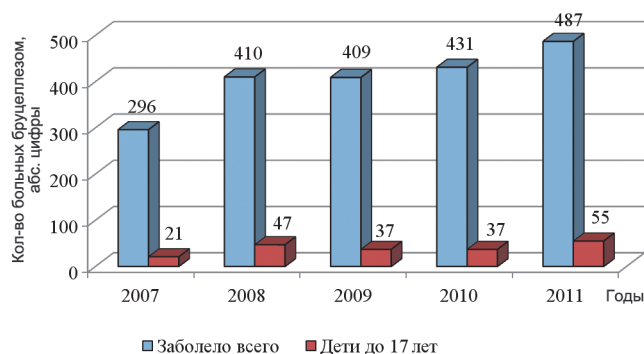


Рис. 2. Количество больных бруцеллезом людей в Российской Федерации в 2007–2011 гг.

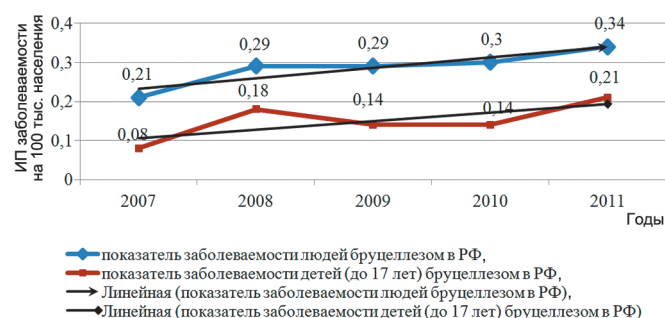


Рис. 3. Заболеваемость людей бруцеллезом в Российской Федерации в 2007–2011 гг. (на 100 тыс. населения)

Большую часть больных с впервые установленным бруцеллезом составляют мужчины – около 70 %. Заражение происходило в 32,4 % случаев контактным путем, в 21,9 % – алиментарным, в 8,2 % – смешанным. У 37,5 % больных источник и путь передачи инфекции установить не удалось.

В СКФО в 2011 г. бруцеллезом заболело 288 человек (ИП – 3,12). Наиболее высокая заболеваемость людей бруцеллезом зарегистрирована в Республике Дагестан среди взрослого (199 человек, ИП – 7,30) и детского (24 человека, ИП – 3,0) населения. Обращает внимание высокая численность детей, заразившихся бруцеллезом (43,6 % от общероссийской), что, вероятно, является следствием привлечения их к уходу за сельскохозяйственными животными в индивидуальных хозяйствах. От больных бруцеллезом людей было изолировано 5 штаммов возбудителя бруцеллеза, которые изучены в Референс-центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза и идентифицированы как *Brucella (B.) melitensis*, 3 биовар. Высокая заболеваемость людей бруцеллезом свидетельствует о значительном распространении этой инфекции среди сельскохозяйственных животных.

В Ставропольском крае в 2011 г. выявлено 76 случаев заболевания людей бруцеллезом (ИП – 2,81), из них 3 – среди детей (ИП – 0,58). В 2011 г. в крае количество заболевших бруцеллезом по сравнению с 2010 г. увеличилось на 5,6 %. В остальных субъектах СКФО регистрировались единичные случаи.

В СФО в 2011 г. зарегистрировано 77 случаев заболеваний бруцеллезом (ИП – 0,39), в том числе детей – 16 (ИП – 0,41). При этом на Республику Тыва приходится более 50 % случаев среди взрослого населения (39 человек, ИП – 12,36) и 87,5 % – среди детей (14 человек, ИП – 13,48). В Республике Тыва от больных людей бруцеллезом изолировано 16 культур возбудителя вида *B. melitensis*. В двух субъектах СФО, в Забайкальском крае и Новосибирской области, выявлено по 10 случаев заболевания людей бруцеллезом, в остальных – единичные случаи.

В ЮФО в 2011 г. зарегистрировано 59 больных бруцеллезом (ИП – 0,43). Основная часть больных, 40 человек (67,8 %), выявлена в Республике Калмыкия. В этой республике самый высокий в Российской Федерации показатель заболеваемости на 100 тыс. населения – 14,11. Среди детского населения реги-

стрирован один случай заболевания. От больных бруцеллезом людей изолировано 6 штаммов возбудителя бруцеллеза, которые изучены и идентифицированы как *B. melitensis*, 3 биовар. В Волгоградской области бруцеллез диагностирован у 11 человек (ИП – 0,42), в том числе один случай заболевания среди детей. В остальных субъектах округа регистрировались единичные случаи.

В Приволжском федеральном округе в 2011 г. зарегистрировано 48 больных бруцеллезом (ИП – 0,16), в том числе 8 случаев среди детей (ИП – 0,14). Основная часть заболевших бруцеллезом – 33 случая (ИП – 1,56), в том числе 8 детей (ИП – 1,93) – зарегистрирована в Оренбургской области, что составило 68,8 % от количества больных в округе. До 2011 г. в Оренбургской области регистрировались лишь единичные случаи заболеваний людей бруцеллезом. При обследовании больных бруцеллезом было изолировано 8 штаммов возбудителя бруцеллеза, которые изучены и идентифицированы как *B. melitensis*, 1 биовар.

В Центральном федеральном округе в 2011 г. заболевания бруцеллезом установлены у 7 человек (ИП – 0,02), из них 3 – жители Москвы. В Орловской области, где за последние 5 лет заболеваний бруцеллезом не было, в 2011 г. заболел 1 человек (ИП – 0,12), от которого изолирован возбудитель бруцеллеза, идентифицированный как *B. melitensis*, 3 биовар. Характерно, что этот биовар возбудителя бруцеллеза вида *B. melitensis* изолируется от людей в СКФО и ЮФО.

Таким образом, результаты анализа заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2007–2011 гг. свидетельствуют о сохраняющейся негативной динамике развития эпизоотической и эпидемической обстановки по бруцеллезу, что обусловлено ростом числа неблагополучных пунктов по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных (КРС и МРС) и ростом числа заболеваний людей.

Проведенный Референс-центром по мониторингу за возбудителем бруцеллеза анализ работы лабораторий особо опасных инфекций (ООИ) ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации по диагностике бруцеллеза в 2008–2011 гг. показал, что лаборатории оснащены всем необходимым оборудованием, медицинскими иммунобиологическими препаратами (МИБП), питательными средами для проведения анализов на бруцеллез, в работу внедряются современные методы исследования – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и иммуноферментный анализ (ИФА). В лабораториях ООИ от людей изолировано 65 штаммов возбудителя бруцеллеза (в Республике Калмыкия – 16 штаммов, Республике Дагестан – 5, Республике Тыва – 16, Оренбургской области – 6, Омской области – 21, Орловской области – 1 штамм). Референс-центром по мониторингу за возбудителем бруцеллеза получено и изучено 16 штаммов возбудителя бруцеллеза, изолированных в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Республике Калмыкия, 5 – в Республике Дагестан, 6 – в Оренбургской области, 1 – в Орловской области.

Результаты окончательной идентификации штаммов бруцелл доведены до направлявших их учреждений.

В 2011 г. была продолжена работа по совершенствованию нормативной базы лабораторной диагностики бруцеллеза, разработке новых МИБП.

В рамках НИР по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009-2013 годы)» разработан проект МУ «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». В ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора разработан препарат «Сыворотка диагностическая бруцеллезная поливалентная сухая для реакции агглютинации (РА) пробирочной и ускоренной на стекле», в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора – транспортная среда для проб, исследуемых на бруцеллез.

Прогноз развития эпидемической ситуации по бруцеллезу в 2012 г. будет определяться сохраняющейся неблагоприятной динамикой показателей основных факторов эпизоотического процесса среди сельскохозяйственных животных в особо неблагополучных по бруцеллезу субъектах Российской Федерации (СКФО, СФО и ЮФО), интенсивностью миграционных процессов сельскохозяйственных животных между административными субъектами Российской Федерации и сопредельными государствами, качеством проведения оздоровительных мероприятий в неблагополучных по бруцеллезу КРС и МРС хозяйствах, а также степенью охвата угрожаемых контингентов населения специфической вакцинопрофилактикой. Возможным дополнительным дестабилизирующим фактором может послужить перевод личных свиноводческих подсобных хозяйств на альтернативные виды животноводства (овцеводство, козоводство, разведение КРС) из-за сохраняющейся напряженной ситуации по африканской чуме свиней в субъектах СКФО и ЮФО. В связи с этим возрастает опасность неконтролируемого завоза КРС и МРС с нарушением санитарно-ветеринарных правил по порядку ввода и содержания животных и, как следствие, пополнение хозяйств животными, больными бруцеллезом с последующим заражением людей. Возможны групповые случаи заболевания бруцеллезом в административных субъектах Российской Федерации, в которые будут направляться для откорма и содержания поголовья КРС и МРС из субъектов, где сохраняется эпизоотическое неблагополучие по бруцеллезу, а также в субъектах Российской Федерации, сопредельных с республиками Азербайджан и Казахстан, эндемичных по бруцеллезу.

Анализ заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2011 г. свидетельствует о том, что для стабилизации уровня заболеваемости бруцеллезом и поэтапного ее снижения необходимо тесное взаимодействие служб санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора, повышение эффективности диагностических исследований, дальнейшее

совершенствование системы эпидемиологического и эпизоотологического надзора за бруцеллезом на основе новых информационных технологий (ГИС-технологий), совершенствование и разработка новых диагностических препаратов. На территориальном (муниципальном) уровне требуется наведение порядка в системе учета животных в фермерских и личных подсобных хозяйствах, усиление контроля за перемещением поголовья МРС и КРС с целью недопущения ввода в хозяйства животных, больных бруцеллезом, своевременное проведение противобруцеллезных мероприятий.

С учетом негативной тенденции в развитии эпизоотического и эпидемического процессов можно прогнозировать увеличение количества заболеваний людей бруцеллезом в 2012 г. на 5–10 % от средних величин многолетних наблюдений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бруцеллез животных. Эпизоотическая ситуация по особо опасным болезням животных на территории Российской Федерации в 2011 году. Официальный интернет-портал ФГУ «Центр ветеринарии». 14.12.2011. <http://www.vet-center.ru/page5.php> (дата обращения 01.02.2012).
2. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Хадарцев О.С. и др. Состояние заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации. Дез. дело. 2009; 2:38–40.
3. Литвинов О.Б., Дебришев Д.А., Янышев А.А. Бруцеллез в России. Ветеринарная жизнь. 2007; 2:14.
4. 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. 2010; 5:20–2.
5. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнев С.И., Русанов Д.В., Куличенко А.Н. Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):20–3.
6. Пакскина Н.Д. Эпидемиологическая обстановка и основные направления профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Современные требования к организации санитарной охраны территорий Российской Федерации в рамках реализации ММСП (2005 г.). Дез. дело. 2009; 3:23–9.

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

1. [Brucellosis in animals. Epizootic situation on particularly dangerous infectious diseases in animals in the territory of the Russian Federation in 2011]. Official web-site of the Federal State Institution "Center of Veterinary". 14.12.2011 [cited 01.02.2012]. Available from: <http://www.vet-center.ru/page5.php>
2. Zheludkov M.M., Tsirel'son L.E., Khadartsev O.S. et al. [Situation on brucellosis morbidity in the Russian Federation]. Dез. Delo. 2009; 2:38–40.
3. Litvinov O.B., Debrishev D.A., Yanyshv A.A. [Brucellosis in the Russian Federation]. Vet. Zhizn'. 2007; 2:14.
4. Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2009. Prognosis for 2010]. Zd. Nas. Sreda. Obit. 2010; 5:20–2.
5. Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Vilinskaya S.V., Golovnev S.I., Rusanov D.V., Kulichenko A.N. [Epizootological and epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):20–3.
6. Pakskina N.D. [Epidemiological situation and basic trends in prophylaxis of particularly dangerous and natural foci infections in the Russian Federation. Modern requirements to sanitary control management in the territory of the Russian Federation within the frames of IHR (2005) implementation]. Dез. Delo. 2009; 3:23–9.

Authors:

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Rusanova D.V., Golovneva S.I., Vilinskaya S.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., Русанова Д.В., Головнёва С.И., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 15.02.12.

А.К.Носков¹, А.Я.Никитин¹, Н.Д.Пакскина², Е.А.Сидорова¹, М.В.Чеснокова¹, Е.И.Андаев¹

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО КЛЕЩЕВОМУ ВИРУСНОМУ ЭНЦЕФАЛИТУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (2009–2011 гг.) И ПРОГНОЗ НА 2012 г.

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск;

²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Анализ эпидемиологической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту на территории России с учетом данных еженедельного эпидемиологического мониторинга 2009–2011 гг., осуществляемого учреждениями Роспотребнадзора по субъектам РФ, показал, что длительное снижение уровня заболеваемости, наблюдавшееся в начале XXI века, в последние три года сменилось незначительным подъемом. В 2012 г. при отсутствии весенних, раннелетних погодных аномалий и лесных пожаров уровень заболеваемости населения в РФ может иметь тенденцию к превышению показателя 2011 г. Используемый на большинстве эндемичных территорий комплекс мер профилактики болезни соответствует целям предотвращения резкого подъема уровня заболеваемости, но недостаточен для существенного снижения эпидемиологической напряженности.

Ключевые слова: клещевой вирусный энцефалит, заболеваемость, прогноз.

A.K.Noskov¹, A.Ya.Nikitin¹, N.D.Pakskina², E.A.Sidorova¹, M.V.Chesnokova¹, E.I.Andaev¹

Epidemiological Situation on the Tick-Borne Viral Encephalitis in the Russian Federation in 2009–2011 and Prognosis for 2012

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk;

²Federal Service on Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow

Analysis of the epidemiological situation on the tick-borne viral encephalitis in the territory of the Russian Federation with due consideration to weekly epidemiological monitoring data (2009–2011), conducted by Rospotrebnadzor organizations in the corresponding constituent entities, testifies of the fact that continuous decrease in morbidity, characteristic of the early XXI century, has given way to a slight increase within the past three years. Given that there are no spring or early-summer weather anomalies or forest fires, morbidity rates among the population of the Russian Federation in 2012 can tend to exceed 2011 rates. Comprehensive set of measures applied for the disease control and prevention in the majority of endemic territories is quite effective in view of averting sharp upturn of morbidity rates, but nevertheless is not sufficient in view of the suppression of epidemiological situation.

Key words: tick-borne viral encephalitis, morbidity, prognosis.

На протяжении многих лет эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ) в Российской Федерации (РФ) остается неблагоприятной. Актуальность проблемы определяется широтой нозоареала инфекции, преимущественным поражением взрослых работоспособных жителей городов, наличием летальных случаев.

Цель данной работы – анализ заболеваемости населения КВЭ в округах РФ за 2009–2011 гг. и прогноз на 2012 г.

Материалы и методы

Анализ ситуации по КВЭ проведен на основании представленных в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека данных по еженедельному эпидемиологическому мониторингу, осуществляемого учреждениями Роспотребнадзора в субъектах РФ за 2009–2011 гг., который включал данные по заболеваемости и летальности населения КВЭ, числу лиц, обратившихся в лечебные профилактические учреждения (ЛПУ) по поводу контакта с иксодовыми клещами, вирусофорности переносчика, объемам мероприятий специфической и неспецифической профилактики.

Статистическая обработка собранного материала и прогноз проведены на основе стандартных методов вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Эпидемиологическая ситуация по КВЭ в РФ остается напряженной, несмотря на начавшийся в 2000 г. спад заболеваемости (рис. 1). Так, средний интенсивный показатель за 2000–2003 гг. составил $(3,9 \pm 0,26)$ случаев на 100 тысяч населения (‰_{0000}), 2004–2007 гг. – $(2,7 \pm 0,22)$, 2008–2011 гг. – $(2,0 \pm 0,14)$. Наблюдавшееся в начале XXI века изменение эпидемиологической ситуации может быть связано как с циклическостью течения эпидемического процесса, характерной для этой инфекции [1, 2, 6, 7, 10], так и с деградацией очагов КВЭ на обустроенных в конце XX века территориях пригородных зон [4, 5]. Вместе с тем в 2009 г. в шести из восьми округов и в целом по стране уровень заболеваемости КВЭ вновь увеличился (рис. 1). В 2010 г. ряд причин привел к ограничению количества контактов населения с природными биотопами и уменьшению заболеваемости [8], тем не менее, тенденция к снижению проявления КВЭ, характерная для начала нового тысячелетия, сменилась и уже в течение трех лет наблюдается незначительный подъем заболеваемости (рис. 1).

По данным еженедельного эпидемиологического мониторинга в эпидемический сезон 2011 г., на территории страны зарегистрировано 3077 случаев заболевания людей КВЭ, в том числе у 366 детей до 14 лет (таблица). Показатель заболеваемости составил

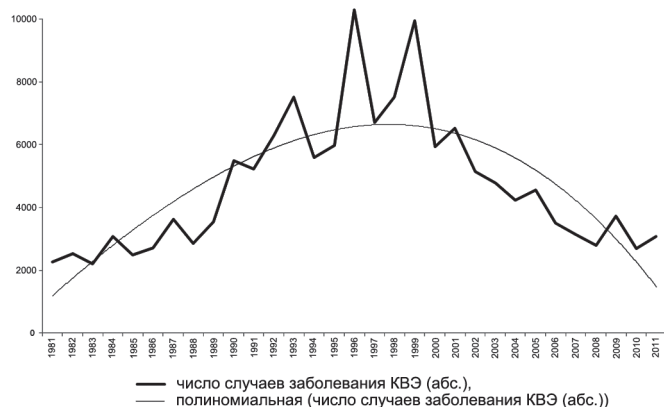


Рис. 1. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации за 1981–2011 гг. (число зарегистрированных случаев)

2,2 ‰. В 33 случаях заболевания людей закончились летальным исходом (один подросток 17 лет – 3,0 %).

Наибольшая заболеваемость населения КВЭ (2009–2011 гг.) наблюдалась в Сибирском федеральном округе (СФО) ($47,7 \pm 0,53$ %) и составила в среднем $7,3$ ‰, что значительно выше, чем в РФ ($2,1$ ‰). Больные КВЭ выявлены во всех 12 субъектах СФО. Самой неблагополучной территорией является Красноярский край ($17,1$ ‰), на который приходится ($16,3 \pm 0,39$ %) от случаев КВЭ в РФ и ($34,2 \pm 0,73$ %) от СФО. Кроме того, высокие показатели регистрируются в Республиках Алтай ($21,4$ ‰), Тыва ($13,6$), Хакасия ($9,2$), Бурятия ($6,2$), в Томской ($12,9$), Кемеровской ($8,2$) и Новосибирской ($6,3$) областях, где заболеваемость превышает среднюю по стране в четыре и более раз. Эпидемиологическая ситуация по КВЭ в вышеперечисленных субъектах является определяющей для округа. Летальные исходы отмечены на территории восьми его субъектов: Кемеровской (6 случаев) и Новосибирской (6) областей, Красноярского края (5), Республик Тыва (4) и Бурятия (3), Томской (3) области, Алтайского (2) и Забайкальского (2) краев.

Из других округов (таблица) высокие показатели заболеваемости населения КВЭ характерны для территорий Уральского (УФО) и Северо-Западного (СЗФО) федеральных округов (соответственно, 4,3

и $2,8$ ‰; ($47,0 \pm 0,53$ %) от общего числа случаев). Наиболее неблагополучными являются Курганская ($13,3$ ‰), Кировская ($11,0$), Вологодская ($7,9$), Архангельская ($7,8$) области, Пермский край ($7,8$), Республика Карелия ($6,0$), Удмуртская Республика ($4,5$), Свердловская ($3,9$), Тюменская ($3,2$), Псковская ($3,0$) и Челябинская ($2,6$) области. Летальность по этим округам составляет 1,8 и 1,7 % соответственно, с колебаниями от 0,3 % в Курганской (УФО) до 12,5 % в Новгородской областях (СЗФО).

Заболеваемость населения КВЭ регистрировали на территориях 52 (2009 г.), 50 (2010 г.) и 46 (2011 г.) субъектов РФ. Однако для ряда из них характерны лишь единичные случаи, наблюдавшиеся только в один из сезонов. Таких субъектов в 2009 г. было 19, 2010 – 18, 2011 – 11. Традиционно практически отсутствуют случаи регистрации больных на территориях Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Такой уровень проявлений спорадической заболеваемости КВЭ может наблюдаться на эндемичных территориях [4], но также может являться следствием завоза инфекции из других округов.

Подъем заболеваемости КВЭ (рис. 2) начинается с конца марта-начала апреля (18 календарная неделя) и формируется за счет СФО; в последующем, к концу мая (22-я неделя), единичные случаи КВЭ наблюдаются уже на эндемичных территориях всех федеральных округов. В течение июня (22–25-я неделя) происходит постепенный подъем заболеваемости, обусловленный преимущественно ее увеличением в СФО и, в меньшей степени, в УФО, СЗФО и Приволжском федеральном округе (ПФО). Высокий уровень заболеваемости отмечается с середины июня до середины сентября (25–37 неделя), составляя ($88,3 \pm 0,34$ %) от всех зарегистрированных КВЭ случаев. В этот период во внутригодовой динамике прослеживается два независимых пика. Первый – в начале июля (27-я неделя) формируется за счет максимального числа клинических форм КВЭ в СФО и первого подъема заболеваемости в СЗФО, второй – конец июля – начало августа (31-я неделя), обусловлен вовлечением, в первую очередь, УФО, а также продолжающимися случаями регистрации заболеваний в СФО, СЗФО и ПФО.

Заболеваемость населения округов РФ клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ) и число случаев обращения людей в лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) после контактов людей с иксодовыми клещами за 2009–2011 гг. и прогноз на 2012 г. (по данным еженедельного эпидемиологического мониторинга)

Регион	2009 г.			2010 г.			2011 г.			Сумма за 3 года		Средне-многолетний показатель, ‰	90 % доверительный интервал изменения значений прогноза (от/до, ‰)
	Заболеваемость КВЭ		Число обращений в ЛПУ	Заболеваемость КВЭ		Число обращений в ЛПУ	Заболеваемость КВЭ		Число обращений в ЛПУ	Абс. числа случаев КВЭ			
	Абс.	‰		Абс.	‰		Абс.	‰					
РФ	3058	2,2	499313	2682	1,9	452472	3077	2,2	565595	9891	1517380	2,1±0,10	1,6/2,6
ЦФО	125	0,3	84216	72	0,2	55771	66	0,2	87457	283	227444	0,23±0,05	0/0,5
СЗФО	506	3,7	69840	345	2,5	74954	296	2,2	66959	1209	211753	2,8±0,46	0,4/5,2
ПФО	614	2,1	106683	405	1,4	90285	467	1,6	114293	1736	311261	1,7±0,21	0,6/2,7
УФО	375	3,1	68506	479	4,0	70577	688	5,7	121800	1707	260883	4,3±0,76	0,4/8,1
СФО	1389	7,2	148070	1321	6,9	145309	1521	7,9	155773	4592	449152	7,8±0,43	5,7/10,0
ДФО	48	0,8	21998	60	1,0	15576	39	0,6	19313	164	56887	0,8±0,10	0,3/1,3

Примечание: ЦФО – Центральный федеральный округ; СЗФО – Северо-Западный федеральный округ; ПФО – Приволжский федеральный округ; УФО – Уральский федеральный округ; СФО – Сибирский федеральный округ; ДФО – Дальневосточный федеральный округ.

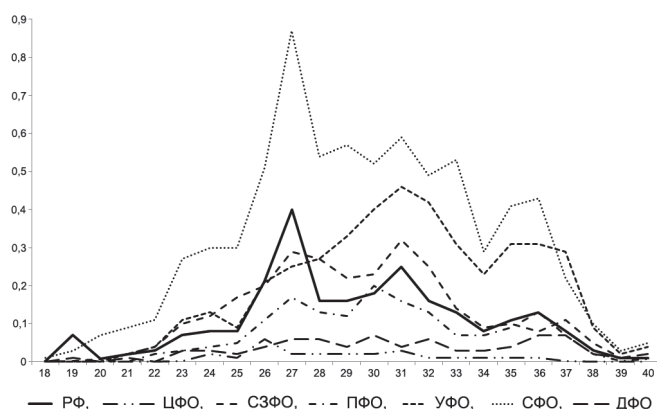


Рис. 2. Понедельная динамика заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в федеральных округах Российской Федерации в 2009–2011 гг. (‰/10000)

Заболеваемость в Центральном (ЦФО) и Дальневосточном (ДФО) федеральных округах в настоящее время существенно не влияет на интенсивность проявления эпидемического процесса в РФ (таблица, рис. 2). Однако на территории ряда субъектов этих округов часто регистрируют летальные исходы, что требует особого внимания к причинам такого явления. Так, если в РФ летальность от КВЭ составила 1,4 %, то на территории ЦФО – 3,0, а в ДФО – почти 11,0 %.

Неблагополучная эпидемиологическая обстановка по КВЭ в РФ связана с высокой численностью иксодовых клещей, в том числе в селитебных зонах, их зараженностью вирусом клещевого энцефалита, недостаточной иммунной прослойкой населения на эндемичных территориях субъектов.

Зараженность вирусом клещевого энцефалита по РФ составила 3,7 % для иксодовых клещей, снятых с людей, и 1,2 % – собранных с растений (при индивидуальном исследовании методом иммуноферментного анализа). Наибольшие показатели вирусофорности клещей, снятых с людей, отмечены в ПФО и УФО (соответственно 7,1 и 4,8 %), наименьшие – в ДФО и ЦФО (по 0,5 %). Высокая инфицированность клещей вирусом клещевого энцефалита наблюдается в Удмуртской Республике (13,6 %), Кировской области (12,5), Республике Коми (10,2), Томской области (9,9), Курганской области (7,8), Республике Хакасия (6,4), Республике Алтай (4,6).

Значительное влияние на интенсивность эпидемического процесса оказывает возрастающее число контактов населения с переносчиком (таблица). Так, в течение 2011 г. в 68 субъектах в лечебно-профилактические учреждения страны по поводу присасывания клещей обратилось 562595 чел. (из них детей – 121838), что больше, чем в 2009 и 2010 гг., соответственно на 11,7 и 20,0 %.

Максимум обращений в ЛПУ приходится на СФО. За 2009–2011 гг. на территории округа нападению клещей подверглось 449152 чел., что составило 29,6 % от всех случаев, зарегистрированных в стране. По субъектам округа наибольшее количество присасываний отмечено в Кемеровской области (123897), Красноярском крае (65015), Томской (59043), Новосибирской (54847), Иркутской (43167)

областях и Алтайском крае (39069).

В ПФО с присасыванием клещей в ЛПУ обратилось 311261 чел. (20,5 % от всех случаев в РФ). Наибольшее количество зарегистрировано в Пермском крае (80629), Кировской области (56580), Удмуртской Республике (54358) и Республике Башкортостан (42027).

В ЦФО, УФО и СЗФО соответственно зарегистрировано 277444 (15,0 %), 260883 (17,2 %) и 211753 (14,0 %) обращений в ЛПУ. В ЦФО наибольшее число случаев отмечено в Москве (44737), Ярославской (30871) и Костромской (21792) областях. В УФО – в Свердловской (120557), Челябинской (63057) и Тюменской (44586) областях. В СЗФО – в Вологодской области (73306), Санкт-Петербурге (39650), Ленинградской (21962) и Архангельской (19649) областях.

Из всех округов страны в ДФО регистрируется наименьшее количество лиц, пострадавших от присасывания клещей, – 56887 (3,7 %), которые, в основном, приходятся на Приморский (21661) и Хабаровский (19331) края.

Между абсолютным числом случаев КВЭ (таблица) по субъектам РФ за 2009–2011 гг. (нулевые значения в ЮФО и СКФО исключены) и показателем обращаемости населения в ЛПУ после присасывания клещей за этот же период времени проявляется высокосignификантная достоверная корреляция ($r=0,869$; $df=16$; $P<0,001$). Однако внешние факторы, которые могли бы вести к росту этого показателя (социально-экономические условия жизни населения, естественный рост численности иксодид), в настоящее время не претерпевают на территории страны масштабных изменений. Это позволяет предположить, что увеличение обращаемости населения в ЛПУ, в значительной степени, обусловлено улучшением выявляемости контактов людей с клещами. Учитывая, что в 62 субъектах РФ функционирует более 170 лабораторий, где обратившимся проводят дифференциальную экспресс-диагностику клещей на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций, при отлаженной системе серопротекции и существенной неизменности эпизоотического состояния природных очагов, в конечном итоге между рассматриваемыми показателями должна установиться отрицательная связь. То есть, чем больше контактов выявлено, тем меньше будет зарегистрировано клинических проявлений КВЭ, т.к. оно характерно, в основном, для людей, не вакцинированных и не прошедших своевременного обследования в Центрах экспресс-диагностики трансмиссивных зоонозов [3]. Вместе с тем настораживают факты недостаточного (менее запланированного) финансирования закупок противоклещевого иммуноглобулина и неполного освоения отпущенных средств. Так, в 2011 г. это отмечено в Самарской, Нижегородской, Амурской, Ивановской областях, Республике Бурятия, Москве и Санкт-Петербурге.

Анализ мер специфической профилактики свидетельствует, что в период 2009–2011 гг. в РФ отмечено снижение охвата населения профилактическими прививками против КВЭ. Так, в 2010 г. объемы

вакцинации упали на 2,6 %, а в 2011 г. на 11,3 % по сравнению с 2009 г. главным образом за счет отдельных субъектов СФО и УФО. Например, в 2010 г. по сравнению с 2009 г. в СФО снижен охват населения профилактическими прививками в Красноярском крае (в 5,3 раза), Кемеровской (4,1) и Новосибирской (1,6) областях, Республике Бурятия (2,9); в УФО – в Челябинской (1,2) и Свердловской (1,1) областях.

Акарицидные обработки в настоящее время не влияют на уровень заболеваемости населения КВЭ в масштабах страны [9]. Несмотря на то, что их площади в большинстве субъектов РФ ежегодно увеличиваются (например, в 2011 г. составили 70680,2 га и выросли на 11,6 % по сравнению с 2010 г.), мероприятия носят локальный характер и затрагивают лишь крайне незначительную долю эндемичных площадей. Кроме того, необходимо учитывать, что применение разрешенных низкоперсистентных акарицидов требует во многих случаях двукратных обработок одних и тех же объектов, площади которых повторно включаются в суммарную цифру объемов проведенных мероприятий. Таким образом, хотя локальные акарицидные обработки, проводимые по показаниям, остаются необходимой мерой защиты ограниченных контингентов населения, более перспективным представляется направление, связанное с развитием средств индивидуальной защиты [4, 11]. Уровень применения населением акарицидно-репеллентных средств и специальных защитных костюмов, несмотря на их высокую эффективность [11], остается недостаточным.

Проведенный анализ позволяет ожидать некоторое превышение уровня заболеваемости КВЭ в 2012 г. по отношению к среднемуголетнему показателю, рассчитанному путем усреднения данных за трехлетний (2009–2011 гг.) относительно стационарный период (рис. 1). Это предположение обосновывается тем, что на очень многих эндемичных территориях отмечено прекращение тренда на снижение заболеваемости, наблюдавшееся в начале XXI века. Вместе с тем расчетные значения 2012 г. (таблица) справедливы при отсутствии в этот сезон весенне-летних погодных аномалий и лесных пожаров, подобных наблюдавшимся в 2010 г. Кроме того, усредненные оценки не учитывают возможности существенной интенсификации течения естественного эпизоотического процесса или изменения уровня контактов населения с переносчиком. Особенно настораживает ситуация с заболеваемостью населения КВЭ, складывающаяся в УФО, где на фоне трехлетнего роста обращаемости людей в ЛПУ (таблица), как отмечено выше, сокращаются объемы вакцинации населения. В этом случае прогноз, основанный на усреднении трехлетних материалов, не корректен, и фактический уровень заболеваемости может превысить ожидаемый.

В целом, считаем необходимым подчеркнуть, что проводимый в стране комплекс мер профилактики КВЭ при сложившихся социальных условиях соответствует целям предотвращения резкого подъема уровня заболеваемости, но недостаточен для существенного снижения эпидемиологической напряженности. Ослабление внимания к проведению опреде-

ленных мер профилактики, наблюдающееся в ряде субъектов, приведет к подъему заболеваемости КВЭ и другими трансмиссивными инфекциями, передаваемыми клещами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верета Л.А. Принципы прогнозирования заболеваемости клещевым энцефалитом. М.: Наука; 1975. 135 с.
2. Иерусалимский А.П. Клещевые инфекции в начале XXI века. Неврол. журн. 2009; 3:16–21.
3. Инфекции, передаваемые клещами в Сибирском регионе. Новосибирск: СО РАН; 2011. 395 с.
4. Коренберг Э.И. Современные черты природной очаговости клещевого энцефалита: новые черты или хорошо забытые? Мед. паразитол. 2008; 3:3–8.
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. Вopr. эпидемиол. 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., Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Балахонov С.В. Профилактика клещевого энцефалита на эндемичных территориях Сибирского федерального округа. Дез. дело. 2011; 2:60–5.
9. 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. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):24–9.
10. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации. Вopr. эпидемиол. 2007; 5:8–10.
11. Шашина Н.И., Германт О.М. Биологические особенности таежного клеща (*Ixodes persulcatus*, *Ixodidae*) и методы защиты людей. Зоол. журн. 2010; 89(1):115–21.

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

1. Vereta L.A. [Guidelines for prognostication of tick-borne encephalitis incidence]. M.: Nauka; 1975. 135 p.
2. Ierusalimsky A.P. [Tick-borne infections in early XXI century]. Nevrol. Zh. 2009; 3:16–21.
3. [Tick-Borne infections in the territory of Siberia]. Novosibirsk: the RAS Siberian Branch; 2011. 395 p.
4. Korenberg E.I. [Modern factors attributed to natural tick-borne encephalitis focalities: new ones or well-forgotten old]. Med. Parazit. 2008; 3:3–8.
5. Korenberg E.I. [Natural focalities of infections: current issues and perspective of investigation]. Zool. Zh. 2010; 89(1):5–18.
6. L'vov D.K., Zlobin V.I. [Strategy and tactics in prophylaxis of tick-borne encephalitis in modern times]. Vopr. Epidemiol. 2007; 5:26–30.
7. Naumov R.L., Gutova V.P., Fonareva K.S. [Coincidence rate as related to long-term extrapolational judgmental forecast and actual tick-borne encephalitis incidence in the USSR]. Med. Parazit. 1990; 5:40–3.
8. Nikitin A.Ya., Andae E.I., Chesnokova M.V., Balakhonov S.V. [Prophylaxis of the tick-borne encephalitis in the endemic territories of Siberian Federal District]. Dets. Delo. 2011; 2:60–5.
9. Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Andae E.I., Chesnokova M.V. [Tick-borne infections incidence among the population of Siberian and Far East Federal Districts in 2009–2010, and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:24–9.
10. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Pakschina N.D. [Tick-borne encephalitis management and prophylaxis measures in the territory of the Russian Federation]. Vopr. Epidemiol. 2007; 5:8–10.
11. Shashina N.I., Germant O.M. [Peculiar biological properties of taiga ticks (*Ixodes persulcatus*, *Ixodidae*) and methods of human protection]. Zool. Zh. 2010; 89(1):115–21.

Authors:

Noskov A.K., Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Chesnokova M.V., Andae E.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
Pakschina N.D. Federal Service on Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russia.

Об авторах:

Носков А.К., Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Чеснокова М.В., Андаев Е.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru
Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва

Поступила 21.02.12.

Л.П.Окунев, А.В.Мазепа, М.В.Чеснокова, Д.Б.Вержущий

ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ СИБИРСКОГО И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОКРУГОВ В 2011 г. И ПРОГНОЗ НА 2012 г.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,
Иркутск

В кратком виде представлены сведения о состоянии природных очагов туляремии и заболеваемости людей на территории Сибири и Дальнего Востока за 2011 г. и прогноз эпизоотической ситуации на 2012 г. В 2011 г. регистрировалась спорадическая заболеваемость туляремией в Новосибирской, Томской, Кемеровской, Омской областях, единичные случаи выявлены в Алтайском крае, Ханты-Мансийском АО и в Сахалинской области. Отмечено, что эпизоотии в регионе носили локальный характер, а обстановка по туляремии в целом была относительно благополучной, однако это не исключает обострения ситуации на отдельных территориях в 2012 г.

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

L.P.Okunev, A.V.Mazepa, M.V.Chesnokova, D.B.Verzhutsky

Epizootiological-and-Epidemiological Situation in Natural Tularemia Foci of the Siberian and Far Eastern Federal Districts in 2011, and Prognosis for 2012

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Presented is a piece of information about the situation in natural tularemia foci and human morbidity in the territory of Siberia and Far East in 2011. Outlined is the prognosis of epizootic situation for 2012. In 2011, sporadic morbidity was registered in the Novosibirsk, Tomsk, Kemerovo, and Omsk Regions. Isolated cases of the disease were identified in the Altai Territory, in the Khanty-Mansiisk autonomous district, and the Sakhalin Region. Specified is the fact that in 2011 epizooties were of a local scale, and the situation on tularemia on the whole was favorable. Nevertheless, the possibility of aggravation of the situation in some territories in 2012 is not ruled out completely.

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

Анализ ситуации по туляремии основывается на материалах, содержащих сведения об эпизоотическом состоянии и численности основных носителей и переносчиков в природных очагах туляремии, которые поступили в ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора с противочумных станций, управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ ЦГиЭ в субъектах Российской Федерации на территории Сибири и Дальнего Востока.

В 2011 г. эпизоотические проявления туляремии различной степени интенсивности выявлены на большей части территории Сибири и Дальнего Востока, как и в прошлом году, наиболее активные эпизоотии наблюдались на территории Западной Сибири. В регионе зарегистрировано 26 случаев туляремии (в 2009 г. – 25, в 2010 г. – 35), в том числе в Сибирском федеральном округе – 25 (Новосибирская, Томская, Кемеровская, Омская области, Алтайский край, Ханты-Мансийский АО) и один случай в Дальневосточном федеральном округе (Сахалинская область).

В Новосибирской области в пределах Присалаирской ландшафтной зоны продолжали развиваться интенсивные эпизоотии туляремии, наиболее остро проявившие себя в 2010 г. (8 культур и 400 серопозитивных проб из объектов окружающей среды, 22 слу-

чая заболевания людей). За 9 месяцев 2011 г. на фоне массовой гибели основного носителя – водяной полевки – зарегистрировано и лабораторно подтверждено 11 случаев заболевания людей, изолировано 4 культуры *Francisella tularensis* из воды открытых водоемов, получено 174 серопозитивных результата при исследовании органов грызунов, воды, погадок птиц, гнездового материала и кровососущих насекомых, собранных с территории 11 районов области.

В Томской области зарегистрировано шесть случаев заболевания людей туляремией среди жителей Томска (из них один – завозной из Казахстана). В то же время, как и в прошлом году, продолжается снижение эпизоотической активности природных очагов этой инфекции. В весенний период в РНГА получен положительный результат у четырех зверьков из 50 исследованных – 8,0 % (в 2010 г. – 24,0 %), в осенний период – 7,3 % (в 2010 г. – 14,0 %). При серологическом исследовании 160 иксодовых клещей, собранных в Томском районе, положительные находки выявлены в семи случаях (4,3 %), что превысило уровень 2010 г. (0,6 %) в 7,2 раза.

Зарегистрировано три случая заболевания людей в Кемеровской области. Из предполагаемого источника заражения в Междуреченске взяты на исследования пробы воды и выделена культура туляремийного микроба. Эпизоотическая активность установлена на

территории четырех из шести обследованных административных районов области. При серологическом исследовании объектов окружающей среды выявлены антиген туляремийного микроба в 5,6 % проб и антитела к нему в 14,1 % проб.

В Омской области зарегистрировано три случая заболевания туляремией. Проявления эпизоотической активности различной степени интенсивности отмечены на территории 12 районов области. Серопозитивные результаты определены в РНГА в 1,7 % проб от хищных млекопитающих, 4,5 % – насекомоядных и грызунов, 8,8 % – блох, 8,3 % – клещей, 34,8 % – слепней; в РНАт в 7,4 % проб от хищных и мелких млекопитающих, 17,1 % – погадок птиц.

Сохраняется эпизоотическая напряженность в природных очагах туляремии Алтайского края и Республики Алтай. В Алтайском крае (Крутихинский район) зарегистрирован один случай заболевания человека. При эпизоотологическом обследовании мест возможного инфицирования серологически выявлены положительные пробы от мелких млекопитающих. От клещей *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor reticulatus*, *D. silvarum*, *D. marginatus*, собранных в очагах предгорно-ручьевого и пойменно-болотного типов, изолировано 15 культур туляремии, еще две культуры выделены из органов мелких млекопитающих, отловленных в лесостепной зоне края. В Республике Алтай обследован 41 район – в 29 обнаружены эпизоотические проявления: 193 серопозитивные пробы (10,2 %) при исследовании объектов окружающей среды (мелкие млекопитающие, иксодовые клещи, подснежные гнезда грызунов, помет хищных млекопитающих, погадки птиц). Выделены 23 культуры туляремийного микроба в Майминском и Чойском районах Республики Алтай и Красногорском районе Алтайского края из органов мелких млекопитающих (7), от клещей (14), из проб воды (1) и ила (1).

Один случай заболевания человека зарегистрирован в Ханты-Мансийском АО. На территории округа проявления эпизоотии среди мелких млекопитающих отмечены в городах Ханты-Мансийск, Нижневартовск, Сургут, Нягень, а также в Нижневартовском, Нефтеюганском, Октябрьском районах – получено 25,0 % серопозитивных проб в РНГА.

Достаточно сложной оставалась эпизоотологическая ситуация на большей части Красноярского края. Получены положительные результаты (22,5 %) в разведениях от 1:10 до 1:320 при исследовании в РНАт полевого материала из Ачинского, Балахтинского, Каратузовского, Мишенского, Енисейского, Ужурского, Уярского, Шарыповского, Идринского, Туруханского районов и Красноярска, что свидетельствует о сохранении эпизоотической активности в природных очагах туляремии на этих территориях.

Эпизоотическая активность в республиках Тыва, Бурятия и Иркутской области, имела локальный характер. В Республике Тыва в четырех кожунах (Танджинском, Кызыльском, Каа-Хемском

и Чеди-Хольском) серопозитивные результаты от мелких млекопитающих составили 25,0 %, иксодовых клещей – 26,7 %, воды – 33,0 %, погадок птиц – 8,9 %, что значительно превысило показатели прошлого года, в то же время в отдельных урочищах наблюдалось затухание эпизоотического процесса. При обследовании шести районов Иркутской области положительные находки в РНГА получены в Заларинском районе от погадок птиц (5,6 %), в Эхирит-Булагатском районе от мелких млекопитающих (20,0 %), в Усть-Илимском районе от мелких млекопитающих и птиц (33,3 %). В органах мелких млекопитающих из Эхирит-Булагатского района обнаружена ДНК возбудителя туляремии. В Кабанском и Джидинском районах Республики Бурятия в РНАт получено 10,4 % серопозитивных результатов при исследовании погадок птиц и от 2 до 4,3 % – иксодовых клещей.

В Забайкальском крае проявления туляремии отмечены на территории Ононского и Читинского районов, где получены положительные результаты при серологическом исследовании крови мелких млекопитающих в РНГА, антитела к туляремийному антигену выявлены в 61 пробе (4,5 %).

В Дальневосточном федеральном округе возращение эпизоотической активности отмечено на территориях Хабаровского края, Амурской области. В Амурской области при серологическом исследовании 338 проб от мелких млекопитающих, хищных животных, субстратов гнезд грызунов, помета хищных животных, погадок птиц из четырех районов области положительные результаты получены в 8,6 % (2010 г. – 1,8 %) случаев. ДНК туляремийного микроба обнаружена в 1,5 % из 271 пробы. В 2011 г. в Хабаровском крае выделено 15 культур *F. tularensis* (2010 г. – 10). Зарегистрирована эпизоотия в районе Большого Хехцира (лесной очаг). Изолированы культуры возбудителя туляремии из воды (9), ила (3), от мелких млекопитающих (1). ДНК *F. tularensis* обнаружена в 16 (6,0 %) из 267 исследованных мелких млекопитающих и четырех из 50 (8,0 %) клещей *I. persulcatus*. В мае в пойменно-болотном очаге выявлена эпизоотия – выделено по одной культуре возбудителя туляремии от полевой мыши и воды, получены серопозитивные пробы от грызунов (6,6 %), ДНК возбудителя выявлена в 1 из 8 пулов иксодовых клещей. В луго-полевом очаге обнаружен туляремийный антиген в гнездах грызунов и погадках птиц (1,6 и 5,8 % соответственно), в Ванинском районе выявлена ДНК туляремийного микроба у мелких млекопитающих и иксодовых клещей (10,5 и 5 % соответственно).

В Приморском крае при серологическом исследовании мелких млекопитающих, отловленных в Партизанском районе и в окрестностях Находки, получено 14 (0,8 %) положительных результатов.

Как и в прошлые годы, следы прошедших эпизоотий обнаружены на территории Камчатского края, где специфические антитела определены в сыворот-

ках крови соболей (24,7 %) в шести районах края, в погадках птиц Усть-Камчатского района (12,7 %), в экскрементах лисиц (6,9 %) и гнездах грызунов (9,1 %) (Елизовский и Милюковский районы).

В Сахалинской области в 2011 г. туляремией заболел один человек. В южных районах области эпизоотической активности не установлено. Антитела к возбудителю туляремии обнаружены в Корсаковском районе у мелких млекопитающих (0,5 %), специфическая ДНК – у 5,2 % зверьков, отловленных в Аннинском, Корсаковском и Холмском районах; у семи исследованных клещей из Холмского района обнаружена ДНК туляремийного микроба.

Отрицательные результаты лабораторных исследований на территории Сибири и Дальнего Востока получены в Тюменской области, Ямало-Ненецком АО и Республике Саха (Якутия). Не проводили лабораторные исследования на туляремию в Республике Хакасия, Магаданской области, Еврейской автономной области и Чукотском АО.

Таким образом, в 2011 г. обстановка на энзоотических по туляремии территориях Сибири и Дальнего Востока была относительно спокойной, за исключением Новосибирской и Томской областей. В Новосибирской области зарегистрировано 11 случаев заболевания туляремией людей, в околотовных биотопах Присалаирской и Приобской ландшафтных зон продолжалась активная эпизоотия, сопровождающаяся выделением возбудителя туляремии и инфицированием объектов окружающей среды. В Томской области регистрация пяти случаев заражения людей при установленной низкой эпизоотической активности природных очагов туляремии свидетельствует о наличии не выявленного локального активного очага этой инфекции. Количество исследуемого на туляремию материала и, прежде всего, иксодовых клещей (160 экз.) явно недостаточно для получения объективной информации и определения необходимого объема профилактических мероприятий. Спорадические случаи заболевания людей в Омской, Томской, Кемеровской, Сахалинской областях, Алтайском крае, Ханты-Мансийском АО связаны с постоянно действующими очагами туляремии. Эпизоотии среди мелких млекопитающих были отмечены на территориях большинства субъектов Сибирского и Дальневосточного федеральных округов и имели преимущественно локальный характер. На территориях Тюменской области, Республики Саха (Якутия) и Ямало-Ненецком АО признаков эпизоотической активности не выявлено, что связано, по всей видимости, с недостатками в организации исследовательских работ. Наличие высоких показателей инфицированности объектов окружающей среды возбудителем туляремии в Новосибирской, Томской,

Кемеровской областях, Алтайском и Хабаровском краях, Республиках Алтай и Тыва требует дальнейшего мониторинга эпизоотологической и эпидемиологической ситуации на неблагополучных по туляремии территориях с привлечением дополнительных методов лабораторной диагностики и усилением профилактических мероприятий.

В 2012 г. в Новосибирской области, несмотря на существенное снижение численности водяной полевки, возбудитель туляремии продолжит циркулировать в популяциях других видов мелких млекопитающих, что будет способствовать сохранению сложной эпизоотологической и эпизоотологической обстановки в области. Ожидаются эпизоотии в очагах предгорно-ручьевого и пойменно-болотного типов Алтайского края, на отдельных участках природных очагов туляремии Республики Алтай и Кемеровской области. В Томской области, несмотря на снижение эпизоотической активности в обследованных природных биотопах, заболевания людей свидетельствуют о наличии узколокального активного очага этой инфекции, который может проявиться в весенне-летний период 2012 г. Повсеместно высокая численность клещей *D. nuttali* и прогнозируемое повышение численности носителей этой инфекции дают основание предполагать активизацию природных очагов туляремии на территории Республики Тыва.

Локальные эпизоотии туляремии возможны в природных биотопах Туруханского, Таймырского, Ачинского, Шарыповского, Каратузовского, Ужурского, и Уярского районов Красноярского края; в природных биотопах Амурской области; в лесных очагах Хабаровского края, где при инфицированности водоемов возможно заражение людей, а также в Милюковском, Соболевском и Усть-Большерецком районах Камчатского края. К ухудшению эпизоотической обстановки может привести прогнозируемое повышение численности мелких млекопитающих и членистоногих в Приморском крае. Возможна активизация природных очагов туляремии в пойменно-болотных биотопах Сахалинской области. Низкая эпизоотическая активность этой инфекции ожидается в природных биотопах Тюменской и Иркутской областей, Забайкальского края, Республик Бурятия и Саха (Якутия).

Authors:

Okunev L.P., Mazepa A.V., Chesnokova M.V., Verzhutsky D.B. 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., Чеснокова М.В., Вержуцкий Д.Б. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 27.01.12.

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

АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ СИБИРСКОЙ ЯЗВОЙ В 2011 г. И ПРОГНОЗ НА 2012 г.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Проведен анализ эпидемиологической ситуации по сибирской язве в Российской Федерации и в мире в 2011 г., который дает возможность прогнозировать сохранение заболеваемости людей на среднегодовом для последнего десятилетия уровне – от 1 до 22 случаев в субъектах федеральных округов юга России и Сибири.

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

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

Analysis of the Anthrax Morbidity Rate in the Russian Federation in 2011, and Prognosis for 2012

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Carried out is the analysis of epidemiological situation on anthrax in 2011, both in the Russian Federation and around the world. The results of the analysis bear evidence of the fact that in the constituent units of the federal districts of Southern Russia and Siberia anthrax morbidity in humans will be retained at the annual average level (characteristic of the recent decade) – ranging from 1 to 20 cases of the disease.

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

Заболевания людей и животных сибирской язвой регистрировались в 2011 г. во многих странах мира. В Российской Федерации зарегистрировано 4 случая заболевания людей без летальных исходов и отмечено значительное снижение заболеваемости по сравнению с 2010 г., когда количество заболевших достигло 22, а один больной умер. Все случаи заболевания в 2011 г. пришлось на субъекты Южного Федерального округа (Краснодарский край – 2, Волгоградская область – 2).

В третьей декаде апреля, что является редкостью для начала эпидемического сезона, две сотрудницы пищеблока МУЗ «Городская больница Армавира» в результате контакта с мясом заболели сибирской язвой и были госпитализированы в ГУЗ «Специализированная инфекционная больница» Краснодара с диагнозом «Сибирская язва, кожная форма, средняя степень тяжести». Диагноз был поставлен на основании эпидемиологического анамнеза, характерной клинической картины и результатов лабораторных исследований: обнаружение ДНК *Bacillus anthracis* в содержимом карбункулов и смывах с язв методом ПЦР, выявление в сыворотках крови больных противосибирезвенных антител в диагностических титрах непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА), получение положительных результатов аллергической пробы с сибирезвенным аллергеном антраксина *in vitro*.

Проведенное эпидемиологическое расследование и исследование проб мяса, почвы, комбикормов, смывов с объектов окружающей среды не привели к выявлению источника инфекции.

Вторая вспышка сибирской язвы зарегистрирована на хуторе Семичном Котельниковского района

Волгоградской области в сентябре 2011 г. Причиной заболевания двух жителей послужило проведение вынужденного убоя барана. Заболевшие были госпитализированы в ГУЗ «Волгоградская областная клиническая инфекционная больница». Окончательный диагноз – «Сибирская язва, кожная форма, легкая степень тяжести» – был установлен на основании эпидемиологического анамнеза, соответствующей клинической картины и результатов лабораторных исследований: выделения культуры вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы из содержимого патологического кожного очага одного из больных, обнаружения ДНК *B. anthracis* в содержимом карбункулов методом ПЦР, выявления в сыворотках крови больных противосибирезвенных антител в диагностических титрах в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). В 2011 г. также зафиксированы случаи сибирской язвы в Республике Калмыкия (КРС, лошади), Тульской (КРС) и Белгородской областях (свины), не повлекшие за собой заболеваний людей.

В 2011 г. групповые случаи заболевания людей сибирской язвой, обусловленные контактом с заболевшими сельскохозяйственными животными, регистрировались в ряде граничащих с Российской Федерацией стран: Грузии – 33 случая (1 летальный исход), Республике Таджикистан – 14, Кыргызской Республике – 13, Республике Казахстан – 5, Китае – 4. В Республике Казахстан имела место крупная эпизоотия среди КРС, МРС и лошадей.

Эпизоотии сибирской язвы среди сельскохозяйственных и диких животных регистрировались в странах Азии (Бангладеш – КРС; Вьетнам – КРС; Индия – КРС, слон; Индонезия – КРС; Иран – МРС, олени), Африки (Гвинея-Бисау – КРС; Замбия, Зимбабве – ди-

кие животные; Конго – КРС; Судан – КРС), Европы (Италия – КРС, МРС, лошади; Румыния – КРС; Сербия, Хорватия, Швеция – КРС), Северной (Канада – КРС) и Южной Америки (Аргентина, Колумбия – КРС; Перу – МРС), некоторые из них стали причиной масштабных вспышек среди людей.

Так, в Замбии с подозрением на сибирскую язву госпитализировано 230 местных жителей, которые имели контакт с тушами и употребляли мясо гиппопотамов, погибших в процессе крупной эпизоотии сибирской язвы (более 100 особей), наряду с прочими видами животных (слонами, львами, павианами, буйволами и др.). В результате контакта с заболевшим скотом и употреблением в пищу инфицированного мяса в Бангладеш сибирской язвой заболели 119 человек, в Судане – 100, Вьетнаме – 53 (1 – летальный), Индии – 33, Индонезии – 11. В Гвинее-Бисау заболели и погибли от сибирской язвы 4 человека. Сибирская язва стала предполагаемой причиной летального исхода одного случая заболевания в Румынии.

Заслуживает внимания случай заболевания, зафиксированный в США. Летом 2011 г. 61-летний житель штата Флорида совершал путешествие, маршрут которого проходил через штаты Монтана, Вайоминг и Дакота, и в конце третьей недели тура в связи с внезапным и прогрессирующим ухудшением самочувствия был доставлен самолетом медицинской службы в ближайший медицинский центр штата Миннесота с симптомами пневмонии. Тяжелое состояние пациента, обусловленное респираторным дистресс-синдромом и выраженной гипоксией (данные рентгенографического исследования легких), а также отсутствие положительной динамики заболевания в ответ на проводимое лечение встревожили лечащего врача и послужили основанием для проведения дополнительных лабораторных исследований, результатом которых явилось выделение из клинического материала больного штамма возбудителя сибирской язвы. На основании результатов клинико-лабораторных исследований мужчине был поставлен диагноз «Сибирская язва, легочная форма, тяжелое течение», в критическом состоянии он был переведен в отделение реанимации окружного медицинского центра, где в течение трех недель проводилось интенсивное лечение, включающее антибиотикотерапию по схеме, рекомендованной CDC при легочной форме сибирской язвы (в течение 60 дней): введение человеческого сибирезывенного иммуноглобулина, искусственная вентиляция легких, дренирование плевральной полости с аспирацией плевральной жидкости. Несмотря на крайне тяжелое течение заболевания, прогностически неблагоприятной легочной формой сибирской язвы, которая в подавляющем большинстве случаев заканчивается летально, возраст больного, ранняя диагностика и своевременно начатая адекватная интенсивная терапия позволили спасти ему жизнь. Проведенное эпидемиологическое расследование случая заболевания не установило источник инфекции. Департамент здравоохранения Миннесоты вынес предположение, что заболевание произошло в

результате контакта с почвой, содержащей споры возбудителя сибирской язвы, во время путешествия. ФБР исключило возможность связи этого случая с актом биотерроризма, как предполагалось изначально.

Таким образом, причиной заболевания людей сибирской язвой в 2011 г. в подавляющем большинстве случаев традиционно являлся контакт с заболевшими животными в процессе ухода, вынужденного убоя, разделки туш. Здесь уместно подчеркнуть, что достаточно часто источник инфекции для людей остается не установленным. Это касается не только описанного случая ингаляционной сибирской язвы в США, но и более очевидных ситуаций в Российской Федерации, когда при наличии кожной формы инфекции, явного контакта с больными животными или их мясом обнаружить и исследовать подозрительный материал не удается. Одной из причин может быть невозможность проведения полноценного эпидемиологического расследования из-за фактов скрывания случаев заболевания сибирской язвой людей или их связи с заболеваниями животных.

В Российской Федерации в 2011 г. количество случаев заболевания не превышало среднегодовые показатели за последнее десятилетие, а по сравнению с 2010 г., когда одной из причин, способствующих увеличению заболеваемости животных, послужило аномально засушливое лето, значительно снизилось. Ситуация по сибирской язве в ряде граничащих с Российской Федерацией государств и некоторых стран Азии и Африки продолжала оставаться неблагоприятной.

Опыт многолетнего анализа заболеваемости сибирской язвой дает возможность прогнозировать сохранение заболеваемости людей на среднегодовом для последнего десятилетия уровне – от 1 до 22 случаев в субъектах федеральных округов юга России и Сибири. Нет оснований рассчитывать на значительное улучшение эпизоотолого-эпидемической ситуации по сибирской язве в вышеупомянутых странах ближнего и дальнего зарубежья, так как остается угроза завоза инфицированных животных, сырья и продуктов животноводства, контаминированных спорами возбудителя сибирской язвы на территорию РФ. Несмотря на то, что в 2011 г. инъекционной формы сибирской язвы среди героиновых наркоманов не зарегистрировано, не исключена возможность возобновления оборота (циркуляции) контаминированных наркотических средств и заражения наркозависимых лиц.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 15.02.12.

В.М.Дубянский, О.В.Малецкая**МЕТОДИКА ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ВНУТРЕННИХ И ВНЕШНИХ УГРОЗ
В СУБЪЕКТЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ***ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь*

Предложена методика оценки внешних и внутренних угроз биологической безопасности субъекта Российской Федерации, позволяющая интегрировать весь актуальный поток медицинской и географической информации и стратифицировать территорию в зависимости от величины биологической угрозы.

Ключевые слова: биологические угрозы, эпизоотия, ГИС, методика оценки.

V.M.Dubyansky, O.V.Maletskaya**Method of Biohazard Evaluation Regarding Internal and External Threats
at the Level of Constituent Entity of the Russian Federation***Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

Put forward is the method of evaluation of external and internal biosafety hazards at the level of constituent entity of the Russian Federation. It makes integration of the whole mass of medical and geographical information possible, and helps to stratify the territory depending upon the biohazard degree.

Key words: biological hazards, epizooty, GIS, method of evaluation.

Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия территории Российской Федерации диктует необходимость учета всех существующих и возможных внешних и внутренних угроз – факторов риска биологической безопасности регионов.

В данной статье мы рассматриваем биологические угрозы, ответственные за внезапное обострение эпидемиологической обстановки. К таким угрозам относятся вариабельность биологических характеристик известных и появление новых возбудителей болезней, экстремальные события природного генеза, техногенные катастрофы, а также негативные явления в социальной сфере (межэтнические и военные конфликты), глобализация мировых экономических процессов, низкий уровень санитарно-гигиенических условий жизни населения.

Анализ доступных литературных сведений показал, что в настоящее время не существует единой методики оценки биологической опасности внутренних и внешних угроз с возможностью отражения этой оценки в геоинформационных системах (ГИС). Изучены алгоритмы оценки эпидемической угрозы при чуме и прогнозирования эпизоотической активности очагов чумы как примеры, в которых риски заражения человека и возможность возникновения эпизоотии имеют количественную оценку [3–5]. Частично используя эти алгоритмы, мы разработали методику оценки биологической опасности внутренних и внешних угроз в субъекте Российской Федерации, которая учитывает их разнообразие и нечеткую структурированность исходной информации.

Разрабатывая алгоритм оценки эпидемических рисков, мы исходили из положения, что расчеты и результаты оценки внутренних и внешних угроз в субъекте Российской Федерации будут производиться с использованием платформы ArcInfo не ниже версии 9.1.

Предлагается проводить оценку угроз по формализованной пространственно-временной шкале. За единицу пространственной шкалы принимается сектор первичного района, кодированный в соответствии с принципами паспортизации природных очагов чумы. Такое формальное деление территории дает возможность оценить, стратифицировать и прогнозировать, основываясь на постоянной географической привязке единицы пространственной шкалы. Принятый масштаб достаточен для визуализации полученных результатов в ГИС. Это выгодно отличает предлагаемый подход от широко используемого в эпидемиологии административного деления территории, так как административные единицы субъекта Российской Федерации не стабильны в пространственно-временном измерении. Вместе с тем, оценка угроз в административно-территориальных единицах субъекта Российской Федерации сохранится для обобщения информации или для тех случаев, когда ее использование является предпочтительным, что также включают возможности ArcInfo.

В качестве основы оценки биологической опасности различных факторов предлагается использовать матрицу, формирующуюся на основе стандартного потока медицинской информации. Условная шкала имеет диапазон 0–4 для удобства двоичного (0, 1) и

квартильного (1–4) исчисления веса предикторов. Для каждого сектора первичного района строится своя матрица (таблица), позволяющая рассчитать текущую биологическую опасность и отразить результат на карте субъекта Российской Федерации в ГИС ArcView.

Важным свойством предлагаемой матрицы является ее гибкая структура, способная использовать неопределенно большое количество предикторов, каждый из которых оценивается по конечному количеству параметров. Такой подход позволяет проводить оценку угроз с использованием той информации, которая доступна на момент проведения оценки. В таблице приводятся предикторы для таких видов внутренних и внешних угроз, как инфекционная заболеваемость, гидрологические природные явления, миграционные процессы, международное и внутреннее сообщение. Однако матрицу можно увеличить или уменьшить в зависимости от количества видов угроз и доступных предикторов.

В зависимости от целей исследования, ранжирование территории по степени биологической угрозы может быть направленным, т.е. возможно отбирать предикторы только для внешних или только для внутренних угроз и ранжировать территорию, например, по угрозе возникновения конкретной инфекции.

Итоговая оценка предикторов рассчитывается по формуле:

$$I = \sum p \cdot O,$$

где I – итоговая оценка предикторов, $\sum p$ – сумма оценок предиктора по колонке балльности, O – значение колонки балльности.

Итоговая информативность сектора рассчитывается по формуле:

$$P = \sum I / \sum K,$$

где $\sum I$ – сумма итоговых оценок предикторов по колонкам, $\sum K$ – количество всех предикторов в матрице.

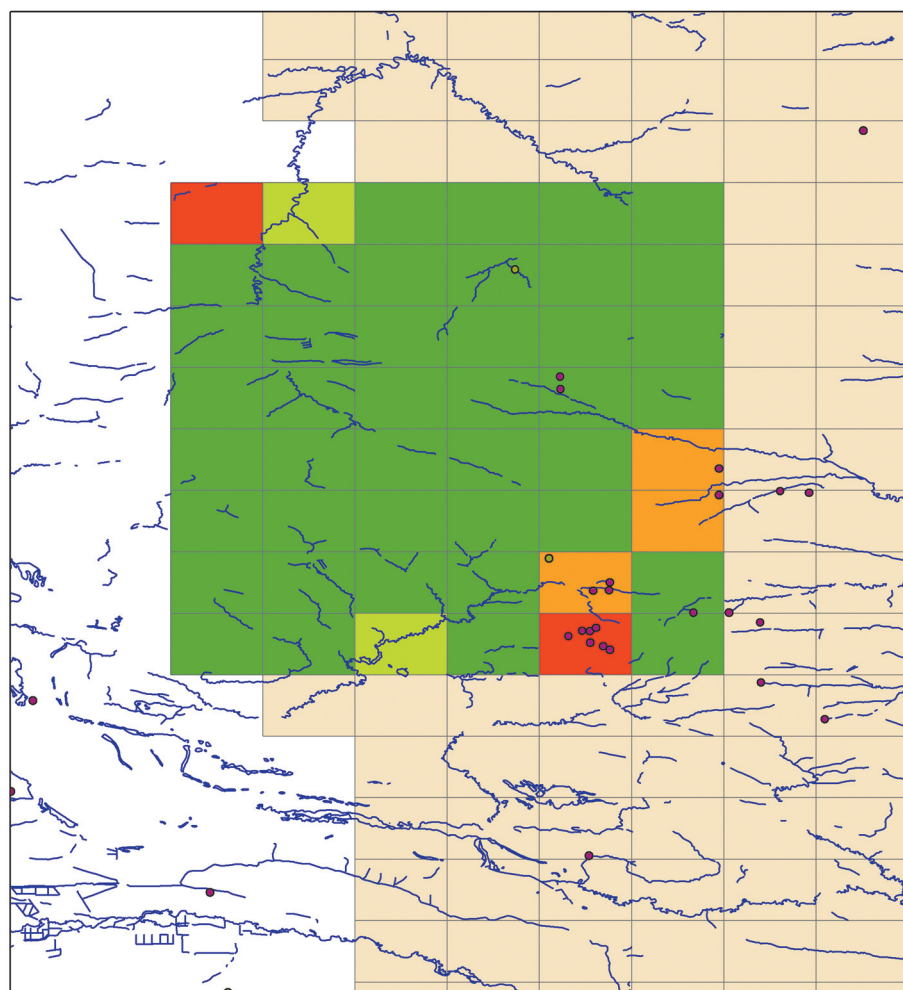
Затем вычисленные по формуле информативности для всех секторов сводятся в общий ряд и ранжируются по квартилям. Степень угрозы определяется квартилем, в который попадает значение информативности для сектора: до 1 – отсутствует или низкая; от 1 до 2 – средняя; от 2 до 3 – высокая; выше 3-го – очень высокая.

К таблице атрибутов слоя «Сектора первичных районов», разработанного для ГИС, присоединяется в виде библиотеки электронная таблица, состоящая из двух колонок: «Код сектора первичного района» и «Информативность». Градиенты заливки каждого сектора группируются в соответствии с квартилем, конечная картина выдается в виде цветной пространственной шкалы угроз: от уровня «зеленого» – низкая или отсутствует до «красного» – угроза очень высокая (рисунок).

Матрица для расчета биологической опасности сектора первичного района

Предиктор	Оценка				
	1	2	3	4	Итоги
Группа возбудителя болезни					1
Сектор входит в очаг да/нет	1				
Эпизоотия есть/нет	1				
Основной носитель вовлечен/нет	1				
Другие носители вовлечены/нет	0				
Численность основного носителя	1				
Численность второстепенных носителей		1			
Численность основного переносчика			1		
Численность второстепенного переносчика			1		
Миграционная активность блох	1				
Наличие постоянного населения	0				
Наличие временного населения	0				
Численность грызунов в населенных пунктах		0			
Численность блох <i>Pulex irritans</i> в населенных пунктах	0				
Численность блох в населенных пунктах	0		0		
Контакт человека с блохами в поле	0				
Охота на носителей опасных инфекционных болезней	1				
Наличие стогов	1				
Численность мышевидных грызунов			1		
Наличие колодцев или каптажей	0				
Крупные хозяйства КРС	0				
Крупные хозяйства МРС	0				
Крупные хозяйства смешанного рогатого скота	0				
Мелкие и частные хозяйства КРС	0				
Мелкие и частные хозяйства МРС	0				
Мелкие и частные хозяйства рогатого скота	0				
Наличие анофелогенных водоемов	0				
Наличие водоемов с вероятностью наводнений	1				
Наличие сибиреязвенных захоронений	1				
Наличие аэропорта	0				
Наличие международного аэропорта	0				
Наличие ж/д вокзала	0				
Наличие автовокзала	0				
Наличие насыпей путепроводов, дорог и пр.	0				
Проводятся ли в секторе земляные работы	0				
Проводятся ли в секторе сельскохозяйственные работы	1				
Сумма оценок предикторов	9	6	9	0	($\sum I$) = 24
Итоговая информативность сектора $P = \sum I / \sum K$					0,685714

Примечание. Заштрихованы ячейки, не предполагающие использования четырехбалльной шкалы для оценки.



Пример ранжирования территории субъекта РФ по степени потенциальной биологической опасности:

- Гидрография (линии)
- Гидротехнические объекты (точки)
- Населенные пункты (точки)
- Гидрография (линии)

Оценка биологической опасности сектора:

- Слабая или отсутствует
- Средняя
- Высокая
- Очень высокая

В качестве примера опишем группы предикторов, использованных для тестовой проверки пространственной оценки биологических угроз. Некоторые предикторы являются взаимосвязанными, т.е. наличие одного из них автоматически подразумевает наличие связанных.

Рассмотрим группу предикторов, оцениваемых по двоичной системе «Да = 1» и «Нет = 0». Результаты их оценки вносятся в колонку 1 таблицы.

Предиктор «Сектор входит в очаговую территорию»: ставится «1», если сектор входит в очаговую территорию, «0» – вне очаговой территории. «Наличие постоянного населения»: ставится «1», если постоянное население зафиксировано, «0» – отсутствует. Данный предиктор связан с предикторами «Наличие аэропорта», «Наличие международного аэропорта», «Наличие ж/д вокзала», «Наличие автовокзала». «Эпизоотия есть/нет»: «1» – при обнаружении эпизоотии на момент составления матрицы, «0» – не обнаружена. «Основной носитель вовлечен/нет», «Другие носители вовлечены/нет»: «1» – при вовлечении носителей в эпизоотию на момент составления матрицы, «0» – носители не вовлечены в эпизоотию. Эти предикторы связаны с предиктором «Наличие эпизоотии». «Возможность контакта человека с блохами в поле»: «1» – контакт возможен, «0» – невозможен. Предиктор имеет связь

с предиктором «Миграционная активность блох». «Наличие стогов»: «1» – наличие стогов установлено, «0» – стога отсутствуют. Связан с предиктором «Проводятся ли в секторе сельскохозяйственные работы».

Все связанные предикторы данной группы оцениваются аналогично.

Следующая группа – предикторы, оцениваемые по четырехбалльной шкале. Результаты оценки вносятся в колонки 1–4 таблицы.

Предиктор «Группа возбудителей болезней» классифицирует возбудителей инфекционных болезней. Оценка опасности выставляется в соответствии с правилами ВОЗ, т.е. наиболее опасные возбудители оцениваются наивысшим баллом. Таким образом, при чуме знак «1» ставится в колонку балльности «4».

Предикторы, относящиеся к численности носителей и переносчиков («Численность основного носителя», «Численность основного переносчика» и т.д.), оцениваются по четырехбалльной шкале на основе квартильного анализа. Значения численности, входящие в интервал от нуля до первого квартиля включительно, отмечаются в колонке «1»; от первого до второго квартиля включительно – в колонке «2»; от второго до третьего квартиля включительно – в колонке «3»; выше третьего – в колонке «4».

В качестве предикторов можно использовать стандартные коэффициенты, используемые для оценки эпизоотического и эпидемического потенциалов природных очагов чумы. В первую очередь, имеются в виду эпидемический потенциал энзоотичной территории и индекс эпизоотичности. Рассчитанные индексы ранжируются и делятся на квартили. Эти предикторы также относятся к группе оцениваемых по четырехбалльной шкале.

Характеристику отдельных предикторов можно получить из паспортной информации сектора первичного района, или непосредственно из пополняемой информации ГИС. Для этого на сетку первичных районов последовательно накладываются значимые слои ГИС для заполнения матрицы угроз. В матрице отмечается наличие или отсутствие угроз в строке соответствующего предиктора (наличие родников, наличие рек с возможностью паводков и пр.), если они попадают в пределы требуемого сектора первичного района.

Для камерального заполнения матрицы угроз весьма важным источником информации является использование методов дистанционного зондирования земной поверхности. В отличие от редко обновляемых географических карт, космические снимки земной поверхности позволяют получать актуальную географическую информацию и отслеживать вновь происходящие изменения в секторе.

Предложенная методика количественной оценки биологической опасности внутренних и внешних угроз в субъекте Российской Федерации позволяет стратифицировать территорию с учетом всей имеющейся информации. Безусловно, она носит предварительный характер. В перспективе предполагается ее развитие, в частности переход на расчет информативности в виде информационной формулы Кульбака [2, 3].

Работа выполнена по государственному контракту № 64-Д/2 от 25.08.2010 в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, Ленинградское отделение; 1978. 296 с.
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина, Ленинградское отделение; 1973. 141 с.
3. Дубянский М.А., Кенжебаев А., Степанов В.М., Асенов Г.А., Дубянская Л.Д. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приаралье и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан; 1992. 240 с.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 191 с.
5. Ривкус Ю.З., Наумов А.В., Хотько Н.И., Гельдыев А. Эпидемиология и профилактика чумы. Ашгабад: Магарыф; 1992. 239 с.

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

1. Gubler E.V. [Computational Methods for Analysis and Identification of Pathological Processes]. L.: Meditsina; Leningrad. Dep; 1978. 296 p.
2. Gubler E.V., Genkin A.A. [Application of Statistical Non-Parametric Criteria in Medico-Biological Investigations]. L.: Meditsina, Leningrad. Dep.; 1973. 141 p.
3. Dubyansky M.A., Kenzhebaev A., Stepanov V.M., Asenov G.A., Dubyanskaya L.D. [Prognostication of Plague Epizootic Activity in Sub-Aral and Kyzyl Kum Areas]. Nukus: Qorlqalpogiston; 1992. 240 p.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.; 2004. 191 p.
5. Rivkus Yu.Z., Naumov A.V., Khot'ko N.I., Gel'dyev A. [Plague Epidemiology and Prophylaxis]. Ashghabat: Magaryf; 1992. 239 p.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 22.12.11.

Н.А.Кол¹, А.Ф.Чульдун¹, М.Г.Ростовцев², Ю.А.Калущ¹**ЛИНЕЙНЫЕ РЕГРЕССИОННЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ОПИСАНИЯ
МНОГОЛЕТНЕГО ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
(КАРГИНСКИЙ УЧАСТОК ТУВИНСКОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ)**¹Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов СО РАН, Кызыл;²ФГУЗ «Тувинская противочумная станция» Роспотребнадзора, Кызыл

Результаты моделирования показали выраженную зависимость активности эпизоотий в Тувинском природном очаге чумы от климатических условий (среднемесячного количества осадков за текущий и предыдущие четыре года, температуры за текущий и предыдущие три года). Полученные множественные линейные регрессионные модели позволяют прогнозировать активность течения зооноза на 1 год. Самыми близкими к природному процессу зооноза оказались модели, полученные методом пошаговой регрессии. Наиболее значимыми для активности эпизоотий являются количество осадков в зимние месяцы и температура теплого времени года – весны и лета.

Ключевые слова: природный очаг чумы, линейная регрессионная модель эпизоотий чумы, зависимость активности эпизоотий от климатических факторов.

N.A.Kol¹, A.F.Chul'dum¹, M.G.Rostovtsev², Yu.A.Kalush¹**Linear Regression Models Used for the Description of Long-Term Epizootic Process
in Tuvian Natural Plague Focus (Karginsk Mezofocus)**¹Tuvian Institute for Complex Exploration of Natural Resources, SB of the RAS, Kyzyl;²Tuvian Plague Control Station, Kyzyl

The results of modeling showed the dependence of epizootic activity in Tuvian natural plague focus on climatic conditions (average monthly amount of precipitations in the current year and the preceding four years and temperatures in the current and the preceding three years). The multiple linear regression models were used to predict the activity of zoonosis development within a year. The models obtained by means of stepwise regression were most approximated to the natural zoonotic process. The amount of precipitations in winter months and temperature in spring and summer were of the greatest significance for epizootic activity.

Key words: natural plague focus, linear regression models of plague epizootics, dependence of epizootic activity on climatic factors.

Тувинский природный очаг чумы (ТПОЧ) характеризуется практически ежегодными эпизоотиями и имеет индекс эпизоотичности¹ равный 0,9 [9]. В связи с опасностью для населения, которую представляют данные эпизоотии, для Тувы остается актуальной проблема прогнозирования активности очага.

Для эффективного прогнозирования эпизоотического процесса требуется создать адекватную этому природному процессу математическую модель. По определению математическая модель – это «приближенное описание какого-либо класса явлений внешнего мира, выраженное с помощью математической символики. Математическое моделирование – мощный метод познания внешнего мира, а также прогнозирования и управления. Анализ математической модели позволяет проникнуть в сущность изучаемых явлений» [11].

Подходы к созданию модели зооноза с известной долей условности и приближения можно разделить на пространственные и временные. И в том, и в другом случае исследуются изменения эпизоотий чумы во времени, только при пространственном подходе изучается динамика эпизоотий чумы во времени и пространстве.

Пространственный подход был применен авто-

рами при исследовании динамики эпизоотий внутри Каргинского участка Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ в работе [6]. В свою очередь, временными прогнозами эпизоотий и эпидемий занимались многие исследователи. В работе [8] показана связь эпизоотий чумы с атмосферной циркуляцией и активностью Солнца. Другими климатическими показателями, влияние которых на активность очагов чумы доказана, могут быть увлажненность предшествующего летнего периода [10], ветровой режим [2]. В работе [3] приводятся модели краткосрочных и долгосрочных прогнозов, основанных на анализе большого количества биотических и абиотических факторов [5]. Ранее авторами была разработана модель хода сезонного эпизоотического процесса [7], которая позволяет предсказать средний уровень результативности по поиску чумы в ТПОЧ на каждый календарный день периода обследования.

В данной работе исследуется временной ряд суммы количества культур чумы, собранных за год, далее – временной ряд активности эпизоотий чумы в Каргинском участке Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ за период с 1966 по 2000 год.

Для описания временного ряда активности мезоочага были рассмотрены линейные множественные регрессионные модели с дополнительными факторами – среднемесячными температурой и количеством осадков.

¹Индекс эпизоотичности – отношение числа лет, в течение которых на данной территории регистрировали эпизоотию, к общему числу лет наблюдения.

Материалы и методы

Материалами для исследования эпизоотий послужили суммарные ежегодные значения количества выявленных культур чумы из базы данных (БД) «Культуры чумы в Каргинском участке Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ». БД была составлена на основе работ Тувинской противочумной станции. Материалы по климатическим условиям были представлены среднемесячным количеством осадков с 1962 по 2000 год в миллиметрах и значением среднемесячных температур с 1963 по 2000 год в градусах Цельсия, зафиксированных в пос. Мугур-Аксы сотрудниками метеорологической службы. Исследование было ограничено 2000 годом, так как в наличии у нас имеются климатические данные только до этого года.

При построении регрессионной модели использовались метод «к» лучших признаков [4] и метод пошаговой регрессии (stepwise regression).

Метод «к» лучших признаков. В основе этого метода лежит предположение о статистической независимости анализируемых признаков [4]. Имеется в виду корреляция между собой 108 параметров: 60 параметров среднемесячного количества осадков (12 ежемесячных параметров за 5 лет) и 48 среднемесячной температуры (12 ежемесячных параметров за 4 года). Если в качестве критерия эффективности линейной диагностической модели используется коэффициент детерминации R^2 , то мерой информативности отдельно взятого признака может служить его коэффициент корреляции с критериальным показателем $r(x_i, z)$ (активностью эпизоотий чумы). Исходное множество признаков $x_1, \dots, x_p$ упорядочивается по модулю коэффициента корреляции:

$$|r(x_{i_1}, z)| \geq |r(x_{i_2}, z)| \geq \dots \geq |r(x_{i_p}, z)|.$$

Из построенного ряда отбирается «к» первых, наиболее ценных признаков.

Чем строже соблюдается условие независимости отбираемых признаков, тем лучше получается конечный результат [4].

Следует также пояснить, что для построения регрессионной модели активности очага методом пошаговой регрессии была использована функция STEPWISE программного продукта MATLAB.

Процедура построения регрессионной модели. Решение практических задач восстановления регрессионной зависимости требует рассмотрения большого числа порождаемых признаков. Процедура построения регрессионных моделей состоит из двух шагов. На первом шаге, на основе свободных переменных – результатов измерений, порождается набор признаков. На втором шаге производится выбор признаков. При выборе признаков выполняется настройка параметров модели, оценивается ее качество. Модель с настроенными параметрами, доставляющая минимум заданному функционалу качества, – в данном

случае наименьшее значение выражения $(1-R^2)$, где R^2 – значение коэффициента детерминации, называется моделью оптимальной структуры [1].

Результаты и обсуждение

Модели на основе метода «к» лучших признаков. В результате применения метода «к» лучших признаков при анализе качества получаемых моделей были отобраны две модели (первая и вторая).

Первая модель включает 7 параметров, в число которых входят данные о среднемесячной температуре и количестве среднемесячных осадков как предыдущих лет, так и текущего года:

$$Y(t) = 1,17 \cdot O_2^{t-4} + 1,92 \cdot O_{12}^{t-2} + 0,2 \cdot O_4^{t-1} - 2,46 \cdot T_6^{t-3} + 3,25 \cdot T_7^{t-2} + 1,67 \cdot T_4^{t-1} + 0,21 \cdot T_2^t - 72,37,$$

где $Y(t)$ – активность эпизоотий чумы (ежегодное количество найденных культур чумы), O – среднемесячное количество осадков, T – среднемесячная температура, нижний индекс показывает номер месяца в году, в верхнем индексе t – номер года в котором выделены культуры чумы. Например, T_4^{t-1} – среднемесячная температура за апрель года, который является предыдущим по отношению к году, в котором выделены культуры чумы.

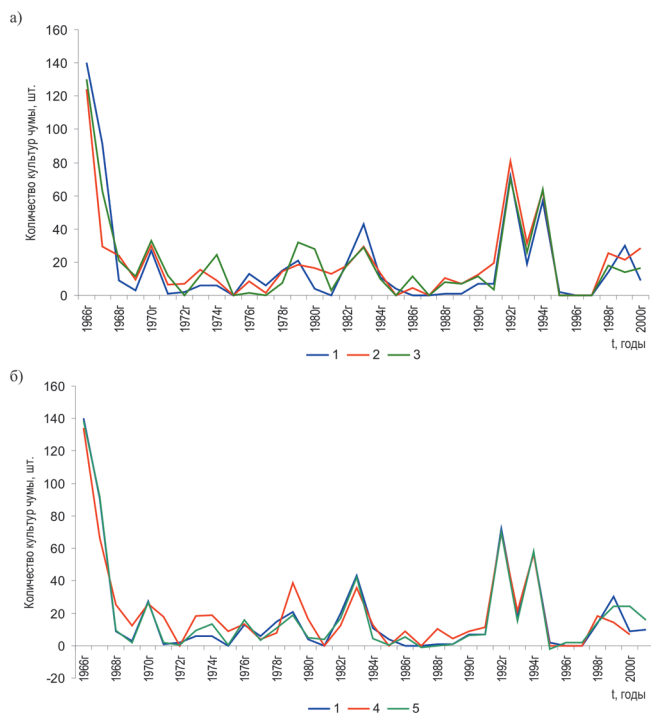
Вторая модель включает 14 параметров, которые основываются на данных о среднемесячной температуре и количестве среднемесячных осадков только предыдущих лет:

$$Y(t) = 1,28 \cdot O_{12}^{t-4} + 1,9 \cdot O_{12}^{t-2} + 0,07 \cdot O_7^{t-1} - 0,13 \cdot O_{10}^{t-1} + 2,24 \cdot O_2^{t-1} + 1,58 \cdot O_1^{t-1} + 0,31 \cdot O_4^{t-2} - 0,07 \cdot O_6^{t-2} + 0,06 \cdot O_9^{t-3} - 2,45 \cdot T_4^{t-3} + 3,48 \cdot T_6^{t-2} + 1,92 \cdot T_7^{t-1} - 1,57 \cdot T_2^{t-1} - 0,08 \cdot T_{12}^{t-2} - 115,38.$$

На рисунке (а) приведены графики суммарной годичной активности эпизоотий чумы в Каргинском участке Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ. При практическом использовании отрицательные значения получаемых модельных функций, как не имеющие физического смысла, заменяются нулевыми.

Коэффициент детерминации наблюдаемого ряда и первой модели $R^2 = 0,77$, второй модели – 0,86. Статистический смысл коэффициента детерминации заключается в том, что он показывает, какая доля зависимой переменной объясняется построенной функцией регрессии. В нашем случае, при коэффициентах детерминации 0,77 и 0,86 регрессионные модели объясняют 77 и 86 % дисперсии критериального показателя соответственно, остальные же 23 и 14 % считаются обусловленными факторами, не отраженными в модели.

Модели с применением метода пошаговой ре-



Графики суммарной годичной активности эпизоотий чумы в Каргинском участке Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ:

а) 1 – наблюдаемое количество культур чумы, 2 – первая модель, 3 – вторая модель; б) 1 – наблюдаемое количество культур чумы, 4 – третья модель, 5 – четвертая модель

грессии (модели stepwise regression). Среди методов отбора признаков широкое распространение получил пошаговый метод, впервые предложенный в 1960 г. Эфромсоном. На каждом шаге признаки проверяются на возможность добавления признаков в модель или удаления из модели, основываясь на F -статистике.

Цель шаговой регрессии состоит в отборе из большого количества предикатов небольшой подгруппы переменных, которые вносят наибольший вклад в вариацию зависимой переменной.

В результате применения метода stepwise regression (по-шаговая регрессия) при анализе качества получаемых моделей нами были отобраны две модели (третья и четвертая).

Третья модель включает 7 параметров, в число которых входят данные о среднемесячной температуре и количестве среднемесячных осадков как предыдущих лет, так и текущего года:

$$Y(t) = 2,49 \cdot O_2^{t-1} + 1,83 \cdot O_{12}^{t-2} + 1,42 \cdot O_{12}^{t-4} - 4,47 \cdot T_4^t - 5,21 \cdot T_6^{t-1} - 3,32 \cdot T_7^{t-1} - 3,46 \cdot T_4^{t-3} - 40,76,$$

где $Y(t)$ – активность эпизоотий чумы (ежегодное количество найденных культур чумы), O – среднемесячное количество осадков, T – среднемесячная температура, нижний индекс показывает номер месяца в году, в верхнем индексе t – номер текущего года. Например, O_2^{t-1} – среднемесячное количество осадков за февраль года, который является предыдущим по отношению к году, в котором выделены культуры чумы.

Четвертая модель включает 14 параметров, которые основываются на данных о среднемесячной температуре и количестве среднемесячных осадков только предыдущих лет:

$$Y(t) = 2,21 \cdot O_1^{t-1} + 1,94 \cdot O_2^{t-1} + 1,05 \cdot O_4^{t-1} - 0,99 \cdot O_5^{t-1} - 0,12 \cdot O_6^{t-2} + 1,85 \cdot O_{12}^{t-2} + 1,67 \cdot O_4^{t-3} + 1,46 \cdot O_2^{t-4} + 1,64 \cdot O_{12}^{t-4} + 1,07 \cdot T_2^{t-2} + 1,7 \cdot T_3^{t-2} - 2,04 \cdot T_2^{t-3} - 2,5 \cdot T_4^{t-3} + 4,51 \cdot T_6^{t-3} - 82,12.$$

На рисунке (б) приведены графики суммарной годичной активности эпизоотий чумы в Каргинском участке Монгун-Тайгинского мезоочага ТПОЧ. При практическом использовании отрицательные значения получаемых модельных функций, как не имеющие физического смысла, заменены нулевыми значениями.

Коэффициент детерминации наблюдаемого ряда и третьей модели R^2 0,88, четвертой модели – 0,98. В этом случае, при коэффициенте детерминации 0,88 и 0,98 регрессионная модель объясняет 88 и 98 % дисперсии критериального показателя, остальные же 12 и 2 % считаются обусловленными факторами, не отраженными в модели.

Сравнение моделей, подобранных методом stepwise regression (пошаговой регрессии) и методом «к» лучших признаков (преимущество stepwise regression моделей над моделями k -лучших признаков). При сравнении моделей, полученных разными методами следует учесть, что:

- количество параметров первой и второй моделей, полученных методом «к» лучших признаков, равно 7 и 14 соответственно, количество параметров третьей и четвертой моделей, полученных методом пошаговой регрессии, также равно 7 и 14;

- коэффициенты детерминации R^2 первой и второй моделей, полученных методом «к» лучших признаков, равны 0,77 и 0,86, коэффициенты детерминации R^2 третьей и четвертой моделей, полученных методом пошаговой регрессии, равны 0,88 и 0,98.

Если для сравнения моделей, полученных двумя методами stepwise regression (пошаговой регрессии) и «к» лучших признаков, использовать коэффициент детерминации, то лучшими следует признать модели, составленные методом пошаговой регрессии.

Возникает вопрос, каким образом при том же количестве параметров модели, подобранные методом stepwise regression, оказались гораздо ближе к описываемому природному процессу зооноза, чем модели, подобранные методом «к» лучших признаков?

Ответ на него лежит в сфере поиска наиболее значимых для описания природного процесса параметров модели. Для объяснения этого явления в [1] приводится следующая иллюстрация Х.Гаррета эффективности алгоритма, позволяющего подобрать оптимальный набор параметров модели. Пусть имеется 20 параметров, каждый из которых имеет кор-

Коэффициенты корреляции между временными рядами хода эпизоотий (активностью эпизоотий чумы) и среднемесячным количеством осадков (параметрами модели)

Среднемесячное количество осадков (параметр модели)	№ параметра	Метод анализа экспериментальной информации			
		«к» лучших признаков		Пошаговая регрессия (stepwise regression)	
		Первая модель	Вторая модель	Третья модель	Четвертая модель
O_{12}^{t-4}	60	0,688	0,688	0,688	0,688
O_{12}^{t-2}	36	0,507	0,507	0,507	0,507
O_7^{t-1}	19	0,494	0,494	-	-
O_{10}^{t-1}	22	-	0,370	-	-
O_2^{t-1}	14	-	0,365	0,365	0,365
O_1^{t-1}	13	-	0,347	-	0,347
O_4^{t-2}	28	-	0,269	-	-
O_6^{t-2}	30	-	0,264	-	0,264
O_9^{t-3}	45	-	0,256	-	-
O_5^{t-1}	17	-	-	-	0,209
O_4^{t-3}	40	-	-	-	0,168
O_4^{t-1}	16	-	-	-	0,79
O_2^{t-4}	50	-	-	-	0,002

реляцию с внешним критерием порядка 0,30. Если эти параметры коррелируют друг с другом на уровне $r(x_i, x_j) = 0,60$, то множественный коэффициент корреляции линейной диагностической модели равняется 0,38, если же $r(x_i, x_j) = 0,30$, множественная корреляция повышается до 0,52. Наконец, при $r(x_i, x_j) = 0,10$ эффективность модели достигает высокого значения 0,79. Этот факт хорошо исследован в теории регрессионного анализа [12].

Он также достаточно понятен на качественном уровне рассуждений, так как сильная зависимость признаков между собой означает дублирование большей части информации о проявлении диагностируемого свойства у исследуемых объектов [4].

Скорее всего, при выборе параметров методом «к» лучших признаков некоторая их часть, хотя и имеет высокий по модулю коэффициент корреляции с внешним критерием (табл. 1, 2) (наблюдаемым многолетним ходом зооноза), но также она имеет высокую взаимосвязь между собой (содержит повторяющуюся информацию), что не позволяет этим моделям показать наилучшую эффективность.

Поэтому использованный более сложный метод анализа экспериментальной информации stepwise regression (пошаговой регрессии) позволил выбрать для модели параметры, которые, хотя и не имеют наибольшие по модулю коэффициенты корреляции с временным рядом зооноза (табл. 1, 2), не содержат повторяющуюся информацию о процессах, происходящих в данном природном объекте. Следовательно, модели, полученные методом пошаговой регрессии, заслуженно показывают наилучшую эффективность и близость к природному процессу эпизоотий чумы.

Биологический аспект анализа моделей (поиск биологического смысла модели). Внимательно рас-

сматривая выбор параметров третьей и четвертой моделей из всей последовательности параметров (108 рядов значений: 60 по среднемесячным осадкам и 48 по среднемесячным температурам) можно заметить, что наиболее значимыми параметрами для активности эпизоотий являются количество осадков в зимние месяцы (два параметра за декабрь и один за февраль в третьей модели) и температура теплого времени года: весны и лета (два параметра за апрель, один за июнь и один за июль в третьей модели).

Позволим себе поделиться догадкой о возможной закономерности эпизоотического процесса при чуме в Тувинском природном очаге этой инфекции. Можно предположить, что большое количество снега во время холодного периода года служит для наилучшего сохранения теплого микроклимата в норах длиннохвостого суслика – основного носителя чумы в ТПОЧ. Это благоприятное условие способствует активизации чумного микроба впоследствии через один, два и даже четыре года. А высокая температура в теплый период наоборот (коэффициенты температурных параметров модели имеют отрицательный знак) не способствует последующей активности эпизоотий чумы в этом году, через один и три года.

Таким образом, результаты моделирования показали выраженную зависимость активности эпизоотий в Тувинском природном очаге чумы от климатических условий (среднемесячного количества осадков за текущий и предыдущие четыре года и температуры за текущий и предыдущие три года)

Полученные множественные линейные регрессионные модели (3, 5) позволяют прогнозировать активность течения эпизоотического процесса при чуме на 1 год.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между временными рядами хода эпизоотий (активность эпизоотий чумы) и среднемесячной температурой (параметрами модели)

Среднемесячная температура (параметр модели)	№ параметра	Метод анализа экспериментальной информации			
		«к» лучших признаков		Пошаговая регрессия (модели stepwise regression)	
		Первая модель	Вторая модель	Третья модель	Четвертая модель
T_4^{t-3}	100	0,394	0,394	0,394	0,394
T_6^{t-2}	90	0,385	0,385	-	-
T_6^{t-1}	78	0,338	0,338	0,338	-
T_2^t	62	0,259	-	-	-
T_2^{t-1}	74	-	0,249	-	-
T_{12}^{t-2}	96	-	0,237	-	-
T_3^{t-2}	87	-	-	-	0,206
T_2^{t-2}	86	-	-	-	0,111
T_4^t	64	-	-	0,075	-
T_2^{t-3}	98	-	-	-	0,072
T_7^{t-1}	79	-	-	0,008	-
T_6^{t-3}	102	-	-	-	0,001

Самой адекватной из рассмотренных моделей к природному процессу зооноза явилась модель, полученная методом stepwise regression (методом пошаговой регрессии). Эта регрессионная модель (5) объясняет 98 % дисперсии критериального показателя, и только остальные 2 % считаются обусловленными факторами, не отраженными в модели.

Наиболее значимыми для активности эпизоотий являются количество осадков в зимние месяцы и температура теплого времени года – весны и лета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: Классификация и снижение размерности. М.: Финансы и статистика, 1989. 256 с.
2. Дубянский М.А., Ермилов А.П., Богатырев С.К. и др. О связи эпизоотий чумы в Казахстане с метеорологическими условиями. Пробл. особо опасных инф. 1977; 5(57):24–9.
3. Дубянский М.А., Кеженбаев А., Степанов В.М. и др. Прогнозирование эпизоотической активности чумы в Приаралье и Кызылкумах. Нукус: Каракалпакстан, 1992. 240 с.
4. Дюк В.А. Компьютерная психодиагностика. СПб.: Братство; 1994. 364 с.
5. Каримова Т.Ю., Неронов В.М. Природные очаги чумы Палеарктики. М.: Наука; 2007. 199 с.
6. Кол Н.А., Калущ Ю.А., Ростовцев М.Г., Чульдун А.Ф., Мамаш Е.А. Использование ГИС-технологий при анализе пространственной динамики Каргинского мезоочага Тувинского природного очага чумы. Геоинформатика. 2008; 3:11–6.
7. Кол Н.А., Ростовцев М.Г., Чульдун А.Ф. Оптимизация сроков эпизоотологического обследования Каргинского мезоочага Тувинского природного очага чумы. Бюл. Восточно-Сибирского науч. центра СО РАН. 2008; 6(64):25–9.
8. Лавровский А.А. О периодической активности природных очагов чумы и причинах, ее обуславливающих. Влияние солнечной активности на атмосферу и биосферу Земли. М.: Наука; 1971. С. 74–80.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
10. Ротшильд Е.В., Ермилов А.П., Даниленко И.Д., Постников Г.В. Многолетняя динамика и связь с погодой эпизоотий чумы среди больших песчанок в Северо-восточном Прикаспии. Пробл. особо опасных инф. 1970; 6:120–31.
11. Тихонов А.Н. Математическая модель. В кн.: Большая советская энциклопедия. М.: Советская энциклопедия. 1969–1978.
12. Хей Дж. Введение в методы байесовского статистического вывода. М.: Финансы и статистика; 1987. 335 с.

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

1. Aivazyan S.A., Bukhshtaber V.M., Enyukov I.S., Meshalkin L.D. [Applied Statistics: Classification and Reduction of Dimension]. M.: Finansy i Statistika; 1989. 256 p.
2. Dubyansky M.A., Ermilov A.P., Bogatyrev S.K. et al. [On the relation between meteorological conditions and plague epizootic in Kazakhstan]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1977; 5(57):24–9.
3. Dubyansky M.A., Kezhenbaev A., Stepanov V.M. et al. [Prognosis of Epizootic Plague Activity in Sub-Aral Area and Kyzyl Kum]. Nukus: Karakalpakstan; 1992. 240 p.
4. Dyuk V.A. [Computer Psychodiagnosis]. St. Petersburg: Bratstvo; 1994. 364 p.
5. Karimova T.Yu., Neronov V.M. [Natural Plague Foci of Palearctic]. M.: Nauka; 2007. 199 p.
6. Kol N.A., Kalush Yu.A., Rostovtsev M.G., Chul'dun A.F., Mamash E.A. [Applying GIS-technologies to the spatial analysis of Karginsk mezo-focus of Tuva natural plague focus]. Geoinformatika. 2008; 3:11–6.
7. Kol N.A., Rostovtsev M.G., Chul'dun A.F. [Optimization of terms of epizootiological monitoring of Karginsk mezo-focus of Tuva natural plague focus]. Byullet. Vostoch. Sibirsk. Nauch. Tsentra SO RAMN. 2008; 6(64):25–9.
8. Lavrovsky A.A. [Periodic activity of natural plague foci and its causes. Effects of solar activity on the Earth's atmosphere and biosphere]. M.: Nauka; 1971. P. 74–80.
9. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Kutyrev V.V. et al. [Natural Plague Foci of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
10. Rothschild E.V., Ermilov A.P., Danilenko I.D., Postnikov G.V. [Long-term dynamics and weather dependence of plague epizootics among great gerbils in the North-Eastern Caspian Region]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1970; 6:120–31.
11. Tikhonov A.N. [Mathematical model]. In: Bol'shaya Sovetskaya Entsiklopedia. M.: Sovetskaya Entsiklopedia; 1969–1978.
12. Hey J. [Introduction to Bayesian Statistical inference Methods]. M.: Finansy i Statistika; 1987. 335 p.

Authors:

Kol N.A., Chul'dun A.F., Kalush Yu.A. Tuvinian Institute for Complex Exploration of Natural Resources, SB of the RAS. Internationalnaya St., 117-a, Kyzyl, 667000, Tuva Republic, Russia. E-mail: Natachakol@yandex.ru
Rostovtsev M.G. Tuvinian Plague Control Station. Kalinina St., 5a, Kyzyl, 667000, Tuva Republic, Russia.

Об авторах:

Кол Н.А., Чульдун А.Ф., Калущ Ю.А. Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов СО РАН. 667007, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Интернациональная, д. 117-а. E-mail: Natachakol@yandex.ru
Ростовцев М.Г. Тувинская противочумная станция. 667000, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Калинина, д. 5а.

Поступила 10.06.11.

УДК 616.981.452 (471)

А.А.Кузнецов¹, А.М.Поршаков¹, А.Н.Матросов¹, Е.В.Куклев¹, В.Б.Коротков², В.М.Мезенцев³,
Н.В.Попов¹, В.П.Топорков¹, А.В.Топорков¹, В.В.Кутырев¹

ПЕРСПЕКТИВЫ ГИС-ПАСПОРТИЗАЦИИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области», Саратов;

³ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

Приведена краткая характеристика результатов паспортизации природных очагов чумы, осуществлявшейся в конце XX века. Дана оценка принципу формально-территориальной дифференциации энзоотических территорий, обеспечившей высокую степень упорядочивания получаемой при эпизоотологическом обследовании информации. Рассмотрены перспективы нового этапа паспортизации на основе ГИС-технологий. Определена стратегия и предложены методические подходы ее реализации. Сделан акцент на широкое внедрение в работу противочумных учреждений цифровых топографических карт и системы глобального спутникового позиционирования.

Ключевые слова: природные очаги чумы, эпизоотологическое обследование, геоинформационное картографирование.

A.A.Kuznetsov¹, A.M.Porshakov¹, A.N.Matrosov¹, E.V.Kuklev¹, V.B.Korotkov², V.M.Mezentsev³, N.V.Popov¹,
V.P.Toporkov¹, A.V.Toporkov¹, V.V.Kutyrev¹

Prospects of GIS-Passportization of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²Centre of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region, Saratov; ³Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Characterized in brief are the results of natural plague foci passportization carried out in the late XX century. Evaluation of the principle of formalized spatial differentiation between enzootic territories is made. The principle can guarantee high degree of data ordering, obtained in the process of epizootiological surveillance. Therefore, prospects of a new stage of plague foci passportization based on GIS-technologies are viewed, the strategy is determined, and methodological approaches for its realization are put forward. Large-scale implementation of digital topographic maps and global positioning system into the work of plague control organizations is accentuated.

Key words: natural plague foci, epizootiological surveillance, geoinformation mapping.

В 70–90-е годы прошлого века в СССР, а затем в Российской Федерации осуществлялась паспортизация природных очагов чумы [1], состоявшая из двух основных направлений работы. Одно из них заключалось в единовременном (однократном) составлении описательной части паспорта каждого очага, содержавшей картографические материалы, другое – в непрерывном накоплении данных планового эпизоотологического надзора за чумой и, в первую очередь, эпизоотологического обследования энзоотических территорий. В результате выполнения этой работы была создана принципиально новая методическая и теоретическая основа для совершенствования деятельности противочумных учреждений [7, 9]. Качественное повышение надежности эпизоотологического надзора за чумой достигалось за счет перехода к количественным оценкам эпизоотологических и эпизоотических показателей, характеризующих потенциальную эпидемическую опасность очаговых территорий.

Характерной особенностью паспортизации было внедрение формально-территориальной дифференциации всей энзоотичной по чуме зоны страны, построенной на общепринятой картографо-геодезической основе. За наименьшую единицу диф-

ференциации был принят так называемый «сектор первичного района», соответствующий трапеции топографической карты 25-тысячного масштаба и получавший шифр, основанный на ее номенклатуре. Описательная часть паспорта содержала планшеты с изображением 4 смежных секторов очаговой территории, стандартно скомпонованных в «первичный район», соответствующий трапеции 50-тысячного масштаба, но изображенный в масштабе 1:100000. Каждый первичный район имел описание особенностей его территории по нескольким параметрам. Накопление информации о результатах эпизоотологического обследования, проводимого с различной периодичностью, и об изменениях эпизоотической ситуации осуществлялось отдельно по каждому сектору. Для этого на противочумных станциях ежемесячно заполнялись и отправлялись в РосНИПЧИ «Микроб» стандартные формы № 1, 2 и 3 («Методические рекомендации по паспортизации природных очагов чумы», 1976). Вследствие внедрения в практику работы противочумных учреждений страны этой информационно-поисковой системы (ИПС) был создан банк унифицированных данных, составивший около 200 тыс. документов.

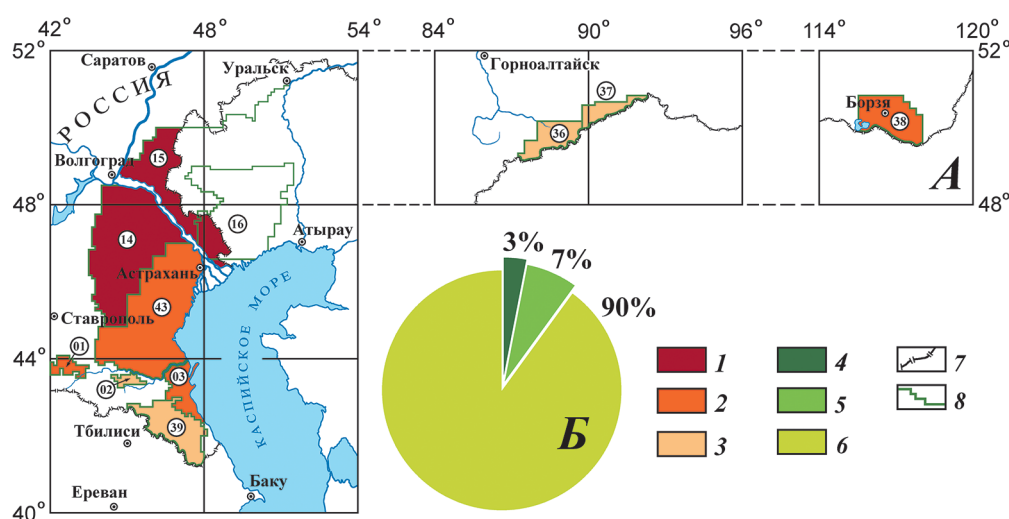
После распада СССР многие разделы этой ра-

боты были приостановлены. Единственным сохранившимся компонентом было продолжающееся накопление противочумными учреждениями данных мониторинга с указанием шифров секторов, откуда поступала информация. То есть до настоящего времени не утрачена возможность ретроспективного территориального анализа происходивших в очагах событий. Следует признать, что использованный при паспортизации картографический подход оказался весьма удачным и полезным. Выбранный размер формально-территориальной ячейки также является оптимальным относительно реальных площадей природных очагов.

Итоги деятельности противочумной службы в последние десятилетия XX века достаточно весомы. В это время была разработана интегрированная количественная оценка результатов обследования природных очагов чумы, подтверждена надежность действующих методов выявления эпизоотий различного ранга [8]. В процессе эксплуатации ИПС (вплоть до 1992 г.) разработаны количественные критерии: эпидемический потенциал, индексы эпидемичности и эпизоотичности, интегрированный показатель эпизоотической и эпидемической активности природного очага, что позволило оптимизировать стратегию принятия управленческих решений при эпидемиологическом надзоре за чумой. Предложена в практику система оценок эффективности профилактических мероприятий по степени воздействия на отдельные компоненты (или факторы) эпидемического потенциала и, в конечном итоге, на степень снижения риска заражения человека. Это позволило оперативно обосновать цели и выбор оптимальной стратегии мер профилактики в разных ситуациях, установить причины изменения их расчетной эффективности. По мере накопления данных в масштабах всей энзоотичной по чуме территории страны стала доступной сравнительная оценка эпидемического потенциала не только природных очагов чумы различной биоце-

нотической структуры в целом, но и их отдельных участков. Последнее было использовано при эпидемиологическом районировании очаговых территорий, в частности, их дифференциации по степени эпидемической опасности, а также для разработки регламента эпизоотологического обследования и профилактических мероприятий [3]. Практическое внедрение накопленных данных нашло отражение в создании методов моделирования эпидемического процесса, прогнозирования эпизоотической и эпидемической активности природных очагов чумы, в повышении информативности методов диагностики чумы при эпидемиологическом надзоре в природных очагах. Была обновлена также концепция контроля численности популяций проблемных видов животных с учетом приоритетности природоохранных аспектов, заключающихся в снижении вредного воздействия пестицидов на полезную фауну и природную среду в целом [5]. Накопление новой информации способствовало расширению современных представлений о роли социальных и биологических факторов в структуре эпидемического и эпизоотического процессов при чуме. Эти и другие достижения в значительной мере были обеспечены паспортизацией природных очагов.

Все это в целом позволило в новом тысячелетии внедрить в практику эпидемиологического надзора дифференцированный подход к эпизоотологическому обследованию очаговых территорий с различным эпидемиологическим статусом. Как было выяснено, участки с высокой степенью эпидемической опасности занимают лишь 3 % территории природных очагов чумы (рисунок). Это обстоятельство однозначно диктует необходимость отказа от равномерного эпизоотологического обследования. Фактически в XXI веке ежегодно обследуемая физическая площадь очагов сократилась вдвое и не превышает одной трети всей их территории. Таким образом, за счет резкого сокращения интенсивности обследования участков с



Дислокация и эпидемиологическая оценка природных очагов чумы на территории Российской Федерации:

A – общая оценка эпидемической опасности очагов: 1 – высокая, 2 – средняя, 3 – низкая; *B* – процентное соотношение участков с высоким (4), средним (5) и низким (6) уровнем эпидемической опасности во всех очагах. Границы: 7 – Российской Федерации, 8 – природных очагов чумы

низкой степени эпидемической опасности и увеличения его кратности в местах повышенной опасности было сохранено надежное эпидемиологическое благополучие населения, проживающего на территории природных очагов чумы, при общем снижении затрат на эпизоотологическое обследование.

Реальным и значимым итогом проделанной в этом направлении работы явилось издание монографии о природных очагах чумы бывшего Советского Союза [7]. Однако судьба описательных частей паспортов требует своего дальнейшего развития. Фактически на сегодняшний день отсутствуют систематизированные данные о нынешнем состоянии энзоотичных территорий, хотя есть сведения о значительных изменениях, произошедших там за последние десятилетия. Кроме того, реалии сегодняшнего дня заставляют серьезно пересмотреть многие принципы эпидемиологического надзора в природных очагах чумы в целях дальнейшего снижения затратности проводимых там мероприятий. Требуют специального целенаправленного описания современные методы и тактические подходы при эпидемиологическом надзоре, основанные на информационных (в т.ч. географических) технологиях. Помимо нового описания очагов, требуют уточнения сами их размеры и границы, а также эпидемиологическая и эколого-эпизоотологическая характеристика, ландшафтная и биоценотическая структуры.

В данном сообщении авторы изложили свои представления о том, какими должны быть обновленные паспорта природных очагов чумы Российской Федерации и что необходимо для их составления. Современный уровень развития информационных (компьютерных) технологий позволяет создавать и хранить документы в электронной форме. Электронный паспорт природного очага чумы может и должен включать самую различную информацию об очаге. При этом весьма ценной особенностью такого паспорта является возможность уточнения, редактирования и неограниченного пополнения информации. В качестве программной оболочки внедряется географическая информационная система (ГИС) на платформе ArcGIS [4]. Не менее перспективной может оказаться отечественная ГИС «Панорама». В качестве источника пространственной привязки данных целесообразно использование цифровых топографических карт (ЦТК), выполненных в общепринятых для Российской Федерации проекциях. Преимущества топографических карт очевидны. Это высокая степень изученности территории, комплексное содержание, высокая точность по плановым и высотным параметрам, унифицированность по математической основе, содержанию и оформлению [11].

В настоящее время опубликованы и доступны ЦТК всей территории России масштабов 1:1000000, 1:500000 и 1:200000 [10]. Для целей стратегического планирования и анализа в системе противочумных учреждений страны наиболее пригодна карта масштаба 1:500000. Для планирования на уровне регионов,

административных районов (так же, как и отдельных природных очагов чумы), когда требуется более высокая детализация, приемлемой в начальный период паспортизации является карта масштаба 1:200000.

Как известно, картографическая информация любого источника со временем устаревает и возникает проблема современности карты. Вопрос актуализации исчезнувших, появившихся или видоизменившихся географических объектов можно решить с помощью совместного использования ЦТК и наиболее поздних космических снимков. Могут быть использованы снимки 6- или 15-метрового пространственного разрешения [10]. Успешное решение этих вопросов обеспечивается наличием в сети интернет необходимых веб-ресурсов.

Широкое распространение системы глобального спутникового позиционирования позволяет принципиально изменить процесс ориентирования на местности при проведении эпизоотологического обследования. При этом можно и необходимо отказаться от прежнего способа адресации мест сбора полевого материала, предполагающего указание ориентира, картометрическое определение азимута и расстояния. Этот способ не всегда обеспечивал достаточную точность целеуказания и часто приводил к ошибкам. Использование приемника спутниковых сигналов системы ГЛОНАСС/GPS обеспечивает в автономном режиме достаточно точное (с ошибкой не более 100 м) определение геодезических координат места нахождения навигатора [12]. Получаемые значения широты и долготы каждого пронумерованного пункта обследования с максимальной точностью записывают в этикетку, сопровождающую материал, дублируют при заполнении любых журналов, ведомостей и учетных форм, содержащих сведения о точках эпизоотологического обследования, но самое главное – вносят в компьютерную базу данных. Оперативное выполнение указанных работ возможно в случае комплектации каждой зоологической бригады переносным компьютером (ноутбуком).

Особо следует рассмотреть вопрос о формально-территориальной дифференциации природных очагов на секторы. Использование этого принципа учета поступающей информации создает дополнительные возможности оперативного пространственного анализа и соответствует требованиям профессиональной картографии. Вместе с тем важными особенностями ГИС-технологий, внедряемых в настоящее время, являются точное определение географических координат всех пунктов эпизоотологического обследования с помощью спутниковых навигаторов и создание пользовательских (тематических) карт на основе номенклатурных листов любого масштаба. Без всякого сомнения, существующая дифференциация, основанная на использовании разграфки государственных топографических карт масштаба 1:25000, должна быть сохранена в привычных рамках. Однако формирование шифров секторов необходимо унифицировать, применив общепринятые правила. Это позволит кор-

ректно использовать предлагаемый принцип накопления мониторинговых данных ведомствами, не являющимися учреждениями Росреестра (санитарно-эпидемиологическими, медико-биологическими, экологическими и др.). Открывающаяся при этом перспектива внедрения указанного принципа для геоинформационного картографирования природных очагов других инфекционных болезней оценивается положительно. Поэтому нельзя согласиться с мнением о «полной бессмысленности» и «абсолютной не нужности» сетки географических координат при осуществлении паспортизации очагов чумы [2].

В системе государственной топографо-геодезической службы существуют правила составления номенклатур топографических карт различных масштабов, касающиеся как буквенных обозначений листов, так и их цифровых аналогов [6]. Согласно этим правилам, латинские буквенные обозначения рядов карт миллионного масштаба заменяются двухзначными числами, начиная с экваториального ряда А (номер 01), последовательно двигаясь к северному полюсу (... 02, 03, 04 и т.д.). Следовательно, ряды К, L и M, в пределах которых размещены природные очаги чумы Российской Федерации, имеют номера 11, 12 и 13 (до настоящего времени противочумные учреждения для этих рядов применяли номера 2, 3 и 4). Остальные правила преобразования номенклатур в шифры секторов используются противочумными организациями правильно и не требуют корректировки. Однако следует заметить, что в настоящее время картографические ведомства не используют замену латинских букв цифрами при работе с цифровыми топографическими картами.

В целях контролируемости перехода противочумных учреждений на новую систему формирования шифров секторов предлагаем изменить правила включения в эти шифры номеров природных очагов. Изменения заключаются в том, что сначала (слева) размещают номенклатурную (основную) часть шифра (9 цифр), а в его конце (справа) — номер очага либо в скобках, либо через тире. Шифр увеличивается на одну цифру (11 вместо 10). Например: один из секторов Прикаспийского песчаного очага чумы получает шифр 123808231(43). Он соответствует листу топографической карты 25-тысячного масштаба L-38-82-B-a в очаге № 43. Напомним, что номенклатура каждого листа топографической карты указывается сверху в правом углу (цифровой вариант в синем цвете — 12-38-082-3-1, буквенный вариант в черном цвете — L-38-82-B-a). Использувавшееся ранее противочумной службой написание шифра сектора для этого листа карты было таким: 433808231 (жирным шрифтом выделена часть шифра, соответствующая номенклатуре листа карты масштаба 1:1000000). С принятием нового формата шифров лист миллионной карты с номенклатурой L-38 следует обозначать **1238**, а не **338**. Таким образом, преемственность информации о событиях на территории сектора обеспечивается узнаваемостью как старой формы написа-

ния шифра (10 знаков), так и новой (9 знаков + 2 знака в скобках или через тире). Однако в электронную базу данных вносят шифры секторов только нового типа. Здесь следует заметить, что в новом варианте номер очага (в скобках или через тире) может иметь любое количество знаков. Увеличение числа знаков может потребоваться при использовании предлагаемой системы для пространственной дифференциации природных очагов других инфекций на всей территории Российской Федерации. Окончательно вопрос о форме нумерации природных очагов будет решен при подготовке соответствующего методического документа.

Необходимо подчеркнуть, что конкретные листы топографических карт (так же, как и соответствующие им секторы) ограничены рамками, являющимися конкретными параллелями и меридианами. Следовательно, геодезические координаты любой точки на поверхности Земного шара автоматически указывают, в пределах какого листа (сектора) расположена эта точка. В случае утери записи шифра сектора его легко можно восстановить по координатам точки, где был взят материал. При этом необходимо помнить, что меридианы, ограничивающие «ширину» сектора, отстоят друг от друга на 7'30", начиная с Гринвичского (нулевого) меридиана. Параллели, задающие его «высоту», отстоят друг от друга на 5'00", начиная с экватора [6].

Информация в базе данных о принадлежности точек обследования тому или иному сектору позволяет группировать получаемые сведения по достаточно мелким формально-территориальным единицам (приблизительно 10×10 км). Такая дополнительная группировка не препятствует объединению материала по административным районам и любым другим подразделениям обследуемой территории, однако позволяет проводить более точный научный анализ пространственной организации природных очагов инфекций. Визуализация формально-территориальных единиц (в нашем случае секторов) на цифровой (электронной) карте, исполняемой в одном из векторных форматов, обеспечивается отображением градусной сетки с необходимой для этого дробностью. Существует также возможность отображения разграфки карты на листы любого масштаба из стандартного масштабного ряда с указанием номенклатуры отдельных листов. Однако эти возможности в полной мере осуществимы лишь при работе с ответственными цифровыми топографическими картами.

Важным этапом создания электронного паспорта является нанесение границ природного очага чумы на цифровую карту. Общие принципы определения границ остаются такими же, как описано в «Методических указаниях по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации» (2008) с незначительными уточнениями, касающимися усиления роли линейных ландшафтных элементов при определении внешних границ очагов. В настоя-

щее время требуется подготовка к реальному выполнению этого задания, которое целесообразно провести силами специалистов противочумных институтов благодаря наличию (или будущему приобретению) соответствующего программного обеспечения, цифровых топографических карт, а также определенных навыков работы в компьютерных графических редакторах. Для этого необходимо приобретение ЦТК масштаба 1:200000, однако наиболее приемлемым является 100-тысячный (километровый) масштаб.

Для получения полной характеристики энзоотичной территории и любых более мелких ее участков дополнительно к имеющимся стандартным слоям карты создают необходимое количество тематических слоев. Один из важнейших слоев должен содержать информацию о дислокации всех точек эпизоотологического обследования, где был обнаружен возбудитель чумы или следы его пребывания. Если в настоящее время задача определения точной дислокации мест регистрации эпизоотии может решаться с помощью приемников ГЛОНАСС/GPS, то нанесение прошлых эпизоотических точек потребует кропотливой работы.

На других тематических слоях отображают данные о численности основных, второстепенных и случайных носителей и переносчиков возбудителя по видам. Отдельно размещают картографическую информацию о синантропных видах (домовая мышь, серая крыса, блоха *Pulex irritans*). При наличии данных заполняют слои о ландшафтной структуре очагов, о пространственной структуре поселений носителей и переносчиков, о проводимых профилактических мероприятиях. Количество создаваемых слоев трудно предвидеть заранее, но оно должно обеспечить максимальную детализацию наносимой на карту информации по видам животных, различным инфекциям, населению, мероприятиям специфической и неспецифической профилактики, эпидемических проявлениях и т. д. Фактически эта работа должна представлять собой раздел ГИС-картографирования, без которого создание полноценного электронного паспорта очага невозможно.

О нанесении на электронную карту прошлых эпизоотических точек необходимо сделать некоторые пояснения. В процессе первой паспортизации был предусмотрен отход от строгой формализации при оконтуривании секторов и даже первичных районов. Формальными (геодезически обоснованными) оставались только внешние рамки листов 100-тысячных топографических карт. В отдельных случаях было разрешено делить лист «километровки» не по рамкам карт более крупного масштаба, составляющих этот лист, а по имеющимся на карте линейным географическим объектам (рекам, дорогам, границам ландшафтных выделов и т.д.). Форма секторов при таком подходе становилась весьма абстрактной. Фактически этим правилом воспользовались лишь некоторые противочумные станции. Результатом такого подхода могло стать обозначение шифра сек-

тора для некоторых точек обследования, не соответствующее истинной номенклатуре листа карты 25-тысячного масштаба, на котором расположены эти точки. Понятно, что при формировании базы данных подобные несоответствия (если будут обнаружены) должны быть исключены, что, однако, не представляет особых трудностей. При нанесении на цифровую карту прежних эпизоотических точек, отыскивают истинное положение каждой по нескольким расположенным вокруг нее ориентирам. Геодезические координаты точек, нанесенных по окружающим ориентирам, автоматически определяются программой, в которой открыта электронная карта, и они должны быть внесены в базу данных. После этого не сложно определить реальный шифр сектора, где расположена точка.

Приняв за основу результаты картографической разграфки природных очагов чумы, необходимо организовать составление современной описательной части электронного паспорта. За основу берут имеющийся паспорт. Описание ведут по определенной схеме, основные рубрики которой остаются такими же, как в «Методических рекомендациях по паспортизации природных очагов чумы» (1976). Объем текста не ограничивается, поэтому при его составлении следует использовать любые опубликованные сведения, касающиеся физико-географических, ландшафтных, геоботанических, фаунистических и прочих характеристик. Однако основное внимание уделяют эпидемиологическим и эпизоотологическим описаниям очага. В качестве новой рубрики необходимо ввести описание сочетанных с чумой природно-очаговых инфекций бактериальной, вирусной и риккетсиозной этиологии. На сегодняшний день имеется информация о нескольких территориально сочетанных очагах, и усилия в направлении их изучения будут наращиваться.

На основе программного обеспечения ГИС, принятой учреждениями противочумной системы, подготавливают тексты описаний, которые размещают в соответствующих разделах базы данных. Одним из главных направлений новой паспортизации является именно создание и обслуживание такой информационной базы, опыт формирования которой уже имеется [4]. В нее заносят сведения о всех проводимых в очагах мероприятиях по эпидемиологическому надзору за чумой и другими инфекциями.

В соответствующих разделах создают таблицы, куда вносят все данные, накопленные за предшествующие годы, и организуют регулярное поступление данных текущего обследования. Создаваемые таблицы должны полностью заменить собой формы 1, 2 и 3 из первого этапа паспортизации с существенными усовершенствованиями, изменениями и дополнениями. Специалистами РосНИПЧИ «Микроб» планируется подготовка методических рекомендаций (указаний) по проведению новой паспортизации, где будет дано подробное описание карт, таблиц, уточненных списков видов животных, являющихся носителями и переносчиками в природных очагах чумы, а также ме-

тодов ГИС-картографирования и формирования базы данных. К этой работе будут привлечены сотрудники других противочумных институтов и станций.

Полноценное поступление новых данных станет возможным после официального начала функционирования корпоративной (ведомственной) ГИС противочумной системы. Для этого необходимыми условиями являются: приобретение цифровых топографических карт нужного масштаба; обеспечение специалистов противочумных подразделений спутниковыми навигаторами и ноутбуками; организация оптимального количества базовых станций, имеющих серверное оборудование; разработка приемов работы с навигаторами, обеспечивающих своевременную и правильную передачу результатов обследования в серверный центр (базовую станцию). Прямая фиксация работы навигаторов на базовых станциях в режиме «on-line» позволит оперативно отслеживать процесс эпизоотологического мониторинга и по его результатам незамедлительно принимать решения всем заинтересованным лицам.

Таким образом, новая паспортизация природных очагов чумы Российской Федерации строится на основе ГИС-технологий. Основными ее направлениями являются тематическое геоинформационное картографирование и создание соответствующей базы данных. Соблюдение перечисленных в статье условий способно обеспечить получение качественных электронных паспортов природных очагов чумы, отвечающих современным требованиям информационного прогресса, что позволяет назвать эту работу «ГИС-паспортизацией».

Работа выполнена по государственному контракту № 74-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барков В.Н., Тесленко Е.Б., Фомушкин В.М. Вопросы медико-биологического картографирования для паспортизации природных очагов чумы на территории СССР. Международные и национальные аспекты эпиднадзора при чуме. Иркутск; 1975. Ч. 1. С. 36–7.
2. Бурделов Л.А., Жумадилова З.Б., Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е., Атишабар Б.Б. Перспективы модернизации эпизоотологического обследования природных очагов чумы на основе современных технологий. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. 2010; 1–2 (21–22):3–12.
3. Кузнецов А.А., Кутырев В.В., Матросов А.Н., Топорков В.П. Совершенствование мониторинга за природными очагами чумы на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования. Пробл. особо опасных инф. 2004; 2(88):12–6.
4. Куклев Е.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А., Адамов А.К., Лопатин А.А., Топорков В.П. Разработка структуры базы данных по рискам в области биологической безопасности на уровне субъекта Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):34–6.
5. Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Кутырев В.В. Экстренные мероприятия по неспецифической профилактике заболеваний в природных очагах чумы в Российской Федерации. Дез. дело. 2008; 3:74–9.
6. Новиков В.И., Рассад А.Б. Основы геодезии и картографии: Уч. пособие. Саратов; 2007. 84 с.

7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.; 2004. 191 с.

8. Руденчик Ю.В., Солдаткин И.С. Обзор разработок, выполненных с помощью банка унифицированных данных по паспортизации природных очагов чумы. В кн.: Эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций в антропогенных ландшафтах. Саратов; 1990. С. 107–13.

9. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Паспортизация природных очагов чумы на территории стран СНГ (картографические материалы). Деп. в ВИНТИ, № 129–В 00. 24.01.2000. Саратов, 2000. 65 с.

10. Тезина Ю.А. Цифровая топографическая карта масштаба 1:500000. ArcReview. 2009; 1(48):17.

11. Трифонова Т.А., Мищенко Н.В., Краснощечков А.Н. Геоинформационные системы и дистанционное зондирование в экологических исследованиях. М.; 2005. 352 с.

12. Яценков В.С. Основы спутниковой навигации. Системы GPS, NAVSTAR и ГЛОНАСС. М.; 2005. 271 с.

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

1. Barkov V.N., Teslenko E.B., Fomushkin V.M. [Problems of medical biological mapping as related to passportization of natural plague foci in the territory of the USSR. In: International and Countrywide Aspects of Epidemiological Surveillance in relation to Plague]. Irkutsk; 1975. Pt. 1. P. 36–7.
2. Burdelov L.A., Zhumadilova Z.B., Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E., Atshabar B.B. [Prospects of modernization of natural plague foci epidemiological surveillance based on modern computer technologies]. Karantin. Zoonoz. Inf. v Kazakhstane. 2010; 1–2 (21–22):3–12.
3. Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V., Matrosov A.N., Toporkov V.P. [Improvement of monitoring of natural plague foci based on the analysis of ecologic and epizootologic regularities of their functioning]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; 88:12–6.
4. Kuklev E.V., Razdorsky A.S., Safronov V.A., Adamov A.K., Lopatin A.A., Toporkov V.P. [Development of the structure of the database on the risks in the sphere of biological safety at the level of constituent unit of the Russian Federation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:34–6.
5. Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Kutyrev V.V. [Emergency measures as related to non-specific disease prophylaxis at natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. Dез. Delo. 2008; 3:74–9.
6. Novikov V.I., Rassada A.B. [Fundamental Principles of Geodesics and Cartography: Study Guide]. Saratov; 2007. 84 p.
7. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.; 2004. 191 p.
8. Rudenichik Yu.V., Soldatkin I.S. [Review of the pilot projects, worked out with the help of unified data bank, on natural plague foci passporting. In: Epizootiology and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases in Anthropogenic Landscapes]. Saratov; 1990. P. 107–13.
9. Soldatkin I.S., Rudenichik Yu.V., Popov N.V., Kuklev E.V., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N. [Natural Plague Foci Passporting in the Territory of the Commonwealth of Independent States (CIS) (Cartography Materials). VINITI Dep., № 129–B 00. 24.01. 2000. Saratov; 2000. 65 p.
10. Tezina Yu.A. [Digital Topographic Map of 1:500000 scale]. Arc Review. 2009; 1(48):17.
11. Trifonova T.A., Mishchenko N.V., Krasnoshechekov A.N. [Geoinformation Systems and Remote Sensing in Ecological Investigations]. M.; 2005. 352 p.
12. Yatsenkov V.S. [Fundamental Principles of Satellite Navigation. GPS Systems, NAVSTAR, and GLONASS]. M.; 2005. 271 p.

Authors:

Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Kuklev E.V., Popov N.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Korotkov V.B. Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region. Saratov, Russia.

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

Об авторах:

Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Куклев Е.В., Попов Н.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Коротков В.Б. Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области. Саратов.

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

Поступила 31.10.11.

В.А.Говорунова, И.Г.Говорунов, В.В.Фирстова, Е.В.Зырина

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БРОМИСТОГО ЭТИДИЯ С КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ РОДА *YERSINIA* В ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ/РЕГИДРАТИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск

Исследовано взаимодействие бромистого этидия с клетками авирулентных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* в лиофилизированных/регидратированных препаратах. Методом проточной цитофлуориметрии и при регистрации тотальной флуоресценции выявлена гетерогенность популяции по размерам частиц и содержанию в них нуклеиновых кислот. Показана корреляция между концентрацией колониеобразующих единиц в суспензии и приростом флуоресценции после добавки цетилтриметиламмонийбромида. Предложено использовать этот подход в качестве экспресс-метода оценки концентрации жизнеспособных клеток в лиофилизированных/регидратированных препаратах в процессе приготовления и хранения музейных штаммов, сухих живых вакцин и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, бромистый этидий, флуоресценция, жизнеспособность, цитометрия

V.A.Govorunova, I.G.Govorunov, V.V.Firstova, E.V.Zyrina

Investigation of Ethidium Bromide Interaction with *Yersinia* Bacterial Cells in Lyophilized/Rehydrated Preparations

State Research Centre for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Investigated was ethidium bromide interaction with the cells of avirulent *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* strains in lyophilized/rehydrated preparations. The population heterogeneity regarding particle size and concentration of nucleic acid was identified by flow cytometry and registration of total fluorescence intensity. Shown was the correlation between concentration of colony-forming units (CFU) and fluorescence increase after supplementing suspension with cetyltrimethylammoniumbromide. This approach was suggested as the express method to estimate viable cell count in lyophilized/rehydrated preparations and to control the process of preparing and storage of collection strains, dry live vaccine and probiotic preparations of gramnegative bacteria.

Key words: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, ethidium bromide, fluorescence, viability, cytometry.

В процессе приготовления и хранения лиофильно высушенных препаратов бактерий (вакцины, пробиотические препараты и др.) существует проблема контроля их качества, в частности, содержания (концентрации) жизнеспособных клеток. Аналогичная проблема имеет место при поддержании музейных коллекций бактериальных штаммов.

Для определения концентрации жизнеспособных бактерий в препаратах используют прямые и косвенные методы анализа. Прямые методы основаны на количественной оценке способности микроорганизмов расти и размножаться на питательных средах. Они трудоемки и продолжительны по времени (от суток до нескольких недель). Определенные сложности в анализ вносит наличие агрегатов клеток в суспензии и ее гетерогенность по физиологическому состоянию (субпопуляции неповрежденных, поврежденных и мертвых клеток). Косвенные методы анализа (биохимические, биофизические) основаны на тесной корреляции жизнеспособности бактериальной клетки с определенными ее свойствами: ферментативной активностью, целостностью оболочечного комплекса, морфологической структурой. Приборная регистрация нарушения нативности этих свойств позволяет достаточно быстро (минуты), точ-

но и воспроизводимо определять этот параметр [4].

Ряд экспресс-методов определения концентрации жизнеспособных клеток бактерий в суспензии основан на регистрации изменения флуоресценции бромистого этидия. В частности, известны способы определения общей концентрации бактерий в суспензии [3, 7] и метод оценки концентрации жизнеспособных клеток бактерий после замораживания-оттаивания [11]. В основе метода лежит свойство бромистого этидия связываться с нуклеиновыми кислотами, что сопровождается значительным приростом интенсивности флуоресценции [9]. В растворе нуклеиновых кислот эта реакция происходит за доли секунды. Интактные клетки грамотрицательных бактерий непроницаемы для молекул красителя вследствие барьерных свойств оболочечного комплекса. Разрушение этого барьера детергентами (третон Х-100, цетилтриметиламмоний бромид) или комплексами двухвалентных катионов (этилендиаминтетраацетат), криовоздействием обеспечивает доступ молекул красителя к внутриклеточным нуклеиновым кислотам, что сопровождается дополнительным возрастанием флуоресценции [1, 2, 5].

Целью работы было изучение взаимодействия бромистого этидия с лиофильно высушенными/регидратированными бактериальными штаммами рода

Yersinia и оценка возможности разработки экспресс-метода определения концентрации жизнеспособных бактерий в этих препаратах.

Материалы и методы

В работе использовали лиофилизированные препараты различных сроков хранения: 10 природных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и 7 авирулентных штаммов *Yersinia pestis*. В качестве защитной среды использовали сахарозо-желатиновую среду.

Анализ препаратов проводили следующим образом. Лيوфильно высушенный препарат бактерий регидратировали 1–6 мл физраствора. В регидратированном образце определяли концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) высевом на соответствующие плотные питательные среды (агар Хоттингера для *Y. pseudotuberculosis*, питательная среда для культивирования чумного микроба сухая (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) – для *Y. pestis*). Параллельно измеряли флуоресценцию на спектрофлуориметре Perkin-Elmer 1000 при следующих условиях: $\lambda_{\text{возб.}}$ = 322 нм, $\lambda_{\text{рег.}}$ = 620 нм, кварцевая кювета объемом 4 см³ и длиной оптического пути 1 см.

Цитометрический анализ образцов проводили на цитофлуориметре BD FACSCalibur. Аликвоту для анализа отбирали после завершения измерения флуоресценции в точке 4 (рис. 1) и разводили физраствором в 2–3 раза. Для обработки данных и построения графиков использовали программный комплекс CellQuest. В анализ брали 30000 частиц, которые гейтировали по боковому и прямому светорассеянию. События анализировали из установленного гейта в каналах флуоресценции FL2 (585/42) и FL3 (670/LP). Для построения трехмерных графиков использовали флуоресценцию, отражающую количество нуклеиновых кислот в частице и прямое светорассеяние, отражающее ее размер [8].

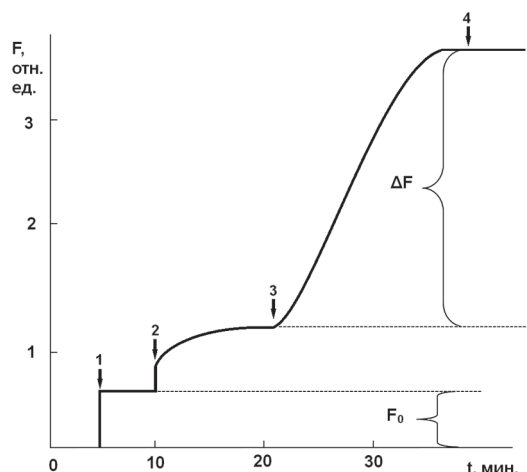


Рис. 1. Взаимодействие лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pestis* с бромистым этидием:

$\lambda_{\text{возб.}}$ = 322 нм, $\lambda_{\text{рег.}}$ = 620 нм. Кварцевая кювета с длиной оптического пути 1 см. Стрелками показаны моменты внесения в измерительную кювету: 1 – 3 мл раствора бромистого этидия ($2 \cdot 10^{-6}$ М) на физрастворе, забуференном трис-НСl (рН 7,05); 2 – 100 мкл исследуемой суспензии клеток; 3 – 30 мкл 10 % раствора цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ)

В случае работы с микроорганизмами I–II групп патогенности необходимо выполнять требования режима биологической безопасности [6]

Статистический обсчет результатов и построение графиков проводили с помощью компьютерных программ OpenOffice.org Calc 3.2.1. и MS Excel 7.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены данные флуориметрических измерений суспензии клеток *Y. pestis* в растворе бромистого этидия.

Из представленных данных следует, что после внесения клеток в раствор бромистого этидия наблюдается скачкообразный подъем интенсивности флуоресценции. Далее следует фаза экспоненциального нарастания флуоресценции до постоянного уровня. Внесение детергента приводит к добавочному приросту флуоресценции. Первоначальный скачок флуоресценции (2), по-видимому, обусловлен связыванием красителя с нуклеиновыми кислотами клеток с поврежденным барьером проницаемости. Участок кривой 2–3 отражает процесс проникновения молекул красителя через цитоплазматическую мембрану с последующим связыванием с внутриклеточными нуклеиновыми кислотами [11]. Возрастание флуоресценции в ответ на внесение ЦТАБ (3) объясняется разрушением мембран клеток детергентом и взаимодействием красителя с нуклеиновыми кислотами. Можно предположить, что последняя фаза изменения флуоресценции выявляет субпопуляцию неповрежденных клеток.

Гетерогенность популяции бактериальных клеток, обнаруженная в этом опыте, нашла свое подтверждение при сравнении цитометрических данных нативных клеток и клеток, регидратированных после лиофилизации (рис. 2).

Ранее мы наблюдали гетерогенность лиофильно высушенных/регидратированных препаратов *Y. pestis* EV при помощи флуоресцентной (светимость бромистого этидия) и фазово-контрастной (морфология клеток) микроскопии. Она проявлялась в различной светимости клеток в препарате, регистрируемой визуально или при помощи фотометрии. Современное ци-

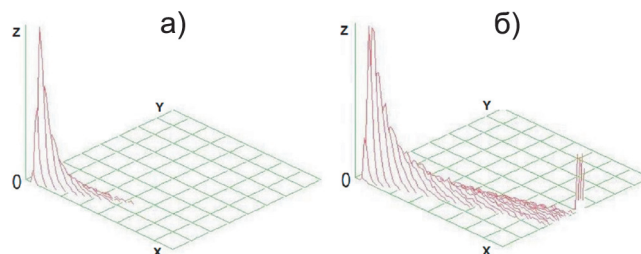


Рис. 2. Цитометрический анализ клеток авирулентного штамма *Y. pestis*:

а) суточная культура, выращенная на среде ЧПС и суспендированная в физрастворе; б) лиофильно высушенная/регидратированная в физрастворе культура того же штамма. Ось X – интенсивность флуоресценции частицы, ось Y – интенсивность светорассеяния частицы, ось Z – количество частиц с данными характеристиками по светорассеянию и флуоресценции

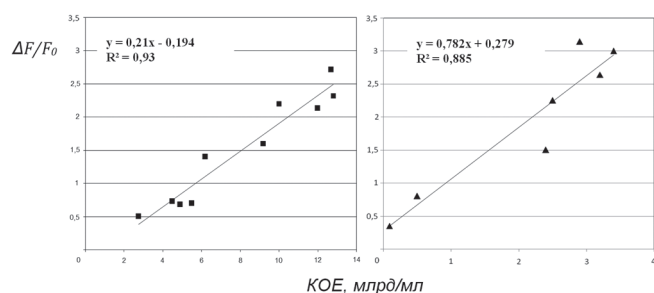


Рис. 3. Взаимосвязь флуоресцентных параметров с концентрацией жизнеспособных клеток в суспензии лиофилизированных/регидратированных клеток *Y. pseudotuberculosis* (слева) и *Y. pestis* (справа)

тометрическое оборудование позволило выявить, что в популяции клеток после лиофилизации присутствует группа клеток, близкая по морфологии и содержанию ДНК к нативным клеткам (положение основного пика). В то же время лиофилизация приводит к заметному возрастанию гетерогенности популяции по этим параметрам, о чем свидетельствует появление заметного «хвоста» на трехмерной диаграмме (рис. 2, б).

В дальнейших экспериментах мы провели корреляционный анализ между концентрацией КОЕ и величиной относительного прироста флуоресценции суспензии после добавки ЦТАБ ($\Delta F/F_0$). Результаты этого анализа для препаратов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* представлены на рис. 3.

Из представленных данных следует, что относительный прирост флуоресценции бромистого этидия в суспензии клеток после добавления ЦТАБ тесно коррелирует с концентрацией в ней жизнеспособных клеток. Полученную зависимость между флуоресценцией бромистого этидия в суспензии лиофилизированных/регидратированных бактериальных препаратов и концентрацией в ней жизнеспособных клеток можно использовать для экспресс-анализа концентрации КОЕ в препаратах. При этом следует принимать во внимание, что предложенный принцип носит, по-видимому, универсальный характер. Однако ввиду того, что концентрация нуклеиновых кислот в клетке варьирует в зависимости от многих факторов (вид микроорганизма, его физиологическое состояние и т.д.), калибровочную кривую в каждом случае необходимо строить заново. Вместе с тем, в случае отработки режима лиофилизации, либо состава защитной среды, при условии использования одного вида микроорганизмов в одном и том же физиологическом состоянии, данный метод вполне приемлем. Метод также применим для качественной оценки хранящегося материала по принципу «много – мало» жизнеспособных клеток. В качестве практических рекомендаций можно отметить, что линейность выявленной зависимости находится в диапазоне $\Delta F/F_0$ не выше 3 ед. При изменении температуры суспензии с 20 до 30 °C величина параметра $\Delta F/F_0$ падает на 10 % от исходной. Активный выброс молекул бромистого этидия из клеток, отмеченный ранее в литературе [10, 12], не наблюдался в наших опытах, что, по-видимому, обусловлено низким энергетическим

статусом клеток после воздействия повреждающих факторов лиофилизации и регидратации.

Этот метод рекомендуется применять и для контроля процесса приготовления и хранения музейных штаммов, вакцинных и пробиотических препаратов грамотрицательных бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Говорунов И.Г., Косарев Н.В., Евтодченко Ю.В., Пучков Е.О. Исследование проницаемости мембран оболочки *Escherichia coli* для бромистого этидия. Микробиол. 1982; 51(5):731–4.
2. Ирхин А.И., Кондрашенко Т.Н., Пучков Е.О. Чувствительность мембран клеток *Escherichia coli* к детергентам разных классов. Микробиол. 1989; 58(2):217–21.
3. Косарев Н.В., Пучков Е.О. Способ определения концентрации бактерий в суспензии. А.с. СССР 1231077., опубл. 15.05.1986. Бюл. 18.
4. Пучков Е.О. Методы определения содержания и жизнеспособности микроорганизмов. Биотехнол. 1988; 4(1):132–42.
5. Пучков Е.О., Говорунов И.Г., Евтодченко Ю.В., Косарев Н.В. Действие шока, вызванного низкой температурой, и внеклеточного образования льда на внешнюю и цитоплазматическую мембраны *E. coli* K-12. Микробиол. 1983; 52(1):136–9.
6. Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
7. Тихонравов В.В., Агеев В.А., Ковтун В.П., Ковтун А.Л., Шведов В.В. Способ определения количества бактерий в биопрепарате. Патент России 2117291, опубл. 10.08.1998. Бюл. 22.
8. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. Microbiol. Rev. 1996; 60:641–96.
9. Greenstock C.L., Ruddock G.W. Interaction of ethidium bromide with DNA as studied by kinetic spectrophotometry. Chemico-Biological Interactions. 1975; 11(5):441–7.
10. Martins M., Viveiros M., Couto I., Costa S.S., Pacheco T., Fanning S. et al. Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. In Vivo. 2011; 25:171–8.
11. Puchkov E., Melkozernov A. Fluorimetric assessment of *Pseudomonas fluorescens* viability after freeze-thawing using ethidium bromide. Lett. Appl. Microbiol. 1995; 21:368–72.
12. Viveiros M., Martins A., Paixão L., Rodrigues L., Martins M., Couto I. et al. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. International Journal of Antimicrobial Agents. 2008; 31:458–62.

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

1. Govorunov I.G., Kosarev N.B., Evtodienko Yu.V., Puchkov E.O. [Permeability of the membranes of the *Escherichia coli* envelope for ethidium bromide]. Mikrobiologia. 1982; 51(5):731–4.
2. Irkhin A.I., Kondrashenko T.N., Puchkov E.O. [Sensitivity of *Escherichia coli* cell membranes to various classes of detergents]. Mikrobiologia. 1989; 58(2):217–21.
3. Kosarev N.V., Puchkov E.O. [Methods for the Measurement of Bacterial Concentration in Suspension]. SU Inventor Certificate 1231077.
4. Puchkov E.O. [Methods for the assessment of the presence and viability of microorganisms]. Biotechnologia. 1988; 4(1):132–42.
5. Puchkov E.O., Govorunov I.G., Evtodienko Yu.V., Kosarev N.B. [Effect of low temperature shock and extracellular ice formation on the external and cytoplasmic membranes of *Escherichia coli* cells]. Mikrobiologia. 1983; 52(1):136–9.
6. Sanitary Regulations “Safety work with microorganisms of pathogenicity (risk) groups I–II” SR 1.3.1285-03. Bull. Norm. Metod. Doc. Gossanepidnadzora. 2003; 3(13):61–144.
7. Tikhonravov V.V., Ageev V.A., Kovtun V.P., Kovtun A.L., Shvedov V.V. [The method for assessment of the number of bacteria in biological preparation]. RF Patent 02117291.

Authors:

Govorunova V.A., Govorunov I.G., Firsova V.V., Zyrina E.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Говорунова В.А., Говорунов И.Г., Фирстова В.В., Зырина Е.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 11.05.11.

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

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ
VIBRIO CHOLERAЕ БИОВАРА ЭЛЬТОР**

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

В работе определена продукция холерного токсина у измененных вариантов эльтор вибрионов, содержащих ген *ctxB* классического типа, выделенных на территории России с 1993 по 2010 год, и изучены их генетические свойства, связанные с продукцией этого фактора патогенности. Установлено, что измененные варианты синтезируют в 10–20 раз больше холерного токсина по сравнению с типичными эльтор вибрионами. При этом не обнаружено изменений в промоторной области оперона *ctxAB*, но установлено, что в отличие от типичных штаммов, содержащих одну копию профага СТХф, 90 % изученных измененных вариантов имели в геноме две копии профага СТХф. Несмотря на повышенное количество копий профага СТХф, выявленные различия в синтезе холерного токсина в большей степени могут быть обусловлены изменением транскрипционной активности регуляторных генов, что приводит к активной продукции холерного токсина измененными вариантами в нетипичных для эльтор вибрионов условиях.

Ключевые слова: измененные варианты *V. cholerae* биовара эльтор, продукция холерного токсина, копияность генов *ctxAB*, секвенирование промоторной области.

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

Phenotypic and Genetic Analysis of Altered Variants of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Determined is cholera toxin production by altered *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, isolated on the territory of Russia in 1993–2010, which contain classical type *ctxB* gene. Studied are their genetic characteristics related to the production of this virulence factor. Determined is that altered eltor variants yield 10 to 20 times more cholera toxin than typical eltor strains. Changes in promoter region of *ctxAB* operon are not detected but elucidated is that 90 % of studied altered strains contain two copies of CTXφ prophage in their genome whereas typical strains carry one copy of CTXφ prophage. Despite the higher copy number of CTXφ prophage, the identified differences in production of cholera toxin can be associated mostly with a change of transcriptional activity of regulatory genes. That causes the active production of cholera toxin by the altered variants of *Vibrio cholerae* eltor in non typical environment.

Key word: altered variants of *V. cholerae* biovar eltor, production of cholera toxin, copy number of *ctxAB* genes, sequencing of promoter region.

Эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы по ряду фенотипических и генетических свойств подразделяются на два биовара – классический и эльтор. Штаммы холерного вибриона классического биовара были, видимо, возбудителем первых шести пандемий холеры. Возбудителем текущей, 7-й, пандемии холеры являются токсигенные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор [1, 9]. В ходе развития 7-й пандемии в эндемичных по холере районах начиная с 1991 г. появились генетически измененные токсигенные штаммы холерного вибриона биовара эльтор, получившие обозначение измененные варианты [14]. К настоящему времени измененные варианты *V. cholerae* биовара эльтор вытеснили типичные штаммы этого возбудителя во многих эндемичных по холере районах и начиная с 1993 г. стали причиной локальных вспышек или спорадических случаев холеры на территории Российской Федерации [5, 15].

Одним из основных факторов патогенности *V. cholerae* является холерный токсин (ХТ), кодируемый генами *ctxAB*, расположенными в профаге СТХф, интегрированным в хромосому. Холерные вибрионы классического биовара продуцируют ХТ

классического типа (ХТ1), в то время как типичные штаммы эльтор вибрионов синтезируют ХТ эльтор типа (ХТ2). Эти два типа токсинов различаются по аминокислотной последовательности их иммуногенных В субъединиц и соответственно по нуклеотидной последовательности генов *ctxB*, кодирующих их биосинтез. В отличие от типичных штаммов измененные варианты продуцируют ХТ классического типа, что обусловлено присутствием в геноме их профага СТХф гена *ctxB* классического типа [14].

Согласно литературным данным измененные варианты холерного вибриона являются более вирулентными по сравнению с типичными изолятами [7, 15]. Причины повышенной вирулентности измененных вариантов пока не совсем ясны. В этой связи представлялось, в частности, интересным оценить продукцию ХТ измененными вариантами в условиях *in vitro*, а также определить копияность генов *ctxAB*, входящих в состав профага СТХф, и изучить структуру их оперона.

Цель данной работы состояла в проведении сравнительного анализа продукции ХТ типичными и измененными вариантами *V. cholerae* эльтор биовара, выделенными на территории России, и изучении их

генетических свойств, связанных с продукцией этого фактора вирулентности.

Материалы и методы

В работе было использовано 23 штамма измененных вариантов и 11 типичных штаммов *V. cholerae* эльтор биовара, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий. Для культивирования бактерий использовали агар LB (pH 7,6). Определение биовароспецифических свойств осуществляли согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [3].

Синтез холерного токсина изучали с помощью иммунофемонтного анализа GM₁ ELISA [16]. Для детекции ХТ штаммы выращивали в двух разных условиях: оптимальных для продукции ХТ классическими вибрионами – бульон LB (pH 6,8) с 66 моль NaCl при температуре 30 °С с аэрацией [13] и эльтор вибрионами – бульон АК1 (1,5 % Бакто пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта, 0,5 % NaCl, 0,3% NaHCO₃), pH 7,6, при температуре 37 °С [8].

Для изучения генетической организации сравниваемых штаммов использовали блот-гибридизацию по Саузерну, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование. Выделение ДНК, ДНК-ДНК гибридизацию осуществляли по методам, описанным в пособии по молекулярному клонированию [4]. Для определения количества гептапептидных последовательностей (TTTTGAT) в промоторной области *ctxA* проводили секвенирование на приборе «ABI RPISM® 3100 Genetic Analyzer» (США), получая предварительно ампликоны на приборе «Терцик» (Россия) с использованием рассчитанного в данной работе прямого p1-5'-TGCCTAACAATCCCGTCTGAGTTC-3' и обратного p2-5'-ATGGGCGACAGGTCATCACATTAC-3' праймеров. Температура отжига праймеров составляла 60 °С, размер получаемого ампликона – 578 п.н. Выравнивание и сравнение секвенированных нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе «Mega4».

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы был проведен фенотипический анализ изучаемых штаммов для определения их биовара. В результате установлено, что измененные варианты обладают всеми признаками, характерными для *V. cholerae* биовара эльтор – лизируются до ДРТ диагностическим холерным бактериофагом эльтор, но не лизируются классическим, растут на агаре с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В и образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра.

Повышенная вирулентность измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор, содержащих ген *ctxB* классических вибрионов, может быть обусловлена более высоким уровнем биосинтеза ими ХТ по сравнению с типичными штаммами этого возбудителя. В этой связи нами впервые был проведен срав-

нительный анализ продукции ХТ генетически измененными и типичными штаммами холерных эльтор вибрионов, выделенными на территории России с 1970 по 2010 год. Известно, что оптимальные условия для продукции ХТ токсигенными штаммами двух биоваров неодинаковы, что определяется различиями в регуляторных системах, контролирующих экспрессию структурных генов холерного токсина классических или эльтор вибрионов. Как известно, у холерных вибрионов двух биоваров основными регуляторными белками являются белки ToxR и ToxT. Разница в регуляции синтеза этих белков заключается в том, что хотя холерные вибрионы обоих биоваров при культивировании их в стандартных лабораторных условиях (LB-бульон, 30 °С) образуют одинаковое количество регуляторного белка ToxR, непосредственно участвующего в активации транскрипции генов *ctxAB*, но только у классических вибрионов в этих условиях происходит синтез второго регуляторного белка ToxT, являющегося транскрипционным регулятором многих генов, в том числе и генов холерного токсина [6]. Однако до сих пор нет полных сведений об уровне экспрессии гена *ctxB* классического типа в новом генетическом окружении, а именно, в клетках *V. cholerae* биовара эльтор. На этом основании мы определили уровень продукции ХТ изучаемыми штаммами (23 измененных вариантов и 11 типичных изолятов) при выращивании их в двух разных условиях: оптимальных для биосинтеза этого белка *V. cholerae* классического биовара (LB-бульон, pH 6,8, 30 °С, 18 ч с аэрацией) и оптимальных для продукции ХТ *V. cholerae* биовара эльтор (АК1 бульон, pH 7,6, 37 °С, 4 ч без аэрации, 16 ч с аэрацией).

Оказалось, что штаммы измененных вариантов, выделенные в разные годы и в разных регионах, продуцировали значительно больше ХТ (0,1–1,2 мкг/мл) по сравнению с типичными штаммами (0,01–0,03 мкг/мл). При этом установлено, что 13 изолятов из 23 изученных, или 57 % синтезировали больше ХТ в LB бульоне при 30 °С, т.е. в условиях оптимальных для продукции этого белка классическими штаммами (таблица). Можно предположить, что с приобретением нового гена *ctxB* классического типа у эльтор вибрионов появилась способность образовывать в стандартных лабораторных условиях белок ToxT, независимо от экспрессии белка ToxR. Вместе с тем было обнаружено 6 штаммов – M1272 (Краснодар, 1993), M1270 (Татарстан, 1993), M1269 (Магнитогорск, 1994), M1295 (Дагестан, 1994), M1328 (Дагестан, 1998), Л4150 (Москва, 2010), продукция ХТ у которых не зависела от среды выращивания, а также 4 штамма – M1299 (Краснодар, 1993), M1275 (Дагестан, 1993), M1268 (Магнитогорск, 1994), Л3226 (Москва, 2010), которые в 4–10 раз более активно синтезировали ХТ при культивировании в среде АК1 по сравнению с LB бульоном (таблица). Причина таких различий в экспрессии генов *ctxAB* между изученными штаммами пока не известна.

Продукция холерного токсина и генетические свойства измененных и типичных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор

Штамм <i>V. cholerae</i>	Место и год выделения	Продукция ХТ, мкг/мл		Генетические свойства	
		AKI	LB	Кол-во копий профага CTXφ	Число повторов TTTTGAT*
569В классического биовара	Индия, 1950	2,0	9,0	2	8
<i>Измененные варианты эльтор биовара</i>					
M1264	Краснодар, 1993	0,03	0,6	н/о	4
M1272**	Краснодар, 1993	0,2	0,3	2	н/о
M1297	Дагестан, 1993	0,01	0,4	н/о	н/о
M1266	Пермь, 1994	0,03	0,5	н/о	4
M1293	Дагестан, 1994	0,02	0,1	2	4
M1268**	Магнитогорск, 1994	0,04	0,01	2	н/о
P17644	Ачинск, 1997	0,03	0,4	н/о	3
P17647	Ачинск, 1997	0,01	0,1	н/о	3
M1326	Дагестан, 1998	0,04	0,8	н/о	н/о
M1344	Казань, 2001	0,1	0,8	н/о	4
M1345	Казань, 2001	0,04	1,2	2	4
M1349	Казань, 2001	<0,01	0,9	н/о	4
M1429	Башкирия, 2004	0,01	0,5	2	4
M1430	Тверь, 2005	0,1	1,3	2	4
P18899	Мурманск, 2006	0,01	0,8	1	4
L3226	Москва, 2010	0,4	0,1	2	5
L4150	Москва, 2010	0,4	0,3	2	5
<i>Типичные штаммы эльтор биовара</i>					
M818	Саратов, 1970	0,03	0,02	1	4
M736	Пермь, 1970	0,03	0,02	н/о	4
M738	Пермь, 1970	0,03	0,03	н/о	4
M887	Астрахань, 1970	<0,01	<0,01	1	н/о
M888	Астрахань, 1970	<0,01	<0,01	1	н/о
M890	Астрахань, 1970	0,1	0,01	1	н/о
M1011	Башкирия, 1972	0,03	0,02	н/о	4
M1013	Башкирия, 1972	0,02	0,02	н/о	4
M641	Астрахань, 1975	0,1	0,02	1	н/о
C402	Ставрополь, 1990	0,03	0,01	н/о	4
C447	Ставрополь, 1990	<0,01	<0,01	н/о	4

* Число tandemных повторов TTTTGAT в промоторной области оперона *ctxAB*, участвующих в регуляции синтеза холерного токсина.

** Другие штаммы с аналогичными свойствами не приведены; н/о – не определяли.

Можно лишь предположить, что более эффективный синтез ХТ рядом штаммов измененных вариантов в среде АКІ может быть следствием дополнительных изменений в нуклеотидной последовательности гена *ctxB*. Так, известно, что в нуклеотидной последовательности гена *ctxB* штаммов (L3226, L4150), изолированных в 2010 г. в Москве, помимо 2 известных однонуклеотидных замен в положении 115 (Т/С) и 203 (Т/С), характерных для классических вибрионов, присутствует новая мутация, а именно, в положении 58 цитозин заменен на аденин (С/А) [5]. В целом полученные нами результаты о повышенном синтезе ХТ измененными вариантами, по сравнению с типичными штаммами, согласуются с данными зарубежных исследователей [7].

Итак, анализируя полученные эксперименталь-

ные данные можно предположить, что различия в продукции ХТ между типичными и генетически измененными штаммами могут быть обусловлены разной регуляцией синтеза этого фактора вирулентности, которая, как известно, осуществляется за счет нескольких механизмов. Во-первых, количество вырабатываемого ХТ зависит от копийности оперона *ctxAB*, локализованного в геноме профага СТХφ. Известно, что холерные вибрионы эльтор характеризуются большим разнообразием относительно числа копий оперона *ctxAB*. По данным литературы, более 70 % изученных типичных штаммов содержали в хромосоме одну копию этого оперона, а при увеличении числа копий оперона *ctxAB* продукция ХТ возрастала [11]. Референс-штамм *V. cholerae* N16961 эльтор биовара также содержит одну копию профага СТХφ. Во-вторых, большая роль

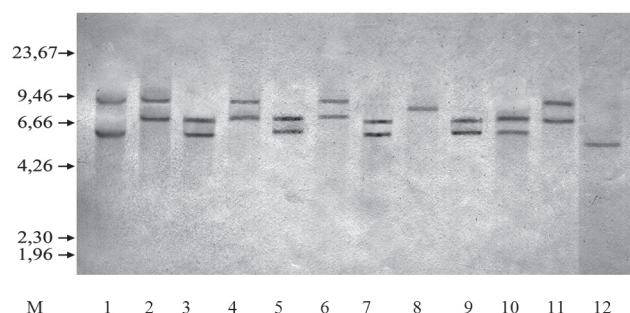


Рис. 1. Блот-гибридизация хромосомной ДНК генетически измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор с СТ-зондом:

М – HindIII – рестрикты ДНК фага λ , взятые в качестве маркеров. Измененные варианты *V. cholerae*: 2 – M1272; 3 – J4150; 4 – M1270; 5 – M1429; 6 – M1268; 7 – J3226; 9 – M1345; 10 – M1430; 11 – M1293; 12 – P18899. Контроли: 1 – *V. cholerae* 569В классического биовара; 8 – *V. cholerae* M818 эльтор биовара

в регуляции синтеза ХТ принадлежит tandemно повторяющимся последовательностям TTTTGAT, расположенным на расстоянии 76 п.н. от начала транскрипции гена *ctxA*. В разных штаммах количество этих повторов изменяется от 3 до 8. При этом 8 раз эта последовательность повторена перед обеими копиями *ctxAB* оперона в хромосоме только высокотоксигенного штамма классического биовара *V. cholerae* 569В [11]. В-третьих, имеются дополнительные регуляторные гены, продукты которых также влияют на уровень биосинтеза ХТ.

В этой связи, на первом этапе работы с помощью блот-гибридизации по Саузерну впервые было определено количество копий оперона *ctxAB* в хромосоме 10 штаммов измененных вариантов. В качестве зонда использовали полученный с помощью ПЦР ампликон гена *ctxA* размером 564 п.н. Этот зонд, меченный дигоксигенином, был обозначен как СТ. Хромосома изучаемых штаммов фрагментировалась с помощью эндонуклеазы рестрикции PstI. В результате установлено, что в хромосоме 9 штаммов присутствовало две копии оперона *ctxAB*. Поскольку каждая копия оперона *ctxAB* локализована в геноме одного профага СТХф, то полученные данные свидетельствуют о том, что указанные штаммы содержат по две копии этого профага. При этом было обнаружено две группы штаммов, различающиеся величиной PstI-фрагментов, гибридизующихся с СТ-зондом. Первая группа состояла из 4 штаммов (M1272, M1270, M1268, M1293), выделенных до 2001 г., обе копии профага СТХф у которых входили в состав двух фрагментов размером 9,0 т.п.н. и 7,0 т.п.н. (рис. 1, дорожки 2, 4, 6, 11). Это означает, что одна из копий профага этих штаммов расположена в том же хромосомном фрагменте размером 9,0 т.п.н., что и одна из двух копий профага СТХф у штамма 569В классического биовара (рис. 1, дорожка 1). Возможно, у названных штаммов измененных вариантов данная копия профага СТХф локализована также на малой хромосоме, как и у холерных вибрионов классического биовара. Хотя это предположение нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении, местоположение двух

копий профага СТХф на 2 разных хромосомах у ряда штаммов измененных вариантов уже доказано рядом зарубежных исследователей [10]. Что касается второй группы, то она состояла из 5 штаммов (M1345, M1429, M1430, J3226, J4150), у которых две копии профага СТХф локализованы на PstI-хромосомных фрагментах размером 7,0 т.п.н. и 5,4 т.п.н. (рис. 1, дорожки 3, 5, 7, 9, 10). Такое местоположение СТХф характерно для ряда типичных холерных вибрионов эльтор, у которых обе копии профага расположены на большой хромосоме в непосредственной близости друг от друга [2, 11]. В то же время штамм *V. cholerae* P18899, выделенный в 2006 г. в Мурманске, имел одну копию оперона *ctxAB* с молекулярной массой 5,4 т.п.н. (рис. 1, дорожка 12).

Таким образом, на основе анализа данных блот-гибридизации с СТ зондом установлено, что в отличие от типичных штаммов холерных вибрионов эльтор, штаммы измененных вариантов в 90 % случаев содержали в геноме две копии профага СТХф, что, возможно, способствует повышению биосинтеза ХТ. Однако, учитывая обнаружение штаммов, продуцирующих повышенное количество ХТ, но содержащих одну копию СТХф (*V. cholerae* P18899), вполне вероятно, что существуют иные механизмы, участвующие в данном процессе.

Второе возможное объяснение повышенной продукции ХТ у измененных вариантов могло состоять в том, что внедрение в их хромосому гена *ctxB* классического типа сопровождалось увеличением числа копий tandemных повторов TTTTGAT в промоторной области оперона *ctxAB*. Для проверки этого предположения нами была секвенирована промоторная область оперона *ctxAB*, находящаяся между генами *zot* и *ctxA*, у 13 измененных и 7 типичных штаммов. Как известно, холерные вибрионы классического биовара содержат в промоторной области от шести до восьми копий гептаповторов (TTTTGAT), которые расположены в tandemном порядке и являются сайтами связывания с регуляторным белком ToxR, увеличивающим сходство промотора с РНК-полимеразой. В то же время эльтор вибрионы имеют от трех до четырех данных копий. Повышенное содержание гептаповторов в геноме классических вибрионов является одной из причин более эффективного синтеза ХТ по сравнению с вибрионами эльтор [12]. В результате было установлено, что у большинства штаммов (9 из 13 изученных) в промоторной области оперона *ctxAB* содержится четыре копии гептаповторов (рис. 2, таблица). Это означает, что исследованные штаммы измененных вариантов не отличались по этому свойству от типичных штаммов, включая референс-штамм *V. cholerae* N16961. Лишь два штамма, выделенные в Ачинске в 1997 г., содержали три таких повтора. В то же время следует особо отметить тот факт, что в отличие от всех других изученных нами и описанных другими исследователями штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, два штамма измененных вариантов, выделенные в 2010 г., несли 5

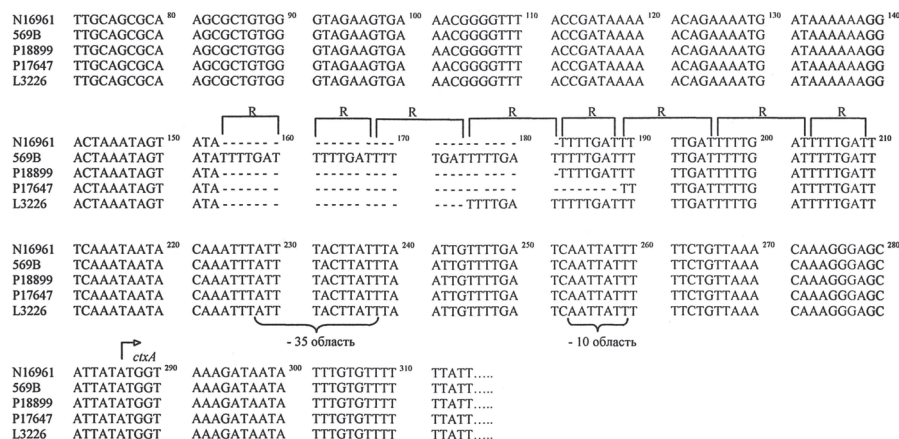


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности промоторной области штаммов *V. cholerae*:

На рисунке обозначены TTTTGAT повторы (R), являющиеся сайтами связывания с регуляторным белком ToxR, а также -10 и -35 области. N16961 – референс-штамм эльтор биовара (последовательность взята из GenBank); 569B – штамм *V. cholerae* классического биовара; P18899 и L3226 – измененные варианты эльтор биовара

копий нуклеотидной последовательности TTTTGAT. Однако такая структурная организация промоторной области оперона *ctxAB* не влияла на уровень синтеза ХТ этими изолятами, у которых продукция этого белка не отличалась от других измененных вариантов (рис. 2, таблица). Следовательно, маловероятно, что повышенная продукция ХТ измененными вариантами *V. cholerae* биовара эльтор связана с копийностью изучаемых регуляторных элементов.

Таким образом, нами впервые получены данные о продукции ХТ измененными вариантами *V. cholerae* биовара эльтор, выделенными на территории России, количестве копий профага СТХФ, а также о нуклеотидной последовательности промоторной области их *ctxAB*-оперонов. Обнаружено, что измененные варианты действительно продуцируют заметно больше ХТ, чем типичные штаммы возбудителя холеры эльтор. При этом внедрение нового гена *ctxB* в геном профага СТХФ у большинства клонов сопровождается, видимо, изменением транскрипционной активности регуляторных генов, что приводит к активной продукции ХТ в нетипичных для холерных вибрионов эльтор условиях культивирования.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25.07.2011 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)» и гранту РФФИ № 09-04-00217-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 256 с.
2. Гинцбург А.Л., Янишевский Н.В., Мотин В.Л., Шагинян И.А., Вертеев Ю.В., Смирнов Г.Б. Организация и клонирование структурных генов энтеротоксина *Vibrio cholerae* eltor RV79. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1984; 9:12–8.
3. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания МУК 4.2.2218-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 87 с.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
5. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 3:11–8.
6. Di Rita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of

Vibrio cholerae is due to biotype-specific control over *toxT* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93(15):7991–5.

7. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H. et al. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. J. Clin. Microbiol. 2010; 48(11):4283–6.
8. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30(11):1075–83.
9. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(1):48–89.
10. Lee J.H., Choi S.Y., Jeon Y.S., Lee H.R., Kim E.J., Nguyen B.M. et al. Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure. J. Microbiology. 2009; 47(6):783–8.
11. Mekalanos J.J. Duplication and amplification of toxin genes in *Vibrio cholerae*. Cell. 1983; 35(1):253–63.
12. Mekalanos J.J., Swartz D.J., Pearson G.D.N., Harford N., Groyne F., de Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature. 1983; 306:551–7.
13. Miller V.L., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J. Bacteriol. 1988; 170(6):2575–83.
14. Nair G. B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Saha A., Bhuiyan N.A. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:4211–3.
15. Saha A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol. 2010; 18(1):46–54.
16. Svennerholm A.M., Wiklund G. Rapid GM-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 1983; 17(4):596–600.

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

1. Baroyan O.V. [Cholera El Tor]. M.: Meditsina; 1971. P. 256.
2. Gintsburg A.L., Yanishevsky N.V., Motin V.L., Shaginyan I.A., Vertiev Yu.V., Smirnov G.B. [Arrangement and cloning of *Vibrio cholerae* El Tor RV79 structure genes of enterotoxin]. Mol. Genet. Microbiol. Virusol. 1984; 9:12–8.
3. Laboratory diagnostics of cholera. MUK 4.2.2218-07. M.; 2007. 87 p.
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Molecular Cloning: A Laboratory Manual]. M.: Mir; 1984. 480 p.
5. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovskiy Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains emerging in Russian Federation during 7th cholera pandemic]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 3:8–11.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 01.09.11.

Е.В.Монахова¹, Г.М.Федоренко², А.Б.Мазрухо¹, Р.В.Писанов¹, В.Д.Кругликов¹, О.В.Маркина¹,
Л.П.Алексеева¹

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИТОТОНИЧЕСКОГО ФАКТОРА CEF ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

¹ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский противочумный институт»,

²Южный Научный Центр РАН, Ростов-на-Дону

Изучены морфологические, физиологические и ультраструктурные изменения в культуре клеток L-929 и кишечнике мышей-сосунков под действием препарата Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов. В культуре происходило удлинение клеток, вакуолизация их цитоплазмы, увеличение числа лизосом, ретракция и деформация ядер. *In vivo* Cef вызывал статистически достоверное накопление жидкости. При электронно-микроскопическом исследовании эпителиоцитов тонкого кишечника наблюдалось образование вакуолей и миелиноподобных структур в цитоплазме и ядрах, набухание митохондрий, просветление их матрикса и деструкция крист. В криптах отмечалось скопление слизи. Вовлечение в процесс тучных клеток приводило к усугубляющему дегидратацию повышению проницаемости капилляров. Эти изменения свидетельствуют об участии Cef в проявлении холерными вибрионами патогенных свойств.

Ключевые слова: CHO cell elongating factor, холерный вибрион, культура клеток, тонкая кишка, ультраструктура.

E.V.Monakhova¹, G.M.Fedorenko², A.B.Mazrukho¹, R.V.Pisanov¹, V.D.Kruglikov¹, O.V.Markina¹,
L.P.Alekseeva¹

Study of Biological Effect of CHO-Cell Elongating Factor of *Vibrio cholerae* on Models *in vitro* and *in vivo*

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, ²Southern Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don

Studied were morphological, physiological and ultrastructural changes in the cell culture L-929 and in the intestine of suckling mice in the presence of Cef (CHO cell elongating factor) of *Vibrio cholerae*. Registered were cellular elongation, cytoplasm vacuolization, an increase in the number of lysosomes, retraction and nuclei deformation in the L-929 cell culture. Statistical significance test confirmed that *in vivo* Cef caused the accumulation of fluid in suckling mice. Electron microscopy of the epithelial cells of small intestine revealed vacuolization and myelin-like structures formation in cytoplasm and nuclei, swelling of mitochondria, clarification of their matrix and destruction of cristae. Cristae were filled with mucus. The involvement of mast cells caused the increasing of capillary permeability which enhanced dehydration. These changes confirmed Cef participation in manifestation of *Vibrio cholerae* pathogenic properties.

Key words: CHO cell elongating factor, *Vibrio cholerae*, cell culture, small intestine, ultrastructure.

Cef (CHO cell elongating factor), идентифицированный В.А. McCardell *et al.* [4, 5], относится к числу малоизученных предполагаемых факторов вирулентности холерных вибрионов. Ранее мы сообщали о клонировании гена *cef* *Vibrio cholerae* в плазмидном векторе pBAD18 и его экспрессии в *E. coli* под контролем P_{BAD}-промотора [2, 3]. Осветленные ультразвуковые дезинтеграторы рекомбинантных штаммов кишечной палочки обладали всеми свойствами, описанными в литературе для Cef, выделенного из культуральной жидкости *V. cholerae*, а именно эстеразной активностью, способностью вызывать удлинение клеток CHO и L-929, а также накопление жидкости в кишечнике мышей-сосунков [4, 5, 6]. Эти данные свидетельствовали о возможности использования рекомбинантных штаммов *E. coli*, содержащих клонированный ген *cef*, в качестве продуцентов искомого белка с целью выделения его препаратов, необходимых для выяснения значимости Cef в патогенезе холеры, особенно вызываемой нехолерогенными штаммами. Механизм действия Cef на эукариотические клетки не изучен. Известно лишь то, что он отличен

от такового холерного токсина (СТ), поскольку в обработанных Cef удлинённых клетках CHO не было выявлено повышения уровней цАМФ и простагландина E₂ [4, 5]. Получению ответов на поставленные вопросы могут способствовать дальнейшие исследования биологического действия Cef на лабораторных моделях, в том числе электронно-микроскопические, которые до настоящего времени не проводились.

Целью настоящей работы явилось изучение морфологических, физиологических и ультраструктурных изменений в культуре клеток L-929 и тонкой кишке мышей-сосунков при действии препарата Cef холерных вибрионов.

Материалы и методы

В качестве продуцента Cef *V. cholerae* классического биовара был использован сконструированный нами рекомбинантный штамм *E. coli* Jm103pCef69B [2, 3]. Нарращивание биомассы с индукцией арабинозой проводили как описано ранее [2]. Препарат выделяли из 2 г сырой бактериальной массы, раз-

рушенной ультразвуком в 50 мл лизис-буфера (8 М мочевины, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0). Полученный лизат доводили до 200 мл дистиллированной водой, осветляли центрифугированием при 15000 об./мин в течение 20 мин, насыщали сульфатом аммония (СА), pH 8,0, до 50 % и инкубировали в течение 12 ч при 4 °С. Осадок отделяли центрифугированием при 15000 об./мин в течение 20 мин и растворяли в буфере для гель-фильтрации (200 мМ СА, 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 1 % изопропанол, pH 8,0). Раствор наносили на колонку для гель-фильтрации HW-55F (Farmacia). Ферментативную активность фракций определяли в лунках агар, содержащего твин 20 или трибутирин как описано ранее [2]. Активные фракции объединяли, уравнивали буфером (50 мМ СА, 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, 1 % изопропанол, pH 8,0) и наносили на колонку для ХОФ (хроматография в обращенной фазе) с Butil-Toyoparl 650 M (Toysoda). Элюцию вели снижающимся градиентом СА от 50 мМ до 0. Активные фракции объединяли, концентрировали и прогревали при 56 °С в течение 60 мин, после чего осаждали центрифугированием денатурированные балластные белки и собирали прозрачный супернатант. Препарат проверяли на эстеразную активность, степень его очистки контролировали электрофоретически.

Для оценки биологической активности *Cef in vitro* использовали культуру клеток подкожной соединительной ткани мыши L-929 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), поскольку наши предшествующие исследования показали, что в этой культуре удлинение клеток под действием *Cef* выражено более четко по сравнению с СНО [2]. Количественное определение активности проводили в 96-луночных пластиковых планшетах как описано ранее [2], для электронно-микроскопического исследования клетки выращивали в пластиковых флаконах (матрасиках) до образования плотного монослоя в среде RPMI-1640 (Sigma) с 10 % сыворотки плода коровы в течение 1–2 сут. Непосредственно перед опытом полную ростовую среду заменяли на свежую, содержащую 1 % сыворотки и 100 мкг/мл гентамицина. Испытуемый препарат добавляли к культурам до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в CO₂-инкубаторе (Sanjo) при 37 °С в течение суток. Морфологическое изучение культур проводили с помощью инвертированного микроскопа (Reichert). Для фотографирования клетки фиксировали формальдегидом и окрашивали по Романовскому-Гимза.

Для изучения биологической активности *in vivo* мышам-сосункам 4–5-дневного возраста вводили ректально по 10 мкг препарата в 100 мкл 10 Мм трис-HCl (pH 7,5), контрольным – по 100 мкл того же буфера без *Cef*. Опытная и контрольная группы включали по 10 животных каждая. Через 5 ч мышей умерщвляли хлороформом и определяли FA±SD (отношение веса ЖКТ к весу тела ± стандартное отклонение). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Primer of Biostatistics v.4.03.

Для электронно-микроскопического исследования клетки культуры (после удаления культуральной жидкости) и кусочки тонкой кишки мышей-сосунков (по 4 животных, отобранных из опытной и контрольной групп) фиксировали в 2,5 % в растворе глutarового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 20 мин, дофиксировали в 1 % растворе четырехоксида осмия в том же буфере в течение 1,5 ч при 4 °С. После обезвоживания в спиртах восходящей концентрации материал заключали в эпон 812. Срезы, полученные на ультрамикротоме LKB-8800, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Tescna 12 (Philips).

Результаты и обсуждение

Спустя сутки после внесения препарата *Cef* в культуру L-929, выращенную монослоем, в световом микроскопе наблюдалось удлинение клеток (рис. 1, б), отсутствующее в контроле (рис. 1, а), выраженное, однако, немного слабее, чем при тестировании на отдельных клетках [2]. При электронно-микроскопическом исследовании удлинённых клеток наиболее заметными изменениями были вакуолизация цитоплазмы, а также резкое увеличение числа лизосом (рис. 1, г, е). Вакуоли содержали электронно-плотные частицы, представляющие, вероятно, продукты распада, которые выбрасывались

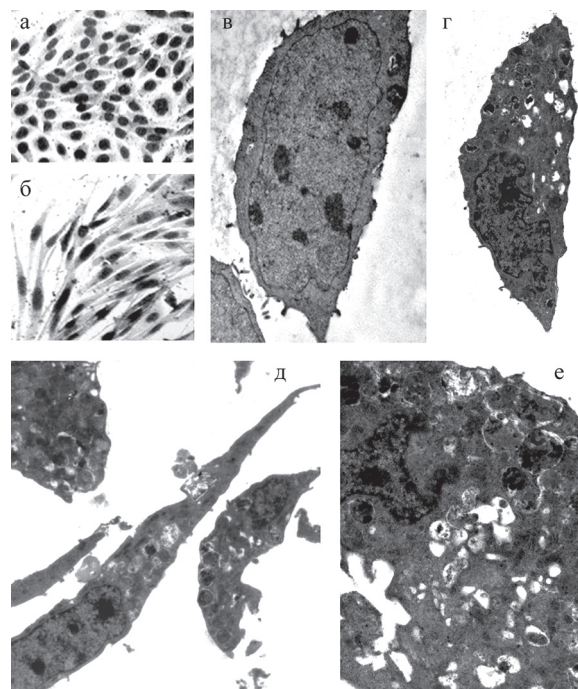


Рис. 1. Морфологические и ультраструктурные изменения в культуре клеток L-929, вызванные действием препарата *Cef*:

а – контрольные клетки; б – обработанные препаратом клетки под световым микроскопом, окраска по Романовскому-Гимза, ×150; в – ультраструктура контрольной клетки, ×8200; г – вакуолизация цитоплазмы, увеличение числа лизосом и смещение ядра на периферию клетки, обработанной *Cef*, ×6000; д – образование вакуолей и освобождение их содержимого через разрывы клеточной стенки, ×4200; е – деформация ядра, вакуолизация цитоплазмы и увеличение числа лизосом, ×11500

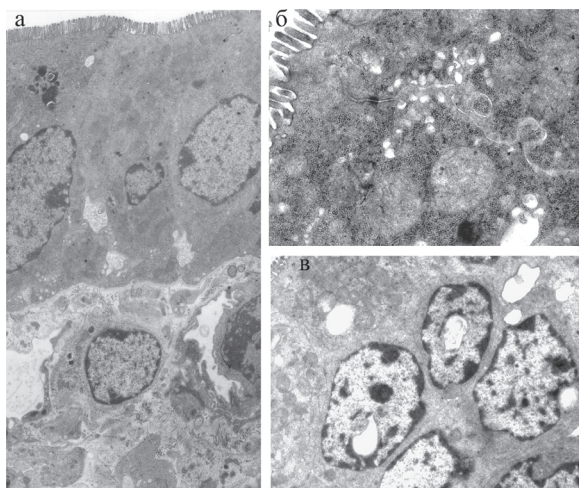


Рис. 2. Ультраструктурные изменения в эпителиоцитах тонкой кишки мышей-сосунков под действием Cef *V. cholerae*:

a – контроль, $\times 3000$; *б* – набухание митохондрий, разрушение их крист, образование в цитоплазме множественных мелких и отдельных крупных вакуолей (некоторые содержат миелоноподобные структуры), $\times 20500$; *в* – вакуоли в цитоплазме, внутри набухших митохондрий и ядер, $\times 6000$

во внеклеточное пространство через разрывы цитоплазматической мембраны (рис. 1, д). Во многих клетках имели место ретракция и деформация ядер либо их смещение на периферию клетки (рис. 1, г, е). Каких-либо заметных изменений со стороны митохондрий выявлено не было (данные не показаны).

Препарат Cef вызывал в кишечнике мышей-сосунков статистически достоверное накопление жидкости. В группах опытных и контрольных животных средние показатели $FA \pm SD$ составляли соответственно $0,078 \pm 0,005$ и $0,059 \pm 0,005$ ($P=0,000$).

При электронно-микроскопическом исследовании тонкого кишечника мышей-сосунков спустя 5 ч после введения препарата Cef наблюдались изменения, отсутствующие в кишечнике контрольных животных (рис. 2, а) и отличные от характерных для действия СТ [1], что косвенно подтверждает данные McCardell B.A. *et al.* [4, 5] о том, что механизм действия Cef отличен от такового СТ.

В эпителиоцитах присутствовали в большом количестве мелкие вакуоли и отдельные более крупные. По-видимому, многие из них представляли собой фаголизосомы, содержащие продукты распада цитоплазмы и клеточных органелл, а также миелоноподобные структуры. Последние также находились в цитоплазме, митохондриях, лизосомах. Происходило набухание митохондрий, просветление их матрикса и деструкция крист. Наблюдалось повреждение ядер, проявляющееся в образовании крупных полостей в кариоплазме (рис. 2, б, в). Несмотря на выраженную вакуолизацию, характерная для действия СТ баллонная дистрофия не развивалась.

Микроворсинки и апикальные мембраны клеток щеточной каймы оставались практически неповрежденными, лишь на отдельных участках имела место частичная деградация микроворсинок и микроклазматоз (рис. 3, а). В криптах отмечалось скопление

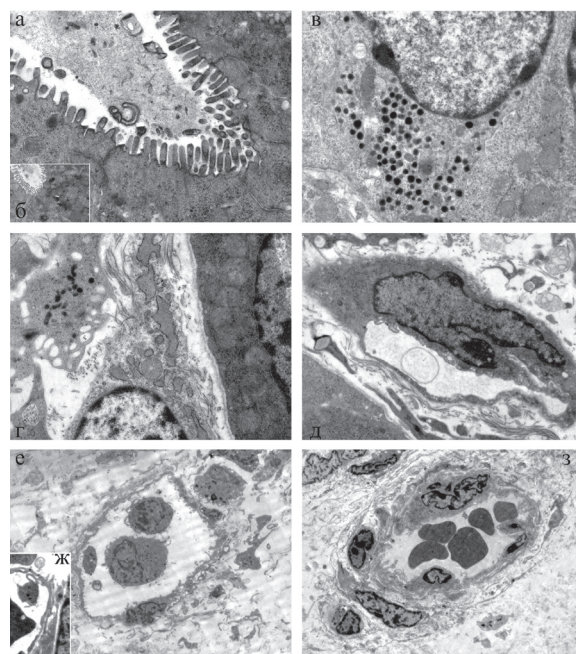


Рис. 3. Ультраструктурные изменения в тонкой кишке мышей-сосунков под действием Cef:

a – частичная деградация микроворсинок и микроклазматоз в щеточной кайме, $\times 16500$; *б* – бокаловидная клетка, освобождающая слизь в просвет крипты, $\times 6000$; *в* – вакуоли и миелоноподобные структуры в Ес-клетке, $\times 9900$; *г* – частичная дегрануляция тучной клетки, $\times 11500$; *д* – пиноцитозные везикулы в стенке капилляра стромы, $\times 8200$; *е* – усиление трансэндотелиального микропиноцитоза и появление микродефектов в эндотелиальной выстилке, $\times 2550$; *ж* – адгезия тромбоцита в участке деструкции капилляра, $\times 2250$; *з* – капилляр контрольного животного, $\times 2250$

слизи (рис. 3, б).

В энтерохромаффинных (ЕС) клетках наряду с электронноплотными гранулами присутствовали гранулы с признаками либерации их содержимого (серотонина, мотилина), однако дегрануляции не происходило. В то же время в цитоплазме наблюдалось образование вакуолей и миелоноподобных структур, что свидетельствовало о серьезных структурно-функциональных нарушениях (рис. 3, в).

Тучные клетки выглядели частично дегранулированными (рис. 3, г), что указывает на умеренное освобождение в строму гормональных веществ, повышающих сосудистую проницаемость (гистамина, гепарина, серотонина). Соответственно, в близлежащих капиллярах наблюдалось усиление микропиноцитоза и появление микродефектов в эндотелиальной выстилке (рис. 3, д, е). Повреждения эндотелия вызывали защитную реакцию – адгезию тромбоцитов в участках деструкции (рис. 3, ж).

Выраженная вакуолизация цитоплазмы свидетельствует о нарушениях водно-электролитного баланса как в культивируемых клетках, так и в эпителии кишечника, что приводит к наблюдаемым внешним изменениям *in vitro* и *in vivo*. По всей вероятности, в том и другом случае они являются следствием обезвоживания клеток. Последнее, в свою очередь, вызывает повреждения внутриклеточных органелл, продукты распада которых перевариваются активизированным лизосомальным аппаратом. На уровне

макроорганизма это обезвоживание усугубляется вовлечением в процесс тучных клеток и, как следствие, дополнительной потерей жидкости через стенки кровеносных сосудов. Предстоит еще выяснить, каким образом, непосредственно или опосредованно, Cef «запускает» процесс начальной вакуолизации, однако его способность вызывать тяжелые повреждения структурных элементов тонкого кишечника определенно указывает на причастность этого фактора к проявлению холерными вибрионами патогенных свойств, что, в первую очередь, относится к нехолерогенным штаммам *V. cholerae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.П., Харланова Н.Г., Монахова Е.В., Винокур Н.И., Бардахчян Э.А. Ультраструктурные изменения в тонкой кишке, вызванные холерогенным и нехолерогенным штаммами вибрионов. Доклады АН. 1997; 352:278–80.
2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В. и др. Клонирование гена цитотонического фактора Cef (CHO-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P_{BAD}-промотора. Биотехнология. 2006; 5:12–8.
3. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Рекombинантная плазмида, экспрессирующая клонированный ген cef (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* (варианты) и штамм *Escherichia coli* – продуцент cef (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* (варианты). Патент РФ 2313577, опубл. 27.12.07. Бюл. 36.
4. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. Microb. Pathogen. 2000; 29(1):1–8.
5. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J. et al. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. Microb. Pathog. 2002; 32:165–72.
6. Sathyamoorthy V., Hall R.H., McCardell B.A., Kothary M., Ahn S.J., Ratnayake S. Purification and characterization of a cytotonic protein expressed *in vitro* by the live cholera vaccine candidate CVD 103-HgR. Infect. Immun. 2000; 68:6062–5.

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

1. Vlasov V.P., Kharlanova N.G., Monakhova E.V., Vinokur N.I., Bardakhch'yan E.A. [Ultrastructural changes in the large intestine, caused by cholera and non-cholera vibrio strains]. Doklady AN. 1997; 352:278–80.
2. Monakhova E.V., Lomov Yu. M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Mironova A.V. et al. [Cloning of the gene of *Vibrio cholerae* CHO-cell elongating factor and its expression under control of P_{BAD} promoter]. Biotechnologia. 2006; 5:12–8.
3. Monakhova E.V., Lomov Yu. M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Verkina L.M., Mironova A.V. [Recombinant plasmid, expressing the cloned cef (CHO cell elongating factor) of *Vibrio cholerae* (variants) and *Escherichia coli* strain – producer of cef (CHO cell elongating factor) of *Vibrio cholerae* (variants)]. RF Patent № 2313577.

Authors:

Monakhova E.V., Mazrukho A.B., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Markina O.V., Alekseeva L.P. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru
Fedorenko G.M. Southern Scientific Centre of Russian Academy of Sciences. Rostov-on-Don.

Об авторах:

Монахова Е.В., Мазрухо А.Б., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru
Федоренко Г.М. Южный Научный Центр РАН. Ростов-на-Дону.

Поступила 17.08.11.

Н.А.Шишкова, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

ВЛИЯНИЕ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ НА НАХОДЯЩИЕСЯ В ПОЧВЕ СПОРЫ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Изучены фенотипические и генетические свойства штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных от дождевых червей через 20 и 30 сут нахождения в инфицированной почве. Установлено, что под влиянием червей происходит снижение количества *Bacillus anthracis* в почве на 30–50 %, но оставшиеся споры не меняют своих свойств и сохраняют все биологические и генетические детерминанты вирулентности.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, дождевые черви, ДНК, ПЦР.

N.A.Shishkova, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

Interaction between Earthworms and Soil-Inhabiting Anthrax Microbe Spores

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Studied are phenotypic and genetic properties of anthrax agent strains, isolated from earthworms retained in infected soil for a period of 20 and 30 days. Discovered is the fact that the presence of worms in the biotope reduces the number of *Bacillus anthracis* spores by 30–50 %. However, the rest of the spores preserve original properties, and biological and genetic virulence dominants.

Key words: *Bacillus anthracis*, earthworms, DNA, PCR.

Попавший в окружающую среду возбудитель сибирской язвы быстро образует спорую форму. В виде споры *B. anthracis* способен к длительному переживанию в почве, создавая стационарно-неблагополучные регионы. В 1887 г. Р. Кох писал: «...споры выживают каким-то невероятным образом. Ни годы засухи, ни существование в течение месяцев в гниющей жидкости, ни чередование засухи и влаги не могут лишить их способности прорасти. Когда эти споры уже образовались, то появляются достаточные предпосылки для сохранения сибирской язвы в течение длительного времени в определенном районе».

Контаминированная почва может оставаться инфицированной многие годы, даже десятилетия. Одним из примеров служит случай сибирской язвы у человека, заразившегося на месте захоронения трупов сельскохозяйственных животных, проведенного более 80 лет назад. Показательна вспышка сибирской язвы в Австралии, возникшая в местности, где заболевания не регистрировались 83 года [11]. Заслуживает внимания сообщение о выделении двух жизнеспособных штаммов возбудителя сибирской язвы из костей животных, найденных при археологических раскопках в Национальном Крюгер-парке (Южная Африка). Радиоуглеродный анализ этих костей показал, что они относятся к животным, погибшим от сибирской язвы 200±50 лет назад [12]. Имеется предположение, что возбудитель сибирской язвы может быть активным через 1300 лет [6].

Находящийся в почве возбудитель сибирской язвы подвергается воздействию различных факторов. Он имеет много антагонистов среди растений и микроорганизмов. Длительное время дискутируется вопрос о роли дождевых червей в санации по-

чвы, инфицированной возбудителем сибирской язвы. Начиная с Л.Пастера считалось, что дождевые черви выносят *B. anthracis* из глубины почвы на ее поверхность. Р.Кох отрицал это заявление Л.Пастера. O.Bollinger [7] проверил данное положение в эксперименте. Автор на пастбищах в Баварских Альпах, где часто встречались заболевания сибирской язвой, добыл 72 червя. Тщательно очистив их, он растер червей в стерильной воде и полученную массу ввел животным (кроликам, морским свинкам и белым мышам). В одном случае получил гибель от сибирской язвы. На основании проведенных исследований был сделан вывод о правильности теории Л.Пастера. В ответ на экстремальные условия среды обитания у дождевого червя сформировалась уникальная иммунная система, которая представлена антибиотической, ферментативной системой, комплексом специфических иммунных клеток и комплементарных белков [4].

В данной работе проведено изучение влияния Калифорнийских дождевых червей на очищение почвы от возбудителя инфекции и свойства микроорганизма.

Материалы и методы

В работе использовали общепринятые материалы и методические приемы работ с возбудителем сибирской язвы [3].

Был использован штамм *B. anthracis* 71/12 (Второй вакцины Ценковского) из коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ-Оболensk»), обладающий генотипом pXO1⁺/pXO2⁺ (Cap⁺ Tox⁺).

Таблица 1

Праймеры, использованные в работе		
Наименование	5'-3' последовательность	Ожидаемый размер фрагмента (п.о.)
F1PxO2	GTCTTCTCGCACTATCAAGGCTCAATG	355
R1PxO2	CTGCATTATTATCAATTGTTATATCAGG	
F1lef	CCCTACACTAATTAACATAACCAAAATTGG	365
R1lef	GCTGTTACTAAACATGACATACTAATTAC	
F1pag	CCTGTGCTTGAACATAATATCGTAGAC	375
R1pag	GTATACAGCATACACAATCTATTGAAGG	
F1edema	CTATAGCCTGTGAGGAGGATATAGCAAATAG	405
R1edema	CAGCTGAACCTTTATCAACTTAGAATCTC	

Культивирование и оценку свойств возбудителя сибирской язвы проводили с использованием плотных и жидких питательных сред: L-агар/бульон (по Лурия-Бертани), МПБ и МПА, а также дифференциально-диагностические питательные среды: среда с сорбитом и бромтимоловым синим [2] и среда с фенолфталеинфосфатом натрия. Определение характера роста на питательных средах проводили визуально или под малым увеличением микроскопа. Обращали внимание на характер колонии на агаре, прозрачность бульона и вид осадка.

Калифорнийские дождевые черви получены из Центра токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов.

Для выделения ДНК использовали методику щелочной денатурации Birnboim и Doly [5]. ДНК выделяли из жидких культур, выращенных в L-бульоне с качанием в течение 16 ч.

Постановка полимеразной цепной реакции. Были использованы пары праймеров, гомологичные участкам нуклеотидных последовательностей плазмид *B. anthracis* (табл. 1). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 10×буфер для ДНК-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва) – 75 мМ трис-HCl (pH 8,8); 20 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween 20; 2,5 мМ 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 °С (3 мин); 30 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С (30 с), отжига при 54 °С (30 с) и элонгации при 72 °С (30 с); завершающая элонгация при 72 °С (5 мин). Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Applied byosystem 2700», США. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле, гель готовили на буфере ТЕА [10]. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием [10]. 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 фрагмент ДНК определенной молекулярной массы.

Определение капсулообразования осуществляли

при выращивании на специальных питательных средах: бикарбонатно-сывороточном агаре, среде ГКИ, среде по Green. Посевы инкубировали при температуре (36±1) °С в условиях повышенного содержания в атмосфере углекислого газа. Капсулообразование в организме определяли просмотром мазков из трупов белых мышей, погибших после заражения споровой суспензией *B. anthracis*.

Для определения величины ЛД₅₀ заражали беспородных белых мышей массой 16–18 г подкожным введением разных доз споровой суспензии – от 10 до 10⁸. Рабочие инфицирующие дозы готовили, исходя из концентрации спор, определяемой по счету в камере Горяева. Правильность приготовления заражающей дозы контролировали высевом каждого разведения на 5 чашек Петри с питательным агаром по 0,1 см³ на каждую чашку. Каждую заражающую дозу вводили 10 белым мышам. За животными наблюдали в течение 8 сут, ежедневно учитывая количество погибших мышей в каждой группе. По результатам гибели экспериментальных животных, инфицированных различными дозами спорowego материала, рассчитывали дозу, вызывающую гибель 50 % животных (величину ЛД₅₀) по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина [1].

Результаты и обсуждение

Калифорнийских дождевых червей в количестве 50 штук помещали в контейнер с землей (около 1 кг). Брали равные навески сухих опилок (по 100 г) и смачивали 10 см³ споровой суспензии *B. anthracis* с концентрацией 3·10⁸ спор/см³. Затем опилки вносили в контейнер с почвой и тщательно перемешивали. В разные временные интервалы из хранившихся контейнеров отбирали небольшие образцы почвы, взвешивали их и добавляли равное по весу количество физиологического раствора. Колбы помещали в шейкер и встряхивали в течение одного часа. Затем отбирали 1 см³ суспензии и титровали методом десятикратных разведений. Из соответствующих разведений делали посев суспензии на чашки с питательным агаром, содержащим полимиксин 100 мкг/см³. С целью выделения сибиреязвенных культур суспензии из проб почвы высевали на дифференциально-

Количество микроорганизмов *B. anthracis* в почве с дождевыми червями

Срок хранения проб почвы, сутки	Количество микроорганизмов в 1 г почвы в пробах				
	1	2	3	4	Среднее
0	$6,0 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$
7	$6,2 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$
14	$6,0 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$7,0 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
28	$4,2 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
42	$4,6 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
56	$3,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$2,8 \cdot 10^6$
63	$4,4 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$
77	$2,9 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^6$
90	$3,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$

диагностические питательные среды. После 24–36 ч инкубирования при температуре $(36 \pm 1)^\circ \text{C}$ подсчитывали количество типичных по морфологии колоний *B. anthracis*, выросших на плотной питательной среде. Полученные результаты представлены в табл. 2.

На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что в присутствии дождевых червей происходит снижение в почве количества сибиреязвенных бацилл (от 30 до 50 %).

Следующим этапом работы явилось изучение свойств сибиреязвенных культур, выделенных от червей на 20-е и 30-е сутки после помещения в инфицированную почву. Готовили 250 г корма (измельченные бананы, яблоки и груши), в него добавляли 25 см^3 споровой суспензии штамма *B. anthracis* 71/12, содержащей $1 \cdot 10^8$ спор/см³. В итоге концентрация спор составила $1 \cdot 10^6$ спор/на 1 г субстрата. Далее этот субстрат переносили в банку с почвой, нанеся его толстым слоем, и сверху вновь насыпали почву слоем 3–4 см. На поверхность почвы помещали калифорнийских червей в количестве 50 шт. Банку накрывали марлей и хранили в темном месте при комнатной температуре. Через 5 дней черви с поверхности полностью переместились в питательный субстрат и перемешали почву с субстратом. Началось активное размножение червей. Через 20 и 30 дней наблюдения отобрали по 5 крупных особей, тщательно отмыли в стерильном физиологическом растворе 5 раз. Червей растерли в стерильных ступках с песком и сделали

высев на дифференциально-диагностическую питательную среду с полимиксином 100 мкг/см^3 . После инкубации посевов при температуре $(36 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 24–48 ч отобрали характерные колонии (рис. 1).

Промывную воду (последнюю порцию) также высевали на чашки с питательной средой для контроля наличия спор сибиреязвенного микроба на поверхности червей. В результате проведенных экспериментов нами выделены культуры *B. anthracis* на 20-е и 30-е сутки после начала эксперимента. Были проверены биологические свойства выделенных культур – характер роста в жидкой и на плотной питательных средах, вирулентность для беспородных белых мышей, выделена ДНК и поставлена ПЦР с видоспецифическими праймерами.

При выращивании на плотных и жидких питательных средах выделенные штаммы проявляли типичные культурально-морфологические признаки (характер роста, морфология колоний и клеток). На агаризованной питательной среде вырастали плоские колонии различной величины, сероватого или серовато-белого цвета, сухие, матовые, шероховатые R и RRO-форм. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдались крупные (от $1,0 \div 1,3$ до $3 \div 10 \text{ мкм}$) грамположительные палочки с обрубленными или слегка закругленными концами, расположенные в цепочках. В жидкой питательной среде рост на дне пробирки отдельными хлопьями или хлопком («комков ваты»), бульон остается прозрачным.

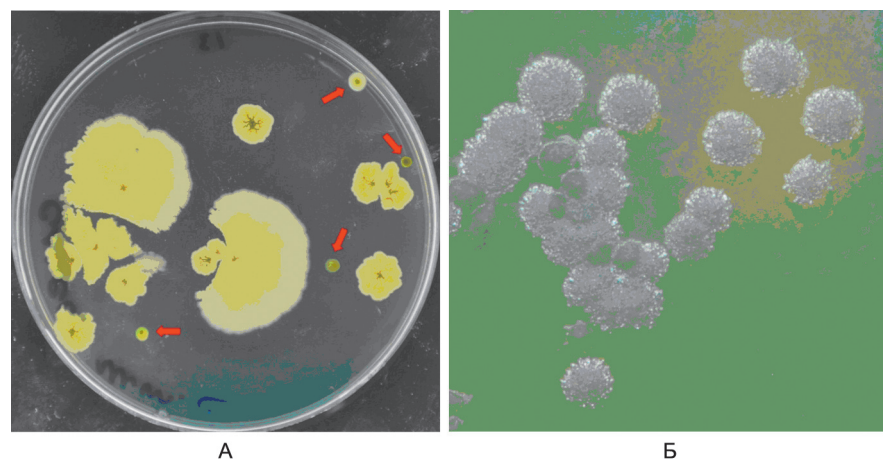


Рис. 1. Рост микроорганизмов на диагностической питательной среде:
А – рост *B. cereus*, *B. subtilis* и *B. anthracis* (отмечены стрелками); Б – колонии *B. anthracis* под малым увеличением микроскопа

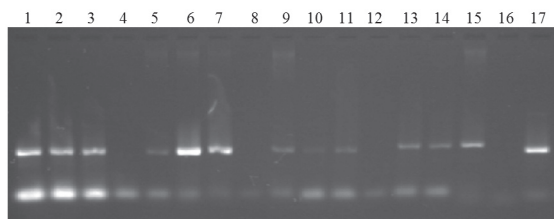


Рис. 2. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймерами на гены патогенности плазмидной локализации:

1–4 – F1P_xO2/R1P_xO2 (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 355 п.о.);
5–8 – F1lef/R1lef (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 365 п.о.);
9–12 – F1pag/R1pag (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 375 п.о.);
13–16 – F1edema/R1edema (ожидаемый размер фрагмента ДНК – 405 п.о.). 1, 5, 9, 13 – ДНК выделена из червей на 20-й день после начала эксперимента; 2, 6, 10, 14 – ДНК выделена из червей на 30-й день после начала эксперимента; 3, 7, 11, 15 – ДНК выделена из исходного штамма 71/12; 4, 8, 12, 16 – отрицательный контроль (вода); 17 – маркер молекулярной массы (фрагмент ДНК 362 п.о.)

Выделенные культуры лизировались специфическими сибиреязвенными бактериофагами Гамма и Fah-ВНИИВВиМ.

На специальных питательных средах (по Green) при культивировании в атмосфере углекислого газа вырастали крупные, выпуклые, блестящие, полупрозрачные гладкие колонии слизистой (мукоидной) консистенции. Процент капсулообразующих клеток у вновь выделенных культур не изменился по сравнению с исходной культурой и находился на уровне 90 %.

Вирулентность выделенных из червей культур практически не имела отличий от величин исходного штамма – показатели ЛД₅₀ для белых мышей составили от 10 до 50 спор.

Провели генотипирование выделенных из червей штаммов по P.Keim [8] и Le Fleche [9]. Отличий от исходного штамма *B. anthracis* 71/12 не найдено.

Из клеток исходной культуры штамма 71/12 и полученных культур выделили ДНК. Выделенные ДНК были использованы в качестве матриц в ПЦР со специфичными праймерами (табл. 1): pag, lef, edema – к последовательностям генов плазмиды токсинообразования; rXO1 и rXO2 – к последовательности генов плазмиды капсулообразования возбудителя сибирской язвы (рис. 2).

Из представленных данных следует, что выделенные на 20-й и 30-й день после начала эксперимента культуры не изменили своих свойств после контакта с калифорнийскими червями – сохранились все генетические детерминанты вирулентности. Таким образом, пребывание сибиреязвенной культуры в организме дождевого червя не привело к утрате ни одной из двух плазмид – капсуло- и токсинообразования.

Под влиянием червей происходит снижение количества *B. anthracis* в почве на 30–50 %. Остающиеся споры возбудителя сибирской язвы не меняют своих свойств и сохраняют все основные биологические и генетические факторы патогенности.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д/2 от 15.08.2011 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., Медгиз; 1962. 180 с.
2. Говорунова В.А., Мацаренко Г.В., Маринин Л.И., Степанов А.В. Плотная питательная среда для выявления возбудителя сибирской язвы. Патент РФ 2125610, опубл. 27.01.1999.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ГИГИЕНА; 2009. 304 с.
4. Мечников И.И. Вопросы иммунитета. Избранные труды. М.: Изд. АН СССР; 1951. С. 37–69.
5. Смирнова А.М., Подлевский А.Ф. Микробиологические основы диагностики инфекционных заболеваний. В кн.: Инфекционные и паразитарные болезни. Л.: Медицина; 1979. 192 с.
6. Преснов И.Н. Некоторые итоги индикации *Bacillus anthracis* в неблагополучных по сибирской язве пунктах. В кн.: Проблемы ветеринарной санитарии. М.; 1967. Т. 29. С. 72–8.
7. Стом Д.И., Балаян А.Э., Полехина С.В., Быбин В.А. Способ тестирования активности препаратов, полученных из дождевых червей. Патент РФ 2377561, опубл. 27.12.2009.
8. Харди К., редактор. Плазмиды. Методы. М.: Мир; 1990. С. 11–8.
9. Anon. Milzbrandvirus nach 1300 Jahren noch aktiv? Gesundheitspolitische Umschau. 1982; 33:60.
10. Bollinger O. Arbeiten aus dem pathologisch. Institut München; 1886.
11. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M. et al. Multi-locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.
12. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiol. 2001; 1:2.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
14. Turner A.J., Galvin L.W., Miller G.T., Rubira R.J. Anthrax explodes in an Australian summer. In: Abstract Book. 3rd Intern. Confer. on Anthrax, 7–10 September. England, Plymouth. 1998. P. 3.
15. Van de Vós. The ecology of anthrax in the Kruger National Park, South Africa. Proc. Intern. Workshop on Anthrax. Winchester, England, Apr. 11–13, 1989. Salisbury Med. Bull. Special Supplement. 1990; 68:19–23.

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]. L.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. Govorunova V.A., Matsarenko G.V., Marinin L.I., Stepanov A.V. [Solid Medium for Anthrax Agent Detection]. RF Patent № 2125610.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., et al. [Methods of Studying of Anthrax Agent Biological Properties]. M.: Gigiena; 2009. 304 p.
4. Mechnikov I.I. [Immunity Issues. Selected Works]. M.: Izd. Akademii Nauk; 1951. P. 37–69.
5. Smirnova A.M., Podlevsky A.F. [Microbiological principles for infectious disease diagnostics]. In: [Infectious and Parasitic Diseases]. L.: Meditsina; 1979. 192 p.
6. Presnov I.N. [Some inferences on *Bacillus anthracis* indication in disadvantaged in relation to anthrax areas]. In: [Problems of Veterinarian Sanitary Science]. M.; 1967. Vol. 29. P. 72–8.
7. Stom D.I., Balayan A.E., Polekhina S.V., Bybin V.A. [Method of activity testing of preparations produced from earthworms]. RF Patent 2377561.
8. Hardy K., editor. [Plasmids. Methods]. M.: Mir; 1990. P. 11–8.

Authors:

Shishkova N.A., Marinin L.I., Mokrievich A.N. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Шшишкова Н.А., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 26.10.11.

М.А.Гришина, Е.Н.Кочубеева, Н.В.Вьючнова, В.А.Антонов, Г.А.Ткаченко, В.В.Алексеев,
А.В.Липницкий

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КОКЦИДИОИДОМИКОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Кокцидиоидомикоз – системное заболевание, вызываемое диморфными грибами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. Возбудители кокцидиоидомикоза – первичные патогены – эндемичны для стран американского континента, однако завозные случаи этого заболевания регистрируются и в других регионах мира. В настоящей работе обобщены данные зарубежной литературы и результаты собственных исследований по проблеме диагностики кокцидиоидомикоза. Рассмотрены проблемы и перспективы развития диагностических препаратов, предназначенных для обнаружения и идентификации *Coccidioides spp.*

Ключевые слова: кокцидиоидомикоз, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, артроспоры, сферулы.

M.A.Grishina, E.N.Kochubeeva, N.V.V'yuchnova, V.A.Antonov, G.A.Tkachenko, V.V.Alekseev, A.V.Lipnitsky

Laboratory Diagnostics of Coccidioidomycosis

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Coccidioidomycosis is a systemic disease induced by dimorphic fungi *Coccidioides* and *C. posadasii*. Its causative agents – primary pathogens – are endemic for American states. However introduced cases of the disease can be traced in some other world regions too. This paper contains summarized foreign literature data on the issue. Presented are the results of our own investigations on the problem of Coccidioidomycosis diagnostics. Discussed are also problems and prospective of the development of a diagnostic preparations designed to detect and identify *Coccidioides spp.*

Key words: coccidioidomycosis, *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*, arthrospores, spherules.

Кокцидиоидомикоз – особо опасное инфекционное заболевание, вызываемое патогенными грибами *Coccidioides immitis* и *C. posadasii*. В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами возбудители кокцидиоидомикоза относятся ко второй группе патогенности (опасности) [6].

Coccidioides spp. – диморфные микромицеты: во внешней среде они существуют в виде мицелиальной (сапробной) формы, а в организме человека

и животных из мицелиальных элементов образуются тканевые (паразитические) формы гриба [9, 21, 26, 36, 43, 46, 51].

Значимость проблемы кокцидиоидомикоза за последние десятилетия возросла не только для традиционно эндемичных регионов Америки, но и для стран, где заболевание ранее не регистрировалось. Случаи заболевания кокцидиоидомикозом имели место в Австралии, Финляндии, Новой Зеландии, Великобритании, Индии, Японии, Таиланде. Распространение этого микоза по всему миру связано, в первую очередь, с развитием туризма: большинство лиц, инфицированных грибами рода *Coccidioides*, заболели случайно при посещении тех стран, где гриб присутствует в почве [18, 20, 34, 52]. Кроме того, возбудители кокцидиоидомикоза попадают за пределы своего ареала с продуктами растениеводства [23]. Особенно высокой опасности заражения подвергаются пациенты при пересадке органов от больных доноров [15]. И наконец, проблема биотерроризма, обострение которой наблюдается в современном мире, требует по-новому взглянуть на возможность распространения кокцидиоидомикоза [21]. Все это указывает на существующую реальную опасность завоза в Россию этого возбудителя из эндемичных районов.

Отсутствие средств специфической профилактики кокцидиоидомикоза, а также выраженная ре-

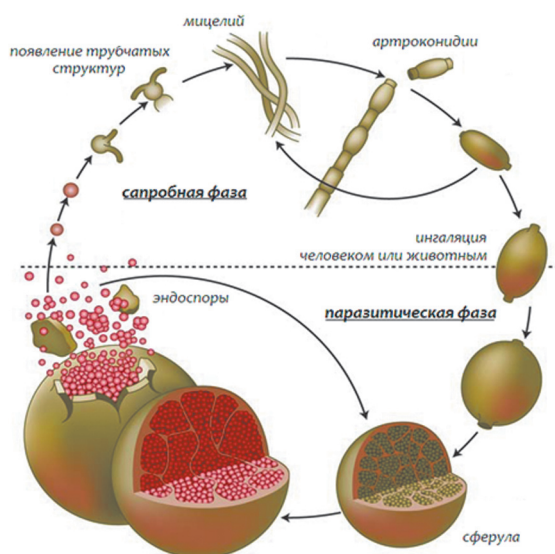


Схема жизненного цикла *Coccidioides spp.*

зистентность *Coccidioides spp.* ко многим химиотерапевтическим препаратам требуют пристального внимания к этим микроорганизмам, прежде всего с диагностических позиций.

Лабораторная диагностика кокцидиоидомикоза требует проведения следующих этапов: обнаружение элементов гриба в патологическом материале; выделение культур возбудителей особо опасных микозов в двух фазах (дрожжевой и мицелиальной); изучение ответных реакций организма и обнаружение антигенов иммуносерологическими методами; выявление и идентификация ДНК грибных патогенов молекулярно-генетическими методами.

Первым этапом лабораторной диагностики кокцидиоидомикоза является микроскопическое исследование патологического материала. Данный метод имеет большое значение, поскольку гриб из-за больших размеров своей тканевой формы может быть легко обнаружен при достаточной обсемененности исследуемых образцов.

Прямому микроскопическому исследованию подлежат мокрота, суставная жидкость, гной, осадок центрифугата спинно-мозговой жидкости, бронхоальвеолярный лаваж [31, 36, 43]. При исследовании мокроты и гноя, в которых в большом количестве содержатся посторонние примеси (лейкоциты, гибнущие тучные клетки, пыльца растений и т.д.), необходимо так называемое «просветление» патологического материала. Для этого используются 10 % раствор гидроксида калия или натрия в смеси с равным количеством патологического материала с последующей экспозицией в течение 10–15 мин. Микроскопия с КОН – самый распространенный, быстрый и доступный метод, но требует хорошей подготовки персонала для идентификации микроорганизмов. Гораздо большей чувствительностью и специфичностью обладает метод окраски с калькофлюоресцентным белым. Это преимущество обусловлено способностью красителя связываться с хитином и целлюлозой клеточной стенки грибов, однако возможно неспецифичное связывание с растительным материалом, а также жирными кислотами. Окраска метенамином серебра по Грокотту – наиболее чувствительный метод исследования гистологических препаратов, но, возможно, избыточное окрашивание препаратов, вследствие чего маскируются некоторые внутриклеточные структуры, такие, например, как эндоспоры внутри сферул. При гистологическом исследовании клинического материала применяются также такие виды окраски, как PAS-реакция и окраска гематоксилин-эозином. Иногда используют метод Гимза, Папаниколау и окраску муцикармином, но чувствительность этих методов значительно уступает вышеописанным [54]. Окраска по Граму не используется.

Зрелые сферулы легко распознаются в нативном препарате и без окраски по их толстой преломляющей свет оболочке и наличию эндоспор. Хорошие результаты получены при обработке патологического

материала глицерином. Сферулы более рельефно выделяются на фоне лейкоцитов, которые, мацерируясь в глицерине, становятся более светлыми, в то время как оболочка сферул, как бы уплотняясь, выступает более отчетливо. Исследование в воде или физиологическом растворе также дает вполне удовлетворительные результаты, но при этом быстрее происходит подсыхание препарата [1, 2, 3, 4].

Для обнаружения сферул в пробах клинического материала можно использовать также метод флуоресцирующих антител, обеспечивающий получение предварительного ответа в течение 1–2 ч от момента поступления проб на исследование. Видоспецифические флуоресцирующие иммуноглобулины интенсивно окрашивают толстую оболочку сферул и слабо – содержащиеся внутри них эндоспоры [4].

Сферулы, обнаруженные на трофоцитарной стадии развития, необходимо дифференцировать от возбудителей криптококкоза, бластомикоза и др. Следует также отметить, что сходные по морфологии сферулы образуют *Rhinosporidium seeberi*, *Emmonsia parva* и *Emmonsia crescens* [45]. Кроме того, незрелые сферулы с тонкими стенками и недифференцированной протоплазмой трудно отличить от пылевых клеток, зернистых лейкоцитов, капель жира и других клеточных образований.

Единственно надежным критерием для подтверждения кокцидиоидной природы сферул является их прорастание в мицелий. Наилучшие условия для быстрого прорастания сферул (в первые 24 ч) создаются при инкубации раздавленных на предметном стекле и запарафинированных по краю покровного стекла препаратов с добавлением пенициллина и стрептомицина [1].

Наряду со сферулами в патологическом материале иногда удается обнаружить мицелий в виде коротких и длинных нитей. Такие находки выявляются при исследовании смыва из каверн [4].

Выделение чистой культуры *Coccidioides spp.* из клинического материала является наиболее важным методом диагностики и позволяет окончательно установить диагноз кокцидиоидомикоза.

Исследования, проводившиеся внутри эндемичных зон, показали, что чаще всего положительные результаты регистрируются при культуральном исследовании образцов, полученных из дыхательных путей. При этом *Coccidioides spp.* наиболее часто выделяются из бронхоальвеолярного лаважа (53 %). Культуры из мокроты выделяются только в 20 % случаев [11, 48].

Грибы *Coccidioides spp.* могут расти на различных селективных и неселективных средах [36, 48, 49]. Для выращивания мицелиальной формы гриба обычно применяют агар Сабуро с добавлением антибактериальных антибиотиков широкого спектра действия, чаще левометицина (хлорамфеникола), который подавляет рост посторонних грибов, но не влияет на рост *Coccidioides spp.* [6]. Гриб может расти также на

мясопептонном агаре с добавлением дрожжевого экстракта, мясопептонном бульоне с глюкозой, сердечно-мозговом агаре. Гриб развивается медленно, первые колонии появляются обычно через 3–4 дня, а конидиогенез наблюдается спустя 14 дней после посева. Однако интенсивность развития грибов рода *Coccidioides* на питательных средах различна, и для некоторых штаммов начало роста наступает на 10–16-й день [20], или даже через 1–2 месяца.

По характеру роста культуры *C. immitis* и *C. posadasii* мало чем отличаются от ряда других мицелиальных грибов: рыхлый, местами редкий, бесцветный или серовато-беловатый мицелий с мучнистым налетом при споруляции [1, 3, 53]. С возрастом колонии приобретают коричневатый или желто-коричневый оттенок. Это ориентировочные признаки для отбора колоний подозрительных культур.

На жидких средах рост возбудителей кокцидиоидомикоза происходит несколько быстрее. При посевах на жидкие среды удается обогатить культуру, что облегчает развитие грибов на плотных средах.

При микроскопическом исследовании культур *Coccidioides spp.* обнаруживается разветвленный септированный мицелий примерно 2 мм в диаметре с бочкообразными артросторами, которые чередуются с зонами просветления, образуемыми клетками-разобщителями (дизъюнкторами). По мере созревания мицелий распадается, и на концах артростор остаются фрагменты оболочки (стенки) мицелиальных клеток, образуя так называемые «усики» или орнамент, которые являются характерным признаком именно возбудителя кокцидиоидомикоза.

Выросшие колонии *Coccidioides spp.* необходимо дифференцировать от других мицелиальных грибов, продуцирующих артросторы. Для этого используют экзоантигенный тест на основе специфических антител, который позволяет выявлять в фильтрате мицелиальной культуры экзоантиген CSA (*Coccidioides*-specific antigen), а также молекулярные методы [21]. Иммунологические и молекулярно-генетические методы исследования позволяют, кроме того, решить проблему идентификации атипичных культур, утративших способность к артросторообразованию.

Для окончательной идентификации *Coccidioides spp.* требуется подтверждение диморфизма выделенного гриба. Для этого необходимо добиться прорастания мицелиальной формы *Coccidioides spp.* в сферулы *in vitro* или *in vivo*. Сферульную форму *in vitro* получают при посеве клинического материала на жидкую модифицированную среду Конверса, с последующей инкубацией в атмосфере углекислого газа (10–20 %), *in vivo* – заражением биопробных животных (белые мыши, морские свинки) мицелиальной формой патогена.

Выделение культуры *Coccidioides spp.* или гистологическая идентификация микромицета в ткани позволяют окончательно установить диагноз кокцидиоидомикоза. Однако серологические методы также занимают важное место в диагностике.

При тяжелых формах диссеминированного кокцидиоидомикоза используют методы обнаружения антигенов в пробах клинического материала (гной, мокрота, кровь, спинно-мозговая жидкость, смывы с бронхов, экссудаты из плевральной полости, пунктат костного мозга, биопсированные кусочки тканей из очагов поражения, реже – моча, испражнения) [38, 41, 42].

В зависимости от характера исследуемого материала проводят выбор диагностических средств для той или иной серологической реакции.

Серологические реакции с эритроцитарными диагностикумами (иммуноглобулиновым или антигенным) применяют на всех этапах лабораторной диагностики микоза. Для обнаружения антигена используют двухкомпонентную РНГА с иммуноглобулиновым эритроцитарным препаратом или трехкомпонентную реакцию нейтрализации антител (РНАт) с антигенным диагностикумом. Поиск специфических антител в сыворотках больных людей осуществляется с помощью двухкомпонентной РНГА с антигенным эритроцитарным препаратом или трехкомпонентной реакции нейтрализации антигена (РНАг) с иммуноглобулиновым эритроцитарным диагностикумом [1, 4].

При поиске специфических антител исследуют сыворотки больных людей, реже – спинно-мозговую жидкость, полученные в различные сроки от момента клинических проявлений заболевания.

В настоящее время наибольшую прогностическую и диагностическую ценность имеет определение антител к двум антигенам *Coccidioides spp.* – ТР (tube precipitin) и CF (complement fixation). Появление ТР антител, относящихся, главным образом, к классу IgM, связано с развитием первичного острого кокцидиоидомикоза, в течение первой недели ТР антитела можно зарегистрировать у 50 % больных, а на третьей неделе – у 90 %. CF антитела принадлежат классу IgG, нарастание их титра происходит на стадии хронической диссеминации заболевания [36, 37, 41, 42, 48].

Серодиагностическая значимость определения IgM преципитиновых антител была определена еще в начале XX века Smith *et al.* с помощью теста пробирочной преципитации [29]. Huppert *et al.* [29] позже разработали иммунодиффузионный метод, который не потерял своей актуальности и до настоящего времени. Основное преимущество реакции иммунодиффузии (РИД) состоит в том, что по характеру линий преципитата можно выявить специфические системы антиген-антитело [42], однако чувствительность метода невысока и для его проведения требуется несколько суток [41, 42, 48]. Подобных недостатков лишены такие методы, как реакция латекс-агглютинации (РЛА) и иммуноферментный анализ (ИФА), причем ИФА, получивший широкое распространение в последние годы, является наиболее чувствительным способом детекции антител [21]. Тем не менее, при проведении РЛА или ИФА возможны

ложноположительные результаты, поэтому всегда требуется подтверждение иммунодиффузионным методом.

С помощью РИД можно определять также и наличие в сыворотке IgG. Детектируемые титры CF антител развиваются со второй недели заболевания и могут сохраняться в течение всего периода развития болезни.

Для количественного анализа уровня CF антител используется реакция связывания комплемента (РСК), которая позволяет, во-первых, оценить эффективность лечения, а также обеспечивает важной прогностической информацией. Титр РСК 1:2 или 1:4 указывает на благоприятный исход болезни, титр 1:16 или более свидетельствует о развитии диссеминированной формы заболевания. Чаще всего РСК используется при диагностике кокцидиоидного менингита [41, 42, 55].

Важным преимуществом РСК, по сравнению с РИД, является большая чувствительность, однако известен высокий уровень перекрестных реакций с сыворотками больных гистоплазмозом и бластомикозом [48, 55], напротив, РИД на агарозном геле высокоспецифична, но имеет меньшую чувствительность и требует концентрирования исследуемых образцов [41, 55].

При тяжелой иммуносупрессии могут отмечаться низкие титры CF антител или их отсутствие [14, 19, 33].

В настоящее время наиболее чувствительным является ИФА (83–87 %), однако при его использовании возможны ложноположительные результаты.

В качестве альтернативных способов выявления и идентификации грибных патогенов, в том числе и возбудителя кокцидиоидомикоза, в последнее время все более активно используются молекулярно-генетические методы, основанные на анализе генома [9, 10, 15, 22, 36, 47].

Одним из первых методов генодиагностики стал метод ДНК-ДНК гибридизации. В настоящее время для идентификации микромицетов используют меченные акридином ДНК-зонды на основе генов рибосомальной РНК. Для обнаружения возбудителя кокцидиоидомикоза применяют коммерческий препарат AssuProbe, США. Данный метод оказался достаточно чувствительным (10^4 – 10^5 клеток), специфичным и быстрым в исполнении [9, 28].

Однако методы ДНК-ДНК гибридизации имеют ряд недостатков и ограничений, связанных с перекрестной гибридизацией, трудоемкостью исследования и скорее направлены на идентификацию выделенных культур микроорганизмов, а не для исследования клинических образцов, таких как бронхоальвеолярный лаваж, спинно-мозговая жидкость, биоптаты органов, кровь [8].

Среди новых средств диагностики микозов следует выделить методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая позволяет выявлять патогены при отсутствии этапа культивирования

микроорганизмов. При разработке ПЦР-систем для идентификации возбудителей микозов в качестве ДНК-мишени часто использовались последовательности рибосомальных генов (*18S pPHK*, *5,8S pPHK*, а также *ITS1* и *ITS2* регионов). Преимуществом данных матриц для ПЦР является их консервативность и мультикопийность [39].

M.Lindsley *et al.* [35] для выявления медицински значимых грибов разработали ПЦР-тест-систему на основе панфунгальных последовательностей спейсерных областей ITS1–ITS4 региона. Последующая идентификация грибов проводилась видоспецифическими ДНК-зондами, полученными на основе ITS2 регионов [35]. В качестве метки использовали ди-гидроксигенин или биотин. ПЦР ампликоны выявляли колориметрически с помощью иммуноферментного анализа. Чувствительность метода составляла 1,2 pg ДНК. Однако, вследствие необходимости проведения двух этапов идентификации ампликонов, повышается риск контаминации, а также удлиняются сроки получения результатов. Кроме того, наблюдались перекрестные реакции ДНК-зонда для выявления *Blastomyces dermatitidis* с ДНК возбудителей кокцидиоидомикоза и у зонда для обнаружения *Histoplasma capsulatum* – с ДНК *Candida albicans*.

D.R.Green *et al.* [27] сконструировали видоспецифичные праймеры на основе ITS последовательностей рибосомальной ДНК, обозначенные ITS C1A и ITSC2. Данные праймеры они использовали для детекции кокцидиоидной ДНК в пробах почвы эндемичных регионов. В последующем, S.Johnson *et al.* [32] с использованием этих же праймеров обнаруживали ДНК гриба в сыворотках крови экспериментально зараженных мышей и больных кокцидиоидомикозом людей. Чувствительность праймеров была высокой и составляла 10–100 fg ДНК (323–3230 геномных копий, в перерасчете на известный размер генома в 28,2 Mb) при окраске геля Vistra Green и 1 pg ДНК при окраске геля этидиум бромидом. Однако при исследовании 90 сероположительных проб сывороток больных людей положительный результат в ПЦР наблюдался лишь в 6 случаях [32].

В то же время при использовании праймеров, сконструированных на основе рибосомальных генов, существует вероятность получения ложноположительных результатов в реакции амплификации. Так, при сравнении нуклеотидных последовательностей генов *18S pPHK* и *5,8S pPHK*, а также ITS1 и ITS2 регионов выявлена высокая степень гомологии *Chrysosporium keratinophilum* с *C. immitis*.

Анализ данной литературы указывает на необходимость проведения секвенирования всех продуктов амплификации, если в ПЦР-тест-системе используются праймеры, разработанные на основе фрагментов рибосомальных генов возбудителей кокцидиоидомикоза.

В настоящее время существует коммерческая система идентификации микроскопических грибов – MicroSeq® D2 LSU rDNA Fungal Identification System

(Applied Biosystems, США). Данная система основана на секвенировании D2 региона гена LSU 26S рибосомальной РНК, присутствующего у всех микромицетов. Нуклеотидный состав данной области генома, зависит от таксономической принадлежности гриба. В рабочей базе данных, которая ежегодно пополняется, представлено более 1000 секвенированных последовательностей мицелиальных грибов, что позволяет расширить возможности диагностического поиска.

Для диагностики кокцидиоидомикоза в качестве ДНК-мишени, наряду с рибосомальными генами, использовались и гены, кодирующие видоспецифические белки. S.Pan и G.Cole на основе последовательности гена, кодирующего 19 кДа специфичный белок (cag), сконструировали праймеры для идентификации *C. immitis* и рекомендовали их для разработки амплификационной тест-системы [25, 40]. Эти праймеры отличались высокой специфичностью и чувствительностью. Нижний предел чувствительности реакции составлял 1 pg ДНК *C. immitis*. Однако данные олигонуклеотидные затравки не были протестированы для выявления возбудителя кокцидиоидомикоза при исследовании проб биологического материала и объектов окружающей среды. [24]. В наших исследованиях проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего этот белок, обозначенный *Coccidioides-specific antigen* (CSA), обоих возбудителей кокцидиоидомикоза. Как оказалось, данный антиген с молекулярной массой 19 кДа (cag) (Genbank AAB00101), кодируется геном *C. posadasii* (Genbank L36551, AY158466). При сравнении нуклеотидных последовательностей и, следовательно, специфичности выбранных олигонуклеотидных затравок с помощью программы BLASTn на веб-сайте (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) Национального Центра Биотехнологической Информации в режиме on-line выявлена 100 % гомология как данного гена, так и предложенной пары праймеров ДНК *C. posadasii* с ДНК *C. immitis* RS (Genbank, AEC03000001), т.е. данные праймеры оказались родоспецифичными для *Coccidioides spp.*

Разделение двух видов возбудителей кокцидиоидомикоза на *C. immitis* и *C. posadasii* стимулировало работы по поиску ДНК-мишеней, на основе которых возможна дифференциация этих возбудителей. Так, R.Bialek *et al.* сконструировали праймеры на ген, кодирующий пролин – богатый иммунодоминантный белок клеточной стенки Ag2/PRA [12]. На его основе удалось разработать гнездную ПЦР для идентификации *C. posadasii*. Несмотря на то, что в геноме возбудителя кокцидиоидомикоза содержится только одна копия данного гена, чувствительность этой реакции при использовании гнездной ПЦР составила единичные клетки, а специфичность – 100 % [30, 44]. Однако данная тест-система была апробирована только при исследовании биопсийных образцов тканей легкого, пораженных *C. posadasii*. Данные о возможности детекции *C. immitis* с помощью этой тест-

системы авторами не представлены. Позднее было выяснено, что данный ген консервативен как среди калифорнийской (*C. immitis*), так и не калифорнийской популяции (*C. posadasii*) [30].

Из флуоресцентных методов детекции для обнаружения возбудителей кокцидиоидомикоза применяются методики с использованием 2 зондов с резонансным переносом энергии (LightCycler assay). В качестве ДНК-мишеней для выявления возбудителей кокцидиоидомикоза были выбраны спейсерные области рибосомальных генов, а для обнаружения микромицетов вида *C. posadasii* – участок гена, кодирующего антиген, обогащенный пролином (Ag2/PRA) [12, 13].

K.W.Sheff *et al.* [50] для дифференциации *C. immitis* и *C. posadasii* предложена технология TaqMan-ПЦР в формате реального времени. Данный методический прием с амплификацией фрагментов 4 ДНК-мишеней, обозначенных авторами пролин 157, пролин 174, гексокиназа 149 и глюкозо-синтаза 192, в которых детектировались единичные нуклеотидные замены (SNP), для дифференциации двух микромицетов рода *Coccidioides* был использован и при анализе штаммов, выделенных от больных кокцидиоидомикозом Мексики [17].

Для идентификации и дифференциации грибов рода *Coccidioides* нами разработаны амплификационные тест-системы, предназначенные для выявления нуклеотидных последовательностей гена *MBP-1* (macrophage binding protein), детерминирующего макрофагсвязанный белок и *SOWgp82* гена (spherule outer wall glycoprotein), кодирующего иммунодоминантный гликопротеин внешней стенки сферул данных микромицетов. В этих тест-системах олигонуклеотидные праймеры CimMBP1s-CimMBP2as обеспечивали специфическую амплификацию фрагментов ДНК обоих возбудителей кокцидиоидомикоза, а праймеры CpSOW82s-CpSOW82as – только *C. posadasii* [8].

Фенотипических признаков, с помощью которых можно было бы дифференцировать *C. immitis* и *C. posadasii*, до настоящего времени не установлено. Лишь на основании генотипирования удалось разделить все исследуемые штаммы на 2 большие генетические группы – калифорнийскую и не калифорнийскую (в последующем на *C. immitis* и *C. posadasii*, соответственно) [16, 24, 25]. В работе M.C.Fisher *et al.* для внутривидового типирования штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза использовали ДНК-маркеры, основанные на выявлении единичных нуклеотидных замен (SNPs) в вариабельных участках ДНК [25]. Поэтому, используя молекулярно-генетические методы, нами была проведена работа по генетическому типированию и определению видовой принадлежности штаммов *Coccidioides spp.* из коллекции ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора. В работе M.C.Fisher *et al.* [25] было показано, что при секвенировании локуса bl у штаммов *C. immitis* в результате замены нуклео-

тида в этом локусе отсутствует полиморфный сайт рестрикции. Мы использовали амплификацию локусов *bl*, *VI*, *z* с последующим гидролизом полученных ампликонов эндонуклеазой рестрикции *Hinf* I. Детекцию аллельных вариантов SNPs проводили с помощью метода ПЦР-SSCP-анализа однонитевого конформационного полиморфизма ДНК, ПЦР-ПДРФ и секвенирования.

Полученные результаты генотипирования свидетельствовали о генетическом разнообразии штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза, находящихся в коллекции ВолгоградНИПЧИ. В одну кластерную группу вошли 15 штаммов, которые соответствовали генотипу некалифорнийской группы (*C. posadasii*). В ДНК остальных одиннадцати штаммов методами ПЦР-ПДРФ, ПЦР-SSCP и секвенирования были выявлены полиморфные нуклеотидные замены, характерные для генотипа калифорнийской группы, что позволило идентифицировать их как вид *C. immitis*. Следует отметить, что результаты генотипирования полностью совпадали с результатами ПЦР с использованием сконструированных праймеров *CimMBP1s*, *CimMBP2as* и *CpSOW82s*-*CpSOW82as* и подтверждали их специфичность.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д/3 от 20.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.).»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лесовой В.С., Липницкий А.В., Тихонов Н.Г., Яшкульов К.Б. СПИД-ассоциированные микозы. Элиста; 1995. 173 с.
2. Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П. Проблемы лабораторной диагностики глубоких микозов. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1995; 4:53–6.
3. Липницкий А.В., Лесовой В.С., Храпова Н.П., Тихонов Н.Г. Глубокие микозы. В кн.: Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней. Саратов, 1998. Т. 2. С. 80–100.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
5. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград; 2004. 256 с.
6. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). М.: Госсанэпиднадзор России; 2003. 103 с.
7. Ткаченко Г.А., Гришина М.А., Антонов В.А., Савченко С.С., Замаева В.С., Лесовой В.С. и др. Идентификация возбудителей кокцидиоидомикоза методом полимеразной цепной реакции. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2007; 4:25–31.
8. Херрингтон С., Макги Дж., редакторы. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир; 1999. 558 с.
9. Anstead G.M., Graybill J.R. Coccidioidomycosis. Infect. Dis. Clin. North. Am. 2006; 20:621–43.
10. Assi M.A., Binnicker M.J., Wengenack N.L., Deziel P.J., Badley A.D. Disseminated coccidioidomycosis in a liver transplant recipient with negative serology: Use of polymerase chain reaction. Liver Transpl. 2006; 12:1290–2.
11. Barenfanger J., Lawhorn J., Drake C. Nonvalue of culturing cerebrospinal fluid for fungi. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:236–8.
12. Bialek R., Kern J., Herrmann T., Tijerina R., Cecenas L., Reischl U. et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/Proline-Rich Antigen. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:778–83.
13. Binnicker M.J., Buckwalter S.P., Eisberner J.J., Stewart R.A., McCullough A.E., Wohlfel S.L. et al. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimen by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:173–78.
14. Blair J. E., Coakley B., Santelli Ana C., Hentz J.G.,

Wengenack N.L. Serologic testing for symptomatic coccidioidomycosis in immunocompetent and immunosuppressed hosts. Mycopathologia. 2006; 162:317–24.

15. Blair J.E., Logan J.L. Coccidioidomycosis in solid organ transplantation. Clin. Infect. Dis. 2001; 33:1536–44.
16. Burt A., Dechairo B.M., Koenig G.L., Carter D.A., White T.J., Taylor J.W. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. Mol. Ecol. 1997; 6:781–6.
17. Castanon-Olivares L.R., Guarena-Elizalde D., Gonzalez-Martinez M.R., Licea-Navarro A.F., Gonzalez-Gonzalez G.M., Aroch-Calderon A. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1111:326–35.
18. Chandesris M.O., Hot A., Dannaoui E., Bounoux M.E., Viard J.P., Dupont B. et al. Coccidioidomycosis: an imported invasive fungal disease in France. Med. Mal. Infect. 2008; 38:336–42.
19. Chang D.C., Anderson S., Wannemuehler K., Engelthaler D.M., Erhart L., Sunenshine R.H. et al. Testing for coccidioidomycosis among patients with community-acquired pneumonia. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:1053–59.
20. Cox R.A., Magee M.D. Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. Clin. Microbiol. Reviews. 2004; 17:804–39.
21. DiCaudo D.J. Coccidioidomycosis: a review and update. J. Am. Acad. Dermatol. 2006; 55:929–42.
22. de Aguiar C.R., Nogueira Brilhante R.S., Gadelha Rocha M.F., Araujo Moura F.E., Pires D.C., Costa Sidrim J.J. Rapid diagnosis of coccidioidomycosis by nested PCR assay of sputum. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13(4):449–51.
23. Desai S.A., Minai O.A., Gordon S.M., O'Neil B., Wiedemann H.P., Arroliga A.C. Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. Respir. Med. 2001; 95(4):305–9.
24. Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. 2002; 94(1):73–84.
25. Fisher M.C., Koenig G.L., White T.J., Taylor J.W. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Mol. Biol. Evol. 2000; 17:1164–74.
26. Galgiani J.N., Ampel N.M., Blair J.E., Catanzaro A., Johnson R.H., Stevens D.A. et al. Coccidioidomycosis. Clin. Infect. Dis. 2005; 41:1217–23.
27. Greene D.R., Koenig G., Fisher M.C., Taylor J.W. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2000; 92:406–10.
28. Gromadzki S.G., Chaturvedi V. Limitation of the AccuProbe *Coccidioides immitis* culture identification test: false-negative results with formaldehyde-killed cultures. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:2427–8.
29. Hirschmann J.V. The Early History of Coccidioidomycosis: 1892–1945. Clin. Infect. Dis. 2007; 44:1202–7.
30. Johannesson H., Vidal P., Guarro J., Herr R. A., Cole G.T., Taylor J.W. Positive directional selection in the proline-rich antigen (PRA) gene among the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis*, *C. posadasii* and their closest relatives. Mol. Biol. Evol. 2004; 21:1134–45.
31. Johnson R.H., Einstein H.E. Coccidioidal meningitis. Clin. Infect. Dis. 2006; 42:103–7.
32. Johnson S.M., Simmons K.A., Pappagianis D. Amplification of Coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:1982–85.
33. Keckich D.W., Blair J.E., Vikram H.R. *Coccidioides* fungemia in six patients, with a review of the literature. Mycopathologia. 2010; 170(2):107–15.
34. Kishi K., Fujii T., Takaya H., Miyamoto A., Kurosaki A., Kohno T. et al. Pulmonary coccidioidomycosis found in healthy Japanese individuals. Respirology. 2008; 13:252–6.
35. Lindsley M.D., Hurst S.F., Iqbal N.J., Morrison C.J. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3505–11.
36. Murthy M.H., Blair J.E. Coccidioidomycosis. Curr. Fungal Infect. Rep. 2009; 3:7–14.
37. Richardson M.D., Warnock D. W. Fungal Infection. Diagnosis and management. 3rd ed. Blackwell Publishing; 2003. 366 c.
38. Durkin M., Connolly P., Kuberski T., Myers R., Kubak B.M., Bruckner D. et al. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the *Coccidioides* antigen enzyme immunoassay. Clin. Infect. Dis. 2008; 47(8):69–73.
39. Millar B.C., Jiru X., Walker M.J., Evans J.P., Moore J.E. False identification of *Coccidioides immitis*: do molecular methods always get it right? J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5778–80.
40. Pan S., Cole G.T. Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen. Infect. Immun. 1995; 63(10):3994–4002.
41. Pappagianis D. Current status of serologic studies in coccidioidomycosis. Curr. Fungal Infect. Rep. 2007; 1:129–34.

42. Pappagianis D. Serologic studies in coccidioidomycosis. *Semin. Respir. Infect.* 2001; 16:242–50.
43. Parish J.M., Blair J.E. Coccidioidomycosis. *Mayo. Clin. Proc.* 2008; 83(3):343–8.
44. Peng T., Orsborn K.I., Orbach M.J., Galgiani J.N. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J. Infect. Dis.* 1999; 179:518–21.
45. Pfaller M.A., Diekema D.J. Unusual fungal and pseudofungal infections of humans. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(4):1495–504.
46. Saubolle M.A. Life cycle and epidemiology of *Coccidioides immitis*. In: Einstein H.E., Catanzaro A., editors. *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis*. Stanford University, 24–27 August, 1994. Washington: National Foundation for Infectious Diseases; 1996. P. 1–8.
47. Sandhu G.S., Kline B.C., Stockman L., Roberts G.D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2913–19.
48. Saubolle M.A. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1111:301–14.
49. Saubolle M.A., McKellar P.P., Sussland D. Epidemiologic, clinical and diagnostic aspects of coccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45:26–30.
50. Sheff K.W., York E.R., Driebe E.M., Barker B.M., Rounsley S.D., Waddell V.G. et al. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med. Mycol.* 2010; 48(3):466–9.
51. Spinello I.M., Munoz A., Johnson R.H. Pulmonary coccidioidomycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2008; 29:166–73.
52. Standaert S.M., Schaffner W., Galgiani J.N., Pinner R.W., Kaufman L., Durry E. et al. Coccidioidomycosis among visitors to a *Coccidioides immitis* – endemic area: an outbreak in a military reserve unit. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:1672–5.
53. Sutton D.A. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1111:315–25.
54. Wieden M.A., Saubolle M.A. The histopathology of coccidioidomycosis. In: Einstein H.E., Catanzaro A., editors. *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis*. Stanford University, 24–27 August, 1994. Washington: National Foundation for Infectious Diseases; 1996. P. 12–7.
55. Yang M.C., Magee D.M., Kaufman L. Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixation antigen: detection of an epitope shared by *C. immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces dermatitidis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4:19–22.

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

1. Lesovoy V.S., Lipnitsky A.V., Tikhonov N.G., Yashkulov K.B. [AIDS-Related Mycoses]. Elista; 1995. 173 p.
2. Lipnitsky A.V., Lesovoy V.S., Khrapova N.P. [Problems of laboratory diagnostics of deep fungal diseases]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 1995; 4:53–6.
3. Lipnitsky A.V., Lesovoy V.S., Khrapova N.P., Tikhonov N.G. [Deep fungal diseases]. In: [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1998. Vol. 2. P. 80–100.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practical Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 472 p.
5. [Practical Guide for Bacteriologists and Epidemiologists on the Matters of Bioterrorism Response]. Volgograd; 2004. 256 p.
6. Sanitary-and-Epidemiological Regulations SR 1.3.1285-03 [Safety of Work with Microorganisms of I–II Pathogenicity Groups]. M.: Gossanepidnadzor; 2003. 103 p.
7. Tkachenko G.A., Grishina M.A., Antonov V.A., Savchenko S.S., Zamaraev V.S., Lesovoy V.C. et al. [Identification of Coccidioidomycosis causative agent by means of polymerase chain reaction]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2007; 4:25–31.
8. Herrington S., McGee G., editors. [Molecular Clinical Diagnostics. Methods]. M.: Mir; 1999. 558 p.

Authors:

Grishina M.A., Kochubeeva E.N., Vyuchnova N.V., Antonov V.A., Tkachenko G.A., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Гришина М.А., Кочубеева Е.Н., Вьючнова Н.В., Антонов В.А., Ткаченко Г.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.01.12.

С.Н.Шпынов^{1,2}, Е.М.Полещук¹, Н.В.Рудаков^{1,2}, И.Е.Самойленко¹, Т.А.Решетникова¹, Л.В.Кумпан^{1,2},
А.Н.Коломеец¹, Г.Н.Сидоров¹, С.Е.Ткачев³, С.В.Грибенча⁴

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ТИПИРОВАНИЯ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ШТАММОВ РИККЕТСИЙ ГРУППЫ КЛЕЩЕВОЙ ПЯТНИСТОЙ ЛИХОРАДКИ И ВИРУСА БЕШЕНСТВА

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций»,

²ГОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск;

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

⁴ГУ «Научно-исследовательский Институт вирусологии имени Д.И.Ивановского» РАМН, Москва

Проведена идентификация и типирование 50 штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и 36 штаммов лиссавирусов из рабочих коллекций ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» с использованием молекулярно-биологических, эпидемиологических и биоинформационных подходов. Определено таксономическое положение исследованных культур риккетсий группы КПЛ. Проведено районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы КПЛ в хозяевах – иксодовых клещах. Рассмотрены вопросы распространения лиссавирусов на территории Сибири.

Ключевые слова: Российская Федерация, эндемичные риккетсиозы, бешенство, эпидемиология, молекулярно-биологические исследования.

S.N.Shpynov^{1,2}, E.M.Poleshchuk¹, N.V.Rudakov^{1,2}, I.E.Samoilenko¹, T.A.Reshetnikova¹, L.V.Kumpan^{1,2},
A.N.Kolomeets¹, G.N.Sidorov¹, S.E.Tkachev³, S.V.Gribench⁴

Application of Molecular Typing Methods for Analysis of Strains of Rickettsiae of the Spotted Fever Group and Rabies Virus

¹Omsk Research Institute of Natural Focus Infections, ²Omsk State Medical Academy, Omsk; ³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk; ⁴D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

50 strains of spotted fever group (SFG) rickettsiae and 36 lyssaviruses strains from the collection of Omsk Research Institute of Natural Focus Infections were identified and typed using the approaches of molecular biology, epidemiology and bioinformatics. The taxonomic status of the studied cultures of SFG rickettsiae was identified. Zonation of the Russian Federation territories according to the spread of SFG pathogenic rickettsiae in their hosts – ixodic ticks was carried out. Lyssaviruses distribution in the territory of Siberia was considered.

Key words: Russian Federation, endemic rickettsioses, rabies, epidemiology, molecular biological studies.

Создание эффективно действующей единой национальной системы индикации и идентификации возбудителей опасных инфекций требует проведения стандартизации средств и методов, используемых для лабораторной диагностики.

Применение комплекса молекулярно-биологических методов, основанных на ПЦР (ПЦР-ПДРФ, ПЦР-секвенирование, ПЦР со случайными праймерами, ПЦР с праймерами на повторяющиеся элементы и др.), позволило получить данные по молекулярным портретам штаммов возбудителей инфекционных болезней, циркулирующих на территории Российской Федерации. Одним из важных разделов этой работы является «ретроспективное» молекулярное типирование штаммов микроорганизмов, хранящихся в рабочих коллекциях учреждений Роспотребнадзора.

В рабочих коллекциях ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора содержится 97 штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ) и 251 штамм лиссавирусов, полученных от человека, животных и других биологических объектов (иксодовых клещей).

Применение молекулярных методов типирования в комплексе с другими лабораторными методами

в системе эпидемиологического надзора за возбудителями природно-очаговых заболеваний способствует более эффективному мониторингу очагов этих инфекций и совершенствованию профилактических мероприятий.

Создана уникальная коллекция штаммов риккетсий, не имеющая аналогов в мире. Коллекции микроорганизмов в институте, кроме авторских штаммов, включают большое количество музейных штаммов из различных регионов мира. Коллекция лиссавирусов института не имеет аналогов в России. Она представлена видом Rabies virus (классический вирус бешенства, соответствует генотипу 1), а также оригинальными видами: European bat lyssavirus 1 (лиссавирус европейских летучих мышей 1-го типа, 5-й генотип), Aravan (8-й генотип), Khujand (9-й генотип), Irkut (10 генотип), West Caucasian bat virus лиссавирус (11-й генотип).

Материалы и методы

Осуществлено молекулярно-генетическое исследование 50 штаммов риккетсий из рабочей коллекции ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых

инфекций» Роспотребнадзора, выделенных в очагах клещевого риккетсиоза (КР) от больных и иксодовых клещей шести видов, а также с не эндемичных по этой инфекции территорий азиатской части РФ в период с 1954 по 2005 год.

При изучении штаммов риккетсий определены нуклеотидные последовательности фрагмента *ompA* гена размером 629/632 п.н., кодирующего синтез белка наружной мембраны, гена *gltA* размером 1234 п.н., отвечающего за синтез цитрат синтетазы. Для постановки ПЦР использовали праймеры, предложенные V.Roux *et al.* [12] и P.-E.Fournier *et al.* [5]. Секвенирование было выполнено на ABI 3100 PRISM (Applied Biosystems) автоматическом секвенаторе.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTAL в оболочке BISANCE [4]. Процент гомологии нуклеотидных последовательностей определяли, применяя DNADIST software package (Hitachi Software Engineering America, Brisbane, CA) by the method of Kimura [8]. Филогенетический анализ выполняли, применяя neighbour-joining метод и программу DNAPARS в версии PHYLIP с методом максимальной вероятности (maximum-likelihood). Построение филогенетических деревьев выполняли с применением программы ClustalW в версии 1.8 (доступной через DNA Data Bank of Japan, Vishima, Japan [http://www.ddbj.nig.ac.jp/htmls/E-mail/clustalw-e.html]). Визуализацию дендрограмм осуществляли с помощью программы TreeView, версия 1.61. Последовательности нуклеотидов в амплифицированных фрагментах ДНК всех положительных проб были идентифицированы с депонентами находящимися в GenBank в режиме прямого доступа.

Для определения молекулярно-генетического разнообразия рабдовирусов, циркулирующих на юге Сибири, использованы 36 изолятов, выделенных в биопробе в 2001, 2002 и 2008 гг. в Республике Тыва, Красноярском и Алтайском краях, Омской, Новосибирской, Белгородской, Воронежской и Тверской областях. РНК, выделенную из головного мозга белых мышей с помощью TRIzol (Invitrogen, USA), исследовали в ОТ-ПЦР с праймерами к гену нуклеопротеина (N) [6, 13]. Ампликоны секвенировали с набором Big-Dye™ Terminator Kit v.3.0 с последующим анализом на приборе ABI 3130xl в Центре Секвенирования ДНК СО РАН (Новосибирск). Полученные последовательности гена N анализировали и сравнивали с последовательностями лабораторных штаммов, полевых изолятов из Африки, Индии, Таиланда, Японии, США, Грузии, Монголии, Казахстана (n=17) и России (n=35), полученными из GenBank в программе BLASTN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Для филогенетического анализа использовали набор данных (n=100, включая 80 изолятов с территории России), представляющий собой последовательность гена N (1252 нуклеотида, позиции 170–1421 по отношению к геному штамма SAD B19; GenBank № M31046). При дальнейшем исследовании

проведено сравнение 152 последовательностей гена N (1302 нуклеотида, позиции 122–1423, по отношению к геному штамма ABL; GenBank № NC003243). Выравнивание и филогенетический анализ методами neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) проводили в программе MEGA 4 [9].

Результаты и обсуждение

Идентификация и титрование штаммов риккетсий группы КПЛ

В ходе осуществления молекулярно-генетической верификации 50 штаммов риккетсий установлено, что 25 штаммов было представлено видом *Rickettsia sibirica sensu stricto*, 2 штамма – *R. sibirica* BJ-90, 3 – *R. heilongjiangensis*, 1 – *R. slovaca*, 10 – *R. tarasevichae* и 9 – *R. raoultii* (RpA4-5, DnS28-3, DnS14-1) [13, 14]. Определена филогенетическая позиция идентифицированных штаммов риккетсий (рис. 1).

Наряду с классическим генотипом – *R. sibirica sensu stricto*, широко распространенном, по нашим данным, в нозоареале КР, на Дальнем Востоке РФ и в Северном Китае, в клещах *Dermacentor silvarum* выявляют генотип *R. sibirica* BJ-90. Штамм «Приморье-32/84» *R. sibirica subsp. BJ-90* выделен из клещей *D. silvarum* в нашей лаборатории Т.А. Решетниковой за шесть лет до изоляции первых китайских штаммов этого вида риккетсий (1990 г.). *R. heilongjiangensis* формально описана как новый вид в 2003 г. [6]. Необходимо отметить, что штаммы *R. heilongjiangensis* были изолированы в ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора значительно раньше первых китайских штаммов, однако они идентифицированы лишь в последние годы [14]. Первый штамм нового вида риккетсий выделил В.К. Ястребов в 1966 г. из клещей *Haemaphysalis concinna*, собранных в Алтайском крае. Еще два штамма *R. heilongjiangensis*, выделенные из клещей *H. concinna*, собранных в

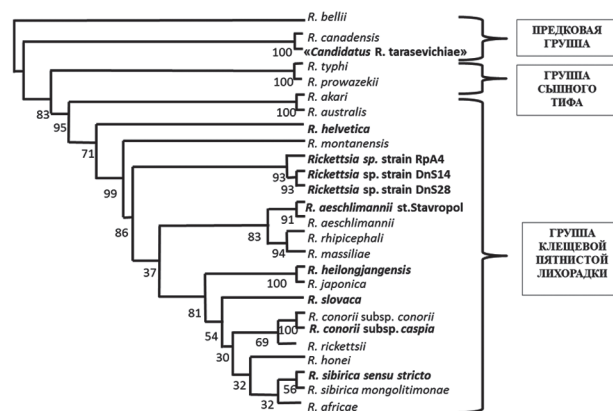


Рис. 1. Филогенетические позиции риккетсий группы КПЛ, выявленных в России. Филогенетическое дерево построено при сравнении нуклеотидных последовательностей гена цитрат синтазы (*gltA*) применением neighbour-joining метода и программы DNAPARS в версии PHYLIP с методом максимальной вероятности (maximum-likelihood)

Приморском крае в 1981 г. (т.е. тоже до первых китайских штаммов), хранятся в нашей коллекции.

Штамм «Карпунино 19/69» показал 100 % гомологии с *R. slovaca*. Этот вид риккетсий из группы КПЛ был впервые изолирован J.Rehacek в 1968 г. из клещей *D. marginatus* в Чехословакии. Штамм «Карпунино 19/69» был изолирован М.С.Шайманом в 1969 г. из клещей *D. marginatus* в Курганской области и спустя 34 г. идентифицирован, как *R. slovaca* [14].

Эти результаты показывают, что на территории Российской Федерации, кроме *R. sibirica* и возбудителя астраханской пятнистой лихорадки, распространены и другие патогенные для человека риккетсии группы КПЛ – *R. heilongjiangensis* и *R. slovaca*, а также впервые показывают наличие в Приморском крае геноварианта *R. sibirica* – *Rickettsia* sp. BJ-90, что необходимо учитывать при эпидемиологическом надзоре и диагностике заболеваний.

Типологическая характеристика распространения патогенных для человека риккетсий группы КПЛ в России

На основании полученных данных удалось осуществить районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки в хозяйствах – иксовых клещах [2]. Выделено 2 основных географических региона:

- Восточно-Европейский с циркуляцией возбудителя астраханской пятнистой лихорадки и *R. slovaca* (дермаценторно-рипицефалисный);

- Азиатский с циркуляцией *R. slovaca*, *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*» (дермаценторно-гемафизалисный), в котором можно выделить четыре области: дермаценторную (маргинатусно-ретикулятусную) с циркуляцией *R. sibirica* и *R. slovaca*; дермаценторно-гемафизалисную сибирскую (сибирское пятно ареала *H. concinna*) с циркуляцией *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*»; дермаценторную (нутталлиево-сильварумную) с циркуляцией *R. sibirica* и возможно «*R. heilongjiangensis*»; дермаценторно-гемафизалисную дальневосточную (пятно ареала *H. concinna* на Дальнем Востоке) с циркуляцией *R. sibirica* и «*R. heilongjiangensis*».

Типирование штаммов лиссавирусов, выделенных на территории Российской Федерации

В результате молекулярно-генетического анализа лиссавирусов установлено, что выделенные нами в 2008 г. вирусы группировались в пределах пяти филогенетических групп (арктической, прибалтийской, восточно-европейской лесной, степной, сибирско-дальневосточной) классического бешенства (вид *Rabies virus*), циркуляция которых была установлена в стране к 2003 г. [10]. Вирусы, выделенные в 2008 г. на юге Красноярского края и в Тыве, совместно с нашими и ранее секвенированными изолятами из юго-восточной Европы, Урала, Западной Сибири и Казахстана сформировали отдельный монофилетический кластер (bootstrap 99 %). Это общая группа вирусов степного типа [10].

Вирусы из Красноярского края, Тывы и Монголии в пределах этого кластера (bootstrap 83 %) сформировали отдельную подгруппу, образующую две ветви: первая – представители юга Красноярского края и один изолят из Тывы, вторая – изоляты из Монголии и Тывы. Так как изоляты с территории Тывы входят в обе ветви, то, возможно, что бешенство проникло в Красноярский край и Хакасию в результате выноса инфекции с территории Тывы и Монголии (по долине Енисея) [11]. Это подтверждается тем, что точка регистрации первого случая в Красноярском крае наиболее близка к границам Тывы. Известно также, что бешенство активизировалось в западных аймаках Монголии в 1999–2000 гг. [1].

При включении в анализ большего числа последовательностей от изолятов с территории Монголии, собранных в 2006–2008 гг. [3], вирусы из Красноярского края (2008 г.), Тывы (2008 г.) и Монголии в пределах кластера степных вирусов формируют группу с еще большей поддержкой – 93 bootstrap (рис. 2). Данный факт также свидетельствует о возможном выносе возбудителя из Монголии на территорию России.

В Тыве бешенство регистрировали четырежды через 12, 17 и 10 лет. На 4-й раз, вероятно, произошел вынос инфекции на юг Красноярского края, где очаг

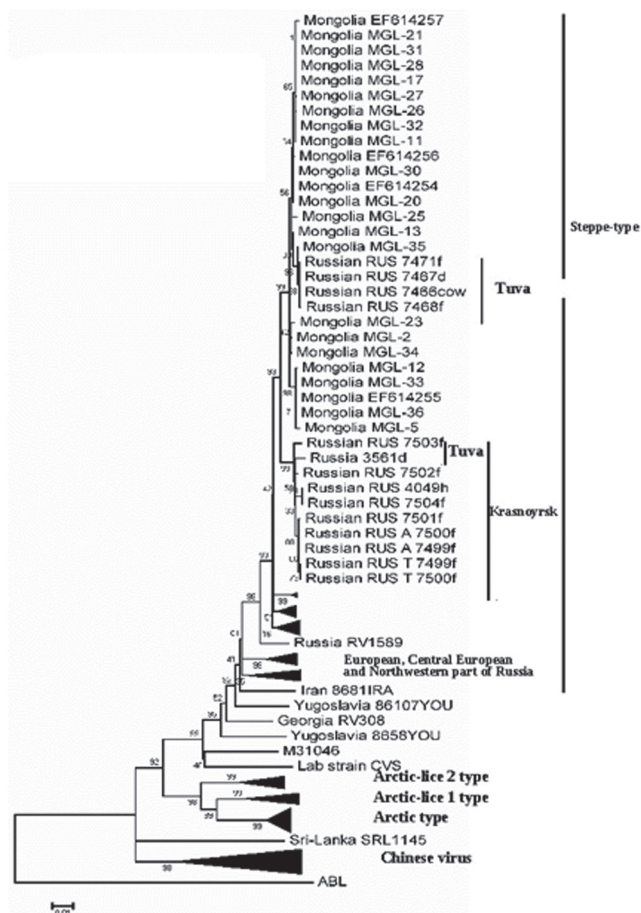


Рис. 2. Филогенетическое дерево, полученное NJ методом для 152 изолятов вируса бешенства секвенированием полного гена N (1302 нуклеотида)

укоренился и стал функционировать относительно автономно. Изоляты с Тывы, выделенные в прошлые годы, группируются с Монгольскими и современными Тувинскими. Возможно, заносы бешенства на юг Восточной Сибири являются результатом периодической активизации природных очагов в южной Азии. Однако проанализированные изоляты из Китая представляют собой совершенно самостоятельную группу, и пока это предположение не подтверждается.

В остальных подгруппах в группе степных вирусов совместно группируются представители с различных территории Урала, Западной Сибири и Казахстана, а также вирусы, циркулирующие в юго-восточной Европе и Нижнем Поволжье.

Вероятно, бешенство в Западную Сибирь и на Урал попадает с юга Казахстана. Возможно, имеют место обратные миграции бешеных хищников в Казахстан с территории России.

Таким образом, особенностью ситуации по бешенству в южной части Восточной Сибири в последнее десятилетие является резкое увеличение доли лиц в структуре заболеваемости и распространение инфекции на ранее благополучные территории. По данным молекулярно-генетического и картографического анализа, бешенство на юг Восточной Сибири, возможно, проникло в результате выноса инфекции с территории Монголии через Тыву. Вирусы с юга Западной Сибири группируются совместно с изолятами с территории Казахстана, Урала, Нижнего Поволжья и юго-восточной Европы. Молекулярно-генетические исследования оказывают существенную помощь в установлении путей распространения инфекции, что определяет их актуальность и практическую значимость.

Полученные результаты могут составить основу единой системы молекулярного типирования возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней и будут способствовать созданию на базе ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» референс-центров по лабораторной диагностике и мониторингу возбудителей природно-очаговых риккетсиозов и лабораторной диагностике и мониторингу бешенства.

Одним из важнейших разделов работы референс-центров станет применение молекулярных методов типирования при изучении штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки и вируса бешенства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ботвинкин А.Д., Отгонбаатар Д. Бешенство на сопредельных территориях России и Монголии (исторический обзор). Сибирский мед. журн. 2006; 7:8–10.
2. Шпынов С.Н., Рудаков Н.В. Районирование территории Российской Федерации по распространению патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 4:26–30.
3. Boldbaatar B., Inoue S., Tuya N., Dulam P., Batchuluun

D., Sugiura N. et al. Molecular Epidemiology of Rabies Virus in Mongolia, 2005–2008. Jpn. J. Infect. Dis. 2010; 63(5):358–63.

4. Dessen P., Fondrat C., Valencien C., Mugnier C. BISANCE: a French service for access to biomolecular sequence databases. Comput. Appl. Biosci. 1990; 6(4):355–6.

5. Fournier P.-E., Roux V., Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998; 48(3):839–49.

6. Fournier P.-E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y., Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5456–65.

7. Johnson N., Black C., Smith J., Un H., McElhinney L.M., Aylan O., Fooks A.R. Rabies emergence among foxes in Turkey. J. Wildl. Dis. 2003; 39(2):262–70.

8. Kimura M.A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. J. Mol. Evol. 1980; 16:111–20.

9. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. 2001; 17:1244–5.

10. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M. et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. J. Wildl. Dis. 2004; 40(4):617–31.

11. Poleshchuk E.M., Tkachev S.E., Gribencha S.V., Sidorov G.N. Rabies virus in Russia: phylogenetic relationships based on N gene sequences. In: Japan-Russia International Workshop 2010. The 54th ISTC Japan Workshop. Current Life-Threatening Infections. Medical Countermeasures. Medical Exchange and Networks. Tokyo-Niigata; 2010. P. 28–9.

12. Roux V., Rydkina E., Ereemeeva M., Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997; 47:252–61.

13. Rudakov N.V., Shpynov S.N., Samoylenko I.E., Fournier P.-E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Raoult D. Characterisation of the Omsk collection of rickettsial strains. Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15 Suppl 2:298–9.

14. Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K. et al. Short report: Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74(3):440–3.

15. Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F. Walking along the rabies genome: Is the large G-L intergenic region a remnant gene? Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986; 83:3914–8.

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

1. Botvinkin A.D., Otgonbaatar D. [Rabies in contiguous areas of Russia and Mongolia: historical review]. Sibirsky Med. Zhurn. 2006; 7:8–10.
2. Shpynov S.N., Rudakov N.V. [Zonation of the Russian Federation's territory according to the spread of pathogenic Rickettsias of the tick-borne spotted fever group]. Med. Parazit. Parazitar. Bol. 2008; 4:26–30.

Authors:

Shpynov S.N., Poleshchuk E.M., Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Kolomeets A.N., Sidorov G.N. Omsk Research Institute of Natural Focus Infections. Mira Avenue, 7, Omsk, 644080, Russia. E-mail: stan63@inbox.ru

Shpynov S.N., Rudakov N.V., Kumpan L.V. Omsk State Medical Academy. Omsk, Russia.

Tkachev S.E. Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS. Akademik Lavrentyev Avenue, 8, Novosibirsk, 630090, Russia.

Gribencha S.V. D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology. Gamaleya St., 16, Moscow, 123098, Russia.

Об авторах:

Шпынов С.Н., Полещук Е.М., Рудаков Н.В., И.Е.Самойленко, Решетникова Т.А., Кумпан Л.В., Коломеец А.Н., Сидоров Г.Н. Омский НИИ природно-очаговых инфекций. 644080, Омск, проспект Мира, 7. E-mail: stan63@inbox.ru

Шпынов С.Н., Рудаков Н.В., Кумпан Л.В. Омская государственная медицинская академия. Омск.

Ткачев С.Е. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 8.

Грибенча С.В. Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Иванковского РАМН. 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

Поступила 22.08.11.

А.Н.Микеров

**ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В МОДУЛИРОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ
ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ЛЕГКИХ ПРИ ПНЕВМОНИИ***ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского», Саратов*

В обзоре представлены современные данные о факторах, участвующих в модулировании механизмов иммунной защиты легких при пневмонии. Рассмотрена роль белка SP-A в обеспечении резистентности к инфекционным болезням легких. Показано отрицательное воздействие озона на белок SP-A. Отмечено наличие гендерных особенностей в заболеваемости пневмонией и чувствительности к озону.

Ключевые слова: иммунная защита легких, сурфактантный белок А, иммуномодуляторы, озон, гендер, пневмония.

A.N.Mikeroov

**Factors Participating in Modulating the Mechanisms of Immune Protection
of Lungs during Pneumonia***Saratov State Medical University, Saratov*

Presented are the modern data about factors modulating the mechanisms of immune protection of lungs during pneumonia. Considered is the role of protein A (SP-A) in provision of lungs resistance to infectious disease. The negative impact on protein A (SP-A) by ozone is shown. Noted is the existence of the gender particularities in pneumonia morbidity and sensitivity to ozone.

Key words: lung immune defense, surfactant protein A, immunomodulators, ozone, gender, pneumonia.

Заболевания легких остаются одной из самых актуальных проблем современного здравоохранения. Согласно статистическим данным Министерства здравоохранения и социального развития (www.minzdravsoc.ru), в России в 2009 г. зарегистрировано около 600 тыс. больных пневмонией, включая приблизительно 200 тыс. детей в возрасте до 14 лет. Показатели заболеваемости имеют тенденцию к росту. В связи с этим является актуальной идентификация факторов, участвующих в модулировании механизмов иммунной защиты легких при пневмонии и, соответственно, влияющих на заболеваемость населения инфекционными легочными болезнями.

Поверхность альвеолярного эпителия легких покрыта сурфактантом, функция которого связана со снижением поверхностного натяжения в легких, необходимым для осуществления дыхания, и регулированием механизмов иммунного ответа. Основным белком легочного сурфактанта, обладающим выраженными иммуномодулирующими свойствами, является белок SP-A (Surfactant Protein A). Опсонизация и агрегация патогенных микроорганизмов белком SP-A способствуют их последующему фагоцитозу и киллингу. Показано, что белок SP-A влияет на размножение и жизнеспособность микроорганизмов, повышая проницаемость микробной клеточной мембраны [39], стимулирует хемотаксис макрофагов [38], влияет на пролиферацию клеток иммунного ответа [5] и продукцию провоспалительных цитокинов [36], повышает продукцию реактивных оксидантов [33], стимулирует фагоцитоз бактерий и вирусов [15,

16, 23, 27], регулирует механизмы иммунной защиты в легких путем связывания звеньев врожденного и приобретенного компонентов иммунитета [6]. О ведущей роли белка SP-A в обеспечении резистентности к инфекционным заболеваниям легких свидетельствуют данные, полученные при использовании генетически модифицированных SP-A (-/-) нокаут мышей, у которых отсутствует ген *SP-A*. Показано, что SP-A (-/-) мыши были более восприимчивы к экспериментальной пневмонии [21].

Функции SP-A, описанные выше, были изучены, при использовании SP-A грызунов или SP-A человека, полученного из бронхоальвеолярного лаважа. Однако SP-A человека состоит из двух генных продуктов – SP-A1 и SP-A2, структура и функция которых различна. При этом уровни SP-A1 и SP-A2 у различных индивидуумов в бронхоальвеолярном лаваже могут быть различными [32]. Белок SP-A собирается как октадекамер, состоящий из шести тримерных субъединиц, хотя ранее было показано, что каждый тример SP-A человека состоит из двух молекул SP-A1 и одной молекулы SP-A2 [34]. Недавние данные [23, 24, 36] показали, что также могут существовать тримеры, состоящие из продукта только одного гена белка SP-A. Функциональные различия между SP-A1 и SP-A2 касаются их способности стимулировать фагоцитоз [23], связывать углеводы [28], стимулировать продукцию TNF- α [36]. Во всех этих случаях SP-A2 обладал большей активностью, чем SP-A1. Было показано, что аминокислотный остаток в позиции 85 отвечает за структурные и функциональные разли-

чия между SP-A1 и SP-A2 вариантами [35].

Поскольку продукты гена SP-A2 функционально более активны, чем продукты гена SP-A1, мы предполагаем, что общая активность SP-A в легких зависит не столько от общего содержания SP-A, сколько от соотношения SP-A1 к SP-A2. Поэтому изменения в экспрессии генов SP-A1 и SP-A2 могут привести к неадекватному или неблагоприятному соотношению SP-A вариантов в легких, что, в свою очередь, может внести вклад в неэффективное модулирование механизмов иммунной защиты в легких и, соответственно, повлиять на остроту и продолжительность легочных инфекционных заболеваний.

Легкие человека находятся в постоянном контакте с вредными компонентами воздушной среды. Поэтому повышенный уровень антропогенного загрязнения воздуха в крупных городах может отражаться на антиинфекционной резистентности легких и негативно влиять на иммунный статус населения. Известно, что тропосферный озон является вторичным фотохимическим загрязнителем воздуха и активным оксидантом. В последние годы во всем мире уделяется большое внимание озону в связи с его значительным воздействием на здоровье населения. Установлено, что повышенная концентрация озона в приземном слое воздуха вызывает раздражение органов дыхания, кашель, тяжесть в груди, способствует развитию астмы и увеличивает количество ее приступов, может повреждать ткани и подвергать белки окислительной модификации, что, в свою очередь, может приводить к снижению защитной функции легких и повышению восприимчивости к респираторным инфекциям [4, 12]. Нарушение целостности респираторного эпителия [14] и рекрутирование нейтрофилов в респираторный тракт [3] в результате ингаляции озона оказывают повреждающее действие на легочную ткань [1] и могут влиять на иммунный статус легких [12].

Оксиданты, такие как озон, влияют на структуру и функции сурфактантной системы [25]. Функционирование белка SP-A в системе иммунной защиты легких в условиях повышенного содержания озона в воздухе может отличаться от такового в нормальных условиях, что, в свою очередь, может повлиять на восприимчивость организма к легочным инфекциям. Как сильный окислитель озон может оказывать влияние на способность белка SP-A модулировать механизмы иммунной защиты легких. Действительно, окисление SP-A озоном приводило к снижению его способности взаимодействовать с альвеолярными макрофагами [30] и регулировать продукцию цитокинов [37]. После обработки озоном снижалась способность SP-A связываться с углеводными лигандами [29], повышать фагоцитоз вирусов [30], а также грамположительных и грам-отрицательных бактерий [22]. При этом функция SP-A2 была более подвержена влиянию озона, чем функция SP-A1 [22]. Более того, блокирование функции SP-A в легких (*in*

vivo) путем его окисления повышало чувствительность мышей к экспериментальной пневмонии после ингаляции озона [21].

Таким образом, нарушение функциональной активности белка SP-A вследствие его окислительной модификации озоном может быть одним из механизмов, которые играют значительную роль в повышении восприимчивости населения к пневмонии при увеличении содержания озона в воздухе [9, 19, 31]. В то же время, для разных индивидуумов отмечена различная восприимчивость к воздействию ингаляции озона [8, 13, 17]. Поскольку SP-A1 и SP-A2 имеют различную активность, а разные индивидуумы могут обладать различными соотношениями SP-A1 и SP-A2 в легких [32], окисление белка SP-A озоном воздуха может объяснять индивидуальную вариабильность в чувствительности к пневмонии.

Для ряда легочных заболеваний человека характерно влияние гендера. Известно, что недоношенные новорожденные мальчики подвержены респираторному дистресс-синдрому чаще, чем девочки [26], а мужчины в большей степени, чем женщины – идиопатическому легочному фиброзу и хронической обструктивной болезни легких [7, 11]. В большинстве случаев мужчины более подвержены заболеванию пневмонией, чем женщины, и имеют менее благоприятный прогноз течения болезни [10, 11, 18]. Все это свидетельствует о комплексном влиянии гендера на возникновение легочных заболеваний и их течение.

Вопрос влияния гендера в человеческой популяции на чувствительность к загрязнению воздушной среды остается открытым. В ряде исследований показано, что представители женского пола более чувствительны к загрязнению воздуха. Однако в других работах гендерные различия не обнаружены [2]. Более того, в подавляющем большинстве работ гендер как фактор не рассматривался, а восприимчивость представителей разного пола к инфекционным заболеваниям легких в условиях загрязнения воздуха, в частности в условиях оксидантной нагрузки, не исследовалась. Использование экспериментальных моделей позволило комплексно изучить эффект ингаляции озона на выживание лабораторных мышей после заражения пневмонией. Было показано, что, хотя самцы изначально были более чувствительны к пневмонии, чем самки, ингаляция озона изменяла тренд на противоположный, делая самок мышей более восприимчивыми к пневмонии [20]. Следовательно, изначальное преимущество самок перед самцами в отношении смертности от легочной инфекции элиминировалось и оказывалось даже фактором риска в случае ингаляции озона перед заражением пневмонией.

Таким образом, благоприятное течение и исход пневмонии зависит не только от эффективного функционирования механизмов иммунной защиты легких, но и от таких факторов, как степень загрязнения

воздушной среды и гендер, что подчеркивает актуальность комплексного подхода к оценке факторов, участвующих в модулировании механизмов иммунной защиты при пневмонии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 2003; 31:S195–9.
2. Annesi-Maesano I, Agabiti N, Pistelli R, Couilliot M.F, Forastiere F. Subpopulations at increased risk of adverse health outcomes from air pollution. *Eur. Respir. J. Suppl.* 2003; 40:57s–63s.
3. Bassett D, Elbon-Copp C, Otterbein S, Barraclough-Mitchell H, Delorme M, Yang H. Inflammatory cell availability affects ozone-induced lung damage. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2001; 64:547–65.
4. Bernstein J.A., Alexis N., Barnes C., Bernstein I.L., Bernstein J.A., Nel A., Peden D., Diaz-Sanchez D., Tarlo S.M., Williams P.B. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 114:1116–23.
5. Borron P., McCormack F.X., Elhalwagi B.M., Chroneos Z.C., Lewis J.F., Zhu S., Wright J.R., Shepherd V.L., Possmayer F., Inchley K., Fraher L.J. Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 1998; 275:L679–86.
6. Brinker K.G., Garner H., Wright J.R. Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003; 284:L232–41.
7. Caracta C.F. Gender differences in pulmonary disease. *Mt. Sinai. J. Med.* 2003; 70:215–24.
8. Devlin R.B., McDonnell W.F., Mann R., Becker S., House D.E., Schreinemachers D., Koren H.S. Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 4:72–81.
9. Fischer P., Hoek G., Brunekreef B., Verhoeff A., van Wijnen J. Air pollution and mortality in The Netherlands: are the elderly more at risk? *Eur. Respir. J.* 2003; 21(40 Suppl):34s–38s.
10. Gannon C.J., Pasquale M., Tracy J.K., McCarter R.J., Napolitano L.M. Male gender is associated with increased risk for postinjury pneumonia. *Shock.* 2004; 21:410–4.
11. Gordon H.S., Rosenthal G.E. The relationship of gender and in-hospital death: increased risk of death in men. *Med. Care.* 1999; 37:318–24.
12. Hollingsworth J.W., Kleeberger S.R., Foster W.M. Ozone and pulmonary innate immunity. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007; 4:240–6.
13. Horstman D.H., Folinsbee L.J., Ives P.J., Abdul-Salaam S., McDonnell W.F. Ozone concentration and pulmonary response relationships for 6.6-hour exposures with five hours of moderate exercise to 0.08, 0.10, and 0.12 ppm. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142:1158–63.
14. Kehrl H.R., Vincent L.M., Kowalsky R.J., Horstman D.H., O'Neil J.J., McCartney W.H., Bromberg P.A. Ozone exposure increases respiratory epithelial permeability in humans. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135:1124–8.
15. Khubchandani K.R., Oberley R.E., Snyder J.M. Effects of surfactant protein A and NaCl concentration on the uptake of *Pseudomonas aeruginosa* by THP-1 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001; 25:699–706.
16. Kudo K., Sano H., Takahashi H., Kurokawa K., Yokota S., Fujii N., Shimada K., Yano I., Kumazawa Y., Voelker D.R., Abe S., Kuroki Y. Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J. Immunol.* 2004; 172:7592–602.
17. Kulle T.J., Sauder L.R., Hebel J.R., Chatham M.D. Ozone response relationships in healthy nonsmokers. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 132:36–41.
18. Loeb M., McGeer A., McArthur M., Walter S., Simor A.E. Risk factors for pneumonia and other lower respiratory tract infections in elderly residents of long-term care facilities. *Arch. Intern. Med.* 1999; 159:2058–64.
19. Medina-Ramon M., Zanobetti A., Schwartz J. The effect of ozone and PM10 on hospital admissions for pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease: a national multicity study. *Am. J. Epidemiol.* 2006; 163:579–88.
20. Mikerov A.N., Gan X., Umstead T.M., Miller L., Chinchilli V.M., Phelps D.S., Floros J. Sex differences in the impact of ozone on survival and alveolar macrophage function of mice after *Klebsiella pneumoniae* infection. *Respir. Res.* 2008; 9:24.
21. Mikerov A.N., Haque R., Gan X., Guo X., Phelps D.S., Floros J. Ablation of SP-A has a negative impact on the susceptibility of mice to *Klebsiella pneumoniae* infection after ozone exposure: sex differences. *Respir. Res.* 2008; 9:77.
22. Mikerov A.N., Umstead T.M., Gan X., Huang W., Guo X., Wang G., Phelps D.S., Floros J. Impact of ozone exposure on the phagocytic activity of human surfactant protein A (SP-A) and SP-A variants. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2008; 294:L121–30.
23. Mikerov A.N., Wang G., Umstead T.M., Zacharatos M., Thomas N.J., Phelps D.S., Floros J. Surfactant protein A2 (SP-A2) variants expressed in CHO cells stimulate phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* more than Do SP-A1 variants. *Infect. Immun.* 2007; 75:1403–12.
24. Mikerov A.N., White M., Hartshorn K., Wang G., Floros J. Inhibition of hemagglutination activity of influenza A viruses by SP-A1 and SP-A2 variants expressed in CHO cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 2008; 197(1):9–12.
25. Muller B., Seifart C., Barth P.J. Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system. *Eur. J. Clin. Invest.* 1998; 28:762–77.
26. Nielsen H.C. Testosterone regulation of sex differences in fetal lung development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 199:446–52.
27. Oberley R.E., Ault K.A., Neff T.L., Khubchandani K.R., Crouch E.C., Snyder J.M. Surfactant proteins A and D enhance the phagocytosis of *Chlamydia* into THP-1 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2004; 287:L296–306.
28. Oberley R.E., Snyder J.M. Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2003; 284:L871–81.
29. Oosting R.S., van Greevenbroek M.M., Verhoef J., van Golde L.M., Haagsman H.P. Structural and functional changes of surfactant protein A induced by ozone. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:L77–83.
30. Oosting R.S., Van Iwaarden J.F., Van Bree L., Verhoef J., Van Golde L.M., Haagsman H.P. Exposure of surfactant protein A to ozone *in vitro* and *in vivo* impairs its interactions with alveolar cells. *Am. J. Physiol.* 1992; 262:L63–8.
31. Peel J.L., Tolbert P.E., Klein M., Metzger K.B., Flanders W.D., Todd K., Mulholland J.A., Ryan P.B., Frumkin H. Ambient air pollution and respiratory emergency department visits. *Epidemiology.* 2005; 16(2):164–74.
32. Tagaram H.R., Wang G., Umstead T.M., Mikerov A.N., Thomas N.J., Graff G.R., Hess J.C., Thomassen M.J., Kavuru M.S., Phelps D.S., Floros J. Characterization of a human surfactant protein A1 (SP-A1) gene-specific antibody; SP-A1 content variation among individuals of varying age and pulmonary health. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292(5):L1052–63.
33. van Iwaarden F., Welters B., Verhoef J., Haagsman H.P., van Golde L.M. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1990; 2:91–8.
34. Voss T., Melchers K., Scheirle G., Schaffer K.P. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 4:88–94.
35. Wang G., Myers C., Mikerov A., Floros J. Effect of cysteine 85 on biochemical properties and biological function of human surfactant protein A variants. *Biochemistry.* 2007; 46:8425–35.
36. Wang G., Phelps D.S., Umstead T.M., Floros J. Human SP-A protein variants derived from one or both genes stimulate TNF- α production in the THP-1 cell line. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000; 278:L946–54.
37. Wang G., Umstead T.M., Phelps D.S., Al Mondhiry H., Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110:79–84.
38. Wright J.R., Youmans D.C. Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 1993; 264:L338–44.
39. Wu H., Kuzmenko A., Wan S., Schaffer L., Weiss A., Fisher J.H., Kim K.S., McCormack F.X. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J. Clin. Invest.* 2003; 111:1589–602.

Authors:

Mikerov A.N. Saratov State Medical University. Saratov, Russia.
E-mail: a_mikerov@mail.ru

Об авторах:

Микеров А.Н. Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского. Саратов, Россия. E-mail: a_mikerov@mail.ru

Поступила 15.12.11.

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис, О.М.Кудрявцева, А.Ю.Гончарова, Л.В.Новикова, Т.Н.Каштанова,
Ю.А.Попов, Е.А.Смолькова, А.Л.Кравцов, Т.Н.Щуковская

ВЛИЯНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА, СИНТЕЗИРУЕМОГО АСПОРОГЕННЫМ РЕКОМБИНАНТНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS ANTHRACIS*, НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

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

На модели мышей линии BALB/c и морских свинок проведена оценка иммуногенности и безопасности препарата протективного антигена, полученного из аспорогенного рекомбинантного продуцента *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo⁻). Показано, что развитие адаптивного иммунитета у иммунизированных очищенным белком лабораторных животных характеризуется высокими значениями титров специфических антител. Двукратная иммунизация биомodelей антигенным препаратом обеспечивает защиту от заражения тест-штаммом *B. anthracis*, сопоставимую с протективностью живой сибирезвеной вакцины. Получены данные, свидетельствующие о возможности уменьшения вводимой дозы вакцинного штамма при последующей однократной иммунизации протективным антигеном. Установлено, что в иммунизирующей дозе рекомбинантный протективный антиген не обладает реактогенностью и не оказывает повреждающего действия на тимоциты и спленоциты лабораторных животных.

Ключевые слова: сибирская язва, протективный антиген, иммунитет, антитела.

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis, O.M.Kudryavtseva, A.Yu.Goncharova, L.V.Novikova, T.N.Kashtanova, Yu.A.Popov,
E.A.Smol'kova, A.L.Kravtsov, T.N.Shchukovskaya

Influence of the Protective Antigen, Produced by *Bacillus anthracis* Asporogenic Recombinant Strain, on the Immune System of Laboratory Animals

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Assessment of immunogenicity and biological safety of protective antigen preparation obtained from asporogenic recombinant producer, *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo⁻), is made on the mice (BALB/c species) and Guinea pigs models. It is shown that the development of adaptive immunity in the inoculated with purified protein laboratory animals is characterized by high titers of specific antibodies. Double immunization of biological models with antigen preparation confers protection from *B. anthracis* infection, commensurable with protective capacity of the live anthrax vaccine. Obtained are the data confirming the possibility to reduce the injected dose of the vaccine strain in case of subsequent single immunization with protective antigen. It is determined that recombinant protective antigen shows no sign of reactogenicity and does not damage thymocytes and splenocytes in laboratory animals when administered for immunization.

Key words: anthrax, protective antigen, immunity, antibodies.

Особо опасная зооантропонозная инфекция – сибирская язва, вызываемая *Bacillus anthracis*, характеризуется острым началом и тяжелым течением. При несвоевременной диагностике и отсутствии этиотропной терапии летальность при сибирезвеной инфекции может достигать 90 % [4]. Ключевой момент патогенеза заболевания – воздействие экзотоксина возбудителя на инфицированный макроорганизм [6, 7]. Токсин *B. anthracis* состоит из трех компонентов – отежного фактора, летального фактора и протективного антигена (ПА). ПА, с одной стороны, участвует в образовании токсичных комплексов, а с другой – является основным иммуногеном возбудителя сибирской язвы.

Важным профилактическим мероприятием, осуществляемым на территориях стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации, является вакцинация населения и восприимчивых животных с использованием живых аттенуированных вакцин. Выраженное защитное действие живых вакцин сочетается с относительно высокой частотой развития побочных эффектов [1].

Избежать нежелательных последствий можно, используя для вакцинации очищенный препарат иммуногенного антигена возбудителя. Оптимальным источником ПА могут служить штаммы *B. anthracis*, лишенные детерминант синтеза основных факторов патогенности [5]. Использование в качестве продуцентов ПА сибирезвеной штаммов, не образующих спор, позволяет избежать микробной контаминации лабораторных и производственных помещений. В ходе предыдущих работ в лаборатории прикладной генетики РосНИПЧИ «Микроб» был сконструирован аспорогенный рекомбинантный штамм *B. anthracis*, содержащий гибридную плазмиду с клонированным геном *pag*, кодирующим синтез ПА. Из культурального фильтрата штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔTPA-1(Spo⁻) выделен ПА, достигнута высокая степень очистки препарата (90 %) за счет использования двухэтапной хроматографии [3].

Целью настоящей работы явилась оценка иммуногенности и безопасности препарата очищенного ПА на различных экспериментальных моделях.

Материалы и методы

Штаммы, лабораторные животные. В работе использовали рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) (KM97, патент РФ № 2321629); вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1; тест-заражающий штамм *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского (ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва).

Исследования проводили на морских свинках массой от 250 до 300 г и линейных мышах BALB/c – от 18 до 20 г.

Приготовление спор штаммов сибиреязвенного микроба. Культуру иммунизирующего или тест-заражающего штаммов *B. anthracis* выращивали в течение 3–5 сут на агаре Хоттингера при температуре 37 °С. Биомассу смывали с поверхности агара и дважды отмывали дистиллированной водой. Перед иммунизацией или заражением споры прогревали при температуре 65 °С в течение 30 мин.

Выделение и очистка ПА из рекомбинантного штамма. ПА выделяли из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻). Антиген очищали двухэтапной хроматографией как описано ранее [3].

Иммунизация лабораторных животных. Очищенный ПА в сочетании с полным адъювантом Фрейнда (в объемном соотношении 2:1) вводили лабораторным животным подкожно двукратно с интервалом 14 дней. Иммунизирующая доза для морских свинок составила 25 мкг, для мышей BALB/c – 10 мкг. Инъекцию споровой взвеси вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 осуществляли подкожно однократно в дозах $5 \cdot 10^6$ или $5 \cdot 10^7$ КОЕ для морских свинок и $2 \cdot 10^6$ КОЕ для линейных мышей. Контрольным животным вводили 0,9 % раствор натрия хлорида.

Определение иммуногенности антигенного препарата и вакцинного штамма *B. anthracis*. Через 21 день от последней иммунизации биомоделей заражали возрастающими дозами тест-штамма *B. anthracis* 2-ая вакцина Ценковского. Для иммунизированных морских свинок концентрация спор тест-заражающего штамма составила от $1 \cdot 10^4$ до $1 \cdot 10^7$ КОЕ, а для интактных – от $1 \cdot 10^1$ до $1 \cdot 10^4$ КОЕ. Иммунизированным линейным мышам вводили споровую взвесь в дозах от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^6$ КОЕ, контрольным животным – от $1 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^5$ КОЕ. Наблюдение за зараженными животными осуществляли в течение 10 дней. Значение ЛД₅₀ тест-заражающего штамма подсчитывали по формуле Кербера. Индексы иммунитета определяли как отношение ЛД₅₀ заражающей культуры для вакцинированных и интактных животных.

Постановка твердофазного иммуноферментного анализа. Очищенный ПА вносили в лунки 96-луночных планшетов («Медполимер», Санкт-Петербург) в концентрации 5–10 мкг/мл. Меченые пероксидазой видоспецифические антигены (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва) использовали в рабочем разведении 1:1000. В качестве

хромогенного субстрата использовали ABTS (Sigma, США). Результаты регистрировали спектрофотометрически с помощью Stat Fax (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм.

Цитофлуориметрический мониторинг пролиферативной активности спленоцитов и тимоцитов. Линейным мышам вводили ПА в дозе 10 мкг однократно подкожно. Лимфоциты тимуса и селезенки выделяли общепринятыми методами [2]. Окрашивание лимфоцитов проводили смесью бромид этидия и митрамицина в течение 20 мин. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUYWE (Германия).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования определяли напряженность и длительность поствакцинального иммунитета. Лабораторных животных иммунизировали ПА, полученным из аспорогенного рекомбинантного продуцента. В качестве группы сравнения использовали биомоделей, иммунизированных вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1. Забор крови осуществляли из краевой ушной вены у морских свинок и из хвостовой вены у линейных мышей в различные сроки – на 7, 14, 21, 28-е сутки, а также через 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4,5 месяца после начала иммунизации. Титр антител к ПА определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Отмечены следующие особенности антителообразования у мышей линии BALB/c. После двукратной иммунизации дозой 10 мкг очищенного препарата ПА происходило постепенное нарастание титров специфических антител. К 21-му дню иммуногенеза титр анти-ПА антител составил 1/2560, а через 2 месяца он достигал максимального значения – 1/40000 (рис. 1). Вслед за пиком отмечали снижение титров до уровня 1/20000 – через 2,5 месяца, 1/5120 – через 3–3,5 месяца, и 1/640 – через 4,5 месяца. В сыворотках животных, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1,

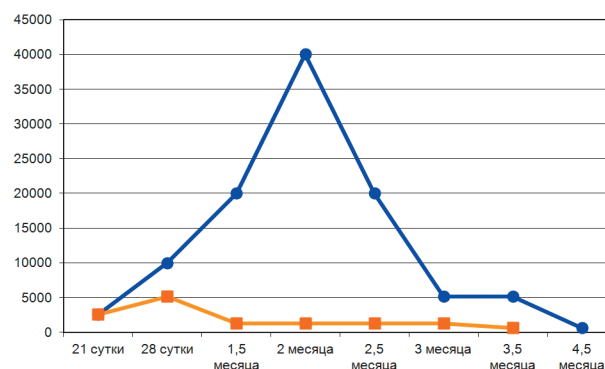


Рис. 1. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации линейных мышей BALB/c препаратом ПА (линия синего цвета) или вакцинным штаммом (линия оранжевого цвета):

По оси абсцисс – сутки и месяцы после иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров сывороточных анти-ПА антител. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 5 особей животных

максимум анти-ПА антител выявлялся на 28-е сутки – $1/5120$. В дальнейшем выявляли титры на уровне $1/1280$ – через 1,5–3 месяца, и $1/640$ – через 3,5 месяца. На протяжении всего срока наблюдения титры антител к ПА у мышей, иммунизированных антигенным препаратом, были выше.

После двукратной иммунизации морских свинок дозой 25 мкг рекомбинантного ПА отмечали повышение титров анти-ПА антител – до $1/1280$ к 21-м суткам, $1/5120$ – к 2 месяцам (рис. 2). Пик антителогенеза ($1/40000$) регистрировали через 2,5 месяца от начала эксперимента. В случае иммунизации споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1 ($5 \cdot 10^6$ КОЕ) максимальный титр антител к ПА в сыворотках животных отмечали через 1,5 месяца – $1/2560$. В целом во все сроки количество антител к ПА у биомоделей, иммунизированных антигенным препаратом, было примерно в 2–4 раза больше.

Параллельно в течение первых двух недель проводили оценку реактогенности вводимого экспериментальным моделям препарата ПА. Каждые два дня определяли массу тела морских свинок и линейных мышей, осматривали и пальпировали место инъекции. За время наблюдения не отмечалось снижения веса лабораторных животных. Визуальных и пальпаторных изменений на месте введения препарата не регистрировали.

На следующем этапе оценивали способность ПА защищать лабораторных животных от заражения различными дозами тест-штамма *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского. В экспериментах были использованы морские свинки и мыши линии BALB/c по 20 особей в каждой. Опытных биомоделей иммунизировали ПА или вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1. Животных контрольной группы оставляли интактными. Заражение осуществляли через 21 день от последней иммунизации. По истечении периода наблюдения, через 10 сут, подсчитывали значения ЛД₅₀ тест-заражающего штамма и индексов иммунитета.

Необходимо отметить, что в течение поствакци-

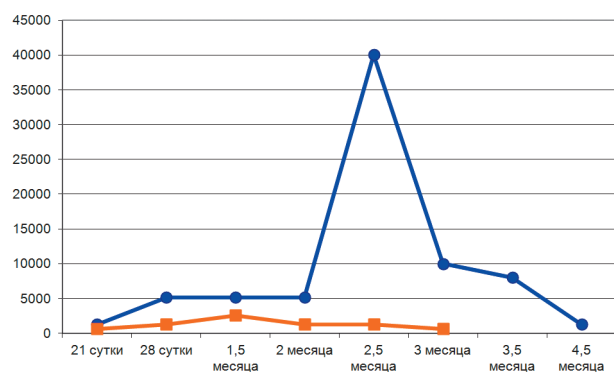


Рис. 2. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации морских свинок препаратом ПА (линия синего цвета) или вакцинным штаммом (линия оранжевого цвета):

По оси абсцисс – сутки и месяцы после иммунизации.
По оси ординат – обратные значения титров сывороточных анти-ПА антител. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

нального периода среди морских свинок, иммунизированных вакцинным штаммом, пало около 25 % особей, тогда как в других группах подобных случаев зафиксировано не было.

В исследовании на модели линейных мышей были получены следующие результаты. В группе интактных животных показатель ЛД₅₀ составил $5 \cdot 10^2$ спор штамма *B. anthracis* 2-я вакцина Ценковского. Для биомоделей, иммунизированных ПА, значение ЛД₅₀ было на два порядка выше – $7,9 \cdot 10^4$ спор. Степени защиты при иммунизации препаратом ПА в дозе 10 мкг и вакцинным штаммом *B. anthracis* СТИ-1 в дозе $2 \cdot 10^6$ КОЕ были сопоставимы. В последнем случае показатель ЛД₅₀ составил $3,1 \cdot 10^4$ спор. Соответственно индексы иммунитета оказались практически одного порядка: для препарата ПА – 158,5, для *B. anthracis* СТИ-1 – 63,2.

В экспериментах на морских свинках наблюдали аналогичную тенденцию. Препарат ПА, полученный из аспорогенного рекомбинантного штамма, в дозе 25 мкг обладал протективностью на уровне вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1. Показатель ЛД₅₀ тест-заражающего штамма для иммунизированных антигенным препаратом свинок составил $1,9 \cdot 10^7$ спор, в то время как для интактных животных он был ниже на четыре порядка – $5 \cdot 10^3$ спор. Значение ЛД₅₀ тест-штамма для биомоделей, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1 в дозе $5 \cdot 10^7$ КОЕ, оказалось $2 \cdot 10^7$ спор, а в дозе $5 \cdot 10^6$ КОЕ – $3,1 \cdot 10^6$ спор. Следовательно, индексы иммунитета у животных, получивших препарат ПА и вакцинный штамм (в дозе $5 \cdot 10^7$ КОЕ), были почти одинаковыми – 3980 и 3990.

На модели морских свинок тестировали также комбинированную схему иммунизации. Лабораторным животным сначала вводили дозу $5 \cdot 10^6$ КОЕ штамма *B. anthracis* СТИ-1, а затем в конце поствакцинального периода (через 21 день) – 25 мкг очищенного рекомбинантного ПА в сочетании с адьювантом. В этом случае значение ЛД₅₀ регистрировали на уровне $1,7 \cdot 10^7$ спор, индекс иммунитета составил 3548. Полученные результаты свидетельствуют о возможности уменьшения вводимой дозы вакцинного штамма при дополнительной однократной иммунизации препаратом рекомбинантного антигена.

Для оценки влияния препарата ПА на иммунную систему биомоделей проводили исследование пролиферативной активности лимфоцитов органов центрального и периферического иммуногенеза. В качестве биомодели были выбраны линейные мыши BALB/c. Лабораторных животных (по 6 особей на каждый срок) иммунизировали подкожно препаратом ПА. Контролем служили интактные животные. Пробы тимуса и селезенки забирали через 4 ч, на 1, 3, 7 и 14-е сутки после иммунизации. Процентное соотношение тимоцитов и спленоцитов в фазах клеточного деления регистрировали с помощью проточного цитофлуориметра. В каждом образце анализировалось не менее 30000 клеток. Апоптоз оценивали по накоплению гиподиплоидных клеток в пике, рас-

Распределение тимоцитов и спленоцитов линейных мышей BALB/c, иммунизированных рекомбинантным протективным антигеном, по клеточному циклу

Иммунизирующий препарат	Срок иммуногенеза	Пролиферирующие клетки, %	Апоптотические клетки, %	Баланс
<i>Тимус</i>				
Контроль		28,7±1,5	3,6±0,3	0,12
ПА 10 мкг	4 ч	32,4±0,8	3,2±0,3	0,10
	1 сут	32,8±0,9	2,8±0,2	0,09
	3 сут	30,1±1,3	2,3±0,5	0,08
	7 сут	30,9±2,7	3,1±0,5	0,10
	14 сут	26,6±0,7	2,8±0,2	0,10
<i>Селезенка</i>				
Контроль		27,7±1,6	2,8±0,3	0,10
ПА 10 мкг	4 ч	25,5±2,5	4,5±0,8	0,18
	1 сут	24,2±0,8	4,4±1,2	0,18
	3 сут	22,7±1,9	5,8±1,4	0,25
	7 сут	33,7±1,6	5,2±1,3	0,15
	14 сут	33,7±2,4	2,4±0,4	0,07

полагающемся левее пика, соответствующего диплоидным клеткам. Активацию иммунокомпетентных клеток отражало их число в стадии пролиферации. Определяли также соотношение клеток, находящихся в стадии апоптоза и пролиферации. Значение данного индекса меньше единицы свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемого препарата на иммунокомпетентные клетки.

При иммунизации линейных мышей очищенным препаратом ПА во все сроки исследования апоптотическая и пролиферативная активность клеток тимуса существенно не отличалась от аналогичных показателей в группе контроля (таблица). Баланс апоптоза и пролиферации не превышал 1,0. В пробах селезенки, взятых через 4 ч, на 1-е и 3-и сутки, число пролиферирующих спленоцитов соответствовало контрольным значениям. На 7 и 14-е сутки регистрировали повышение пролиферативной активности клеток селезенки, что может быть обусловлено пролиферацией В-клеток и антителопродукцией. Введение мышам ПА не влияло на апоптотическую активность спленоцитов. Индекс соотношения клеток селезенки в стадии апоптоза и пролиферации не превышал 1,0.

Таким образом, синтезируемый рекомбинантным аспорогенным штаммом антиген вызывает развитие у лабораторных животных напряженного адаптивного иммунитета, характеризующегося высокими значениями индексов иммунитета и титров специфических антител. Показано, что в иммунизирующей дозе препарат ПА не обладает реактогенностью и не оказывает повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки органов центральной и периферической иммунной системы. Планируется расширение исследований по изучению взаимодействия рекомбинантного ПА с клетками врожденного и адаптивного иммунитета.

Работа выполнена по государственному контракту № 62-Д/2 от 23.08.2011 в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система хими-

ческой и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2012 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В. и др. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2008. 416 с.
2. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.; 2000.
3. Микиш Н.И., Кудрявцева О.М., Шулепов Д.В., Гончарова А.Ю., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В. и др. Аспорогенный рекомбинантный продуцент протективного антигена сибиреязвенного микроба. Биотехнология. 2010; 4:25–33.
4. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харечко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В. и др. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 447 с.
5. Baillie L. Is new always better than old? The development of human vaccines for anthrax. Hum. Vaccin. 2009; 5(12):806–16.
6. Koehler T. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. Mol. Aspects Med. 2009; 30:386–96.
7. Mock M., Fouet A. Anthrax. Microbiol. Rev. 2001; 55:647–71.

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

1. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V. et al. [Human Anthrax: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnosis, Treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.
2. Medical Laboratory Technologies. Reference Book. St. Petersburg; 2000.
3. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Shulepov D.V., Goncharova A.Yu., Bolotnikova M.F., Novikova L.V. et al. [Asporogenic recombinant producer of anthrax protective antigen]. Biotechnologia. 2010; 4:25–33.
4. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoy N.V. et al. [Anthrax: Relevant Issues of Microbiology, Epidemiology, Clinical Picture, Treatment and Prophylaxis]. M.: Ministry of Health of the Russian Federation; 1999. 447 p.

Authors:

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Novikova L.V., Kashtanova T.N., Popov Yu.A., Smol'kova E.A., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Попова П.Ю., Микиш Н.И., Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Новикова Л.В., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А., Смолькова Е.А., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 06.09.11.

Ал.А.Сергеев, Л.Е.Булычев, О.В.Пьянков, Ар.А.Сергеев, С.А.Боднев, А.С.Кабанов, Ю.В.Туманов,
И.А.Юрганова, Л.Н.Шишкина, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ К ВИРУСУ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.

Проведено изучение чувствительности к вирусу оспы обезьян (ВОО) различных видов животных (белые мыши, кролики, мини-свиньи и сурки). Установлено, что чувствительными животными к ВОО являются сурки (ID_{50} и $LD_{50} < 2,2$ лг БОЕ при подкожном заражении) и мыши ($ID_{50} = 4,8$ лг и $LD_{50} > 5$ лг БОЕ при интраназальном заражении). Наиболее выраженные внешние клинические признаки заболевания отмечались у сурков: оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. У большинства павших сурков самые высокие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и коже с оспинами ($> 6,0$ лг БОЕ/г). Заболевание у мышей по сравнению с сурками сопровождалось более скудной симптоматикой: гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти, тогда как у мини-свиней и кроликов каких-либо визуальных проявлений заболевания не наблюдалось.

Ключевые слова: вирус оспы обезьян, сурок, мышь, кролик, мини-свинья, интраназальное инфицирование, подкожное инфицирование, 50 % летальная доза, 50 % инфицирующая доза.

Al.A.Sergeev, L.E.Bulychev, O.V.P'yankov, Ar.A.Sergeev, S.A.Bodnev, A.S.Kabanov, Yu.V.Tumanov,
I.A.Yurganova, L.N.Shishkina, A.P.Agaonov, A.N.Sergeev

Sensitivity of Different Animal Species to Monkeypox Virus

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region

Studied is the sensitivity of different animal species (white mice, rabbits, mini-pigs, and marmots) to Monkeypox virus (MPXV). Determined is the fact that MPXV-sensitive are groundhogs (ID_{50} and $LD_{50} < 2,2$ lg of PFU in case of subcutaneous inoculation) and mice ($ID_{50} = 4,8$ lg and $LD_{50} > 5$ lg of PFU in case of intranasal inoculation). The most pronounced clinical signs of the disease such as varioliform eruption all over body and mucous linings, purulent discharges out of nasal cavity, lymphadenitis, loss of coordination, tremor of extremities, fever, hyper-aggressiveness, disheveled hair have been registered in groundhogs. The highest viral loads in the majority of fallen marmots have been observed in nasal mucosa, trachea, lungs, and pock-marked skin ($> 6,0$ lg PFU/g). The symptomatology of the disease in mice as compared to groundhogs is a bit milder: purulent conjunctivitis, blepharitis, and disheveled hair. As for mini-pigs and rabbits, no visual signs of the disease have been observed in them.

Key words: Monkeypox virus, marmot, mouse, rabbit, mini-pig, intranasal inoculation, subcutaneous inoculation, 50 % lethal dose, 50 % infective dose.

Широко известно, что при разработке препаратов для лечения, профилактики и диагностики инфекционных болезней у людей очень важно проводить исследования на животных, моделирующих соответствующий инфекционный процесс у человека.

Что касается вируса оспы обезьян (ВОО), то в качестве таких животных ряд исследователей использует нечеловекообразных приматов, луговых собак, африканских белок и иммунодефицитных мышей [6, 10, 11, 12]. В то же время для ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», единственной в России организации, работающей с вирусами натуральной оспы и оспы обезьян, использование этих видов модельных животных крайне затруднительно. Это связано с высокой стоимостью нечеловекообразных обезьян и большими сложностями, возникающими с приобретением луговых собак и африканских белочек из стран дальнего зарубежья, требующим регулярного проведения экспортного и таможенного контроля. С другой стороны, использование иммунодефицитных мышей неадекватно моделирует инфекционный процесс, который возникает во время вспышки оспы

обезьян среди людей, так как эта болезнь, в основном, была зарегистрирована у людей с нормальной иммунной системой.

Целью настоящих исследований (на первом этапе разработки модельной биосистемы) явилось изучение чувствительности к ВОО различных видов животных (белые мыши, кролики, мини-свиньи и сурки).

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали Центрально-Африканский штамм ВОО V79-1-005 из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Путем культивирования этого штамма на культуре клеток Vero были приготовлены два препарата вирусосодержащей суспензии (биологическая концентрация первого препарата составляла $1,3 \cdot 10^7$ бляшкообразующих единиц в мл – БОЕ/мл, а второго – $5,0 \cdot 10^6$ БОЕ/мл). Первый препарат в дальнейшем использовался для инфицирования сурков, а второй – для мини-свиней, мышей и

кроликов. Вирусосодержащий материал перед экспериментами хранили при температуре минус 70 °С.

Животные. В исследованиях использовали интактных беспородных разнополых белых 8–15-суточных мышей ICR (массой 9–11 г) и 1,5-месячных кроликов породы шиншилла (массой 1500 г), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Кроме того, исследованиям подвергали разнополых 1,5-месячных сурков вида Байбак со средней массой тела (1230±347) г, полученных из Пушкинского питомника Московской области в количестве 16 голов, а также разнополых 2-месячных свиней породы Сибирская мини-свинья (мини-свиньи) со средней массой тела (6000±2000) г, полученных из питомника ИЦиГ СО РАН Новосибирской области в количестве 16 голов.

Наблюдение за инфицированными животными осуществляли в течение 21 сут с момента заражения. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [2].

Методы инфицирования животных. Заражение сурков проводили путем подкожного (п/к) введения (в холку) по 1 мл вирусосодержащего материала в дозах $1,3 \cdot 10^7$, $3,9 \cdot 10^5$, $1,2 \cdot 10^4$, $3,5 \cdot 10^2$ БОЕ. Мини-свиней, кроликов и мышей инфицировали интраназальным (и/н) способом, вводя вирусосодержащую жидкость мини-свиньям и кроликам по 0,5 мл в каждую ноздрю (суммарно 1,0 мл), а мышам – 0,03 мл суммарно в обе ноздри. При этом мышам и мини-свиней заражали ВОО в дозах 10^5 , 10^3 , 10^1 , 10^{-1} БОЕ, а кроликов – в дозах 10^4 , 10^2 , 10^0 БОЕ. Эти эксперименты были проведены с целью определения 50 % инфицирующих и летальных доз (ID_{50} и LD_{50}) ВОО.

Определение специфичности гибели животных. Факт гибели сурков вследствие инфекции, вызванной ВОО, подтверждали путем определения наличия жизнеспособного вируса в гомогенатах органов.

Изучение накопления вируса в органах навиших животных. Образцы органов (стенки носовой полости, трахея, сердце, легкие, печень, поджелудочная

железа, почки, селезенка, головной мозг, поднижнечелюстные, паховые, подмышечные и брызжеечные лимфоузлы, яички, яичники и кусочки кожи с оспинами) брали после гибели у п/к инфицированных сурков. С целью приготовления 10 % гомогенатов органы животных дезинтегрировали механическим способом с помощью пестика в ступке с речным песком. Перед вирусологическим исследованием гомогенаты органов и тканей инфицированных сурков хранили при температуре -70 °С.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах органов и тканей животных проводили традиционным методом бляшек путем их титрования или посева на культуру клеток Vero [8].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1].

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проведены исследования по определению чувствительности разных видов животных к ВОО при и/н и п/к заражении, результаты которых представлены в табл. 1. Через 6–8 сут после заражения (п/з) у сурков регистрировали ряд внешних клинических признаков заболевания (оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти), и через 11–21 сут п/з наступал летальный эффект. Сыпь на теле сурков имела дискретный характер с постепенно сменяющимися форменными элементами (макула, папула, везикула, пустула, корка), рисунок. Отмечено, что с увеличением дозы заражения ВОО уменьшался срок жизни инфицированных животных. В то же время, и/н инфицирование ВОО не приводило к летальности среди мышам. Тем не менее, начиная с 7-х суток п/з, у них отмечали внешние клинические признаки заболевания (гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти), которые исчезали через 11–13 сут п/з. У

Таблица 1

Данные биологической активности штамма вируса оспы обезьян V79-1-005 при интраназальном и подкожном заражении различных видов животных

Наименование показателя	Вид животного			
	Мышь	Сурок	Кролик	Мини-свинья
Способ заражения	Интраназальный	Подкожный	Интраназальный	Интраназальный
ID_{50} * (в lg БОЕ), $M \pm I_{95}$	4,8±0,3	<2,5	>4,0	>5
LD_{50} (в lg БОЕ)	>5,0	<2,5	>4	>5
Клинические признаки заболевания	Гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти	Оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти	Отсутствуют	Отсутствуют

Примечание: * – величина определена по внешним клиническим проявлениям заболевания; М – средняя 50 % летальная доза; I_{95} – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %.



Сыпь на коже после заражения сурка
Центрально-Африканским штаммом V79-1-005
вируса оспы обезьян

остальных взятых в эксперимент животных (кроликов и мини-свиней) не выявлено внешних клинических признаков заболевания и тем более летального эффекта при использованных дозах заражения ВОО. Исходя из представленных результатов, чувствительными животными, учитывая внешние клинические признаки заболевания и летальность, являются сурки (ID_{50} и $LD_{50} < 2,2$ lg БОЕ при п/к заражении) и мыши ($ID_{50} = 4,8$ lg и $LD_{50} > 5$ lg БОЕ при и/н заражении).

На втором этапе были определены концентрации ВОО в органах павших сурков, результаты которых представлены в табл. 2. При этом наибольшие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и участках кожи с оспинами ($> 7,3$ lg БОЕ/г).

В научной литературе [4, 7, 12] имеются данные о высокой чувствительности к ВОО луговых собак

и белок, относящихся к семейству беличьих. Кроме того, клиническая картина заболевания у этих животных напоминает таковую у человека. В наших же исследованиях был взят другой представитель этого же семейства – сурок. Этот вид животных из семейства беличьих оказался наиболее доступным для нас, так как сурков в настоящее время выращивают в некоторых зверохозяйствах России. Проведенные эксперименты с использованием сурков показали их высокую чувствительность к ВОО, причем, кроме летального эффекта, у них наблюдалась клиническая картина соответствующего заболевания, в общем виде напоминающая таковую у луговых собачек и белок. Из всех исследованных органов павших сурков самые высокие концентрации вируса регистрировались в органах респираторной системы (не считая кожи с оспинами), что, вероятно, свидетельствует о выраженной чувствительности дыхательного тракта этого вида животных к данному возбудителю и поддерживает точку зрения, касающуюся большой значимости аэрогенного пути передачи инфекции, вызванной ВОО.

В экспериментальных исследованиях, проведенных на 8–15-суточных мышках и 1,5-месячных кроликах, некоторыми учеными получены данные о 100 % летальности этих животных при и/н инфицировании штаммом Копенгаген ВОО в дозе 6 lg БОЕ [9]. В наших же исследованиях на мышках того же возраста, судя по наличию внешних клинических признаков заболевания, при дозе 4,8 lg БОЕ отмечалось только 50 % их инфицирование, а у кроликов при инфицирующей дозе 4 lg БОЕ отсутствовала какая-либо визуальная клиническая симптоматика. Такое несоответствие полученных результатов объясняется, скорее всего, различием используемых в экспериментах штаммов ВОО и доз заражения.

Следует отметить, что при использовании тра-

Таблица 2

Данные накопления вируса оспы обезьян в органах павших сурков

Вид органа	Титр вируса в органах следующих животных в lg БОЕ/мл [$M \pm I_{95}$] (lg БОЕ/г):				
	№1	№2	№3	№4	№5
Мозг	5,1±0,1 (5,6)	4,8±0,1 (5,3)	3,7±0,2 (4,1)	1,5±0,5 (2,1)	<0,7 (1,2)
Стенка слизист. носа	>5,7 (7,3)	4,5±0,1 (6,4)	>5,7 (6,8)	5,1±0,4 (6,1)	>5,7 (6,6)
Трахея и с участком ее бифуркации	>5,7 (7,3)	>5,7 (7,4)	4,8±0,1 (6,4)	3,2±0,1 (4,3)	5,0±0,3 (7,3)
Легкие	>5,7 (7,3)	4,9±0,1 (6,5)	4,1±0,1 (5,0)	5,0±0,3 (5,9)	>5,7 (6,8)
Сердце	2,6±0,7 (3,2)	<0,7 (1,4)	1,0±0,3 (2,0)	<0,7 (1,2)	1,5±0,4 (2,0)
Печень	2,6±0,5 (3,2)	<0,7 (2,3)	<0,7 (1,3)	<0,7 (1,1)	3,6±0,5 (4,0)
Селезенка	<0,7 (1,5)	<0,7 (1,4)	2,0±0,5 (3,0)	<0,7 (1,2)	<0,7 (1,4)
Поджел. железа	4,8±0,1 (5,6)	<0,7 (1,7)	3,2±0,4 (4,4)	<0,7 (1,5)	2,6±0,3 (3,2)
Почка	4,3±0,2 (4,8)	4,3±0,1 (4,8)	>5,7 (6,3)	<0,7 (0,9)	3,0±0,1 (4,0)
Поднижнечелюст. л/у	4,2±0,4 (5,8)	<0,7 (2,3)	4,1±0,3 (5,4)	3,0±0,2 (4,1)	5,1±0,3 (6,1)
Подмышечн. л/у	5,7±0,1 (6,5)	1,5±0,3 (2,0)	4,9±0,2 (6,2)	<0,7 (1,6)	<0,7 (2,0)
Паховые л/у	<0,7 (2,3)	4,9±0,2 (6,2)	>5,7 (6,7)	3,1±0,5 (3,7)	4,0±0,3 (5,1)
Брызж. л/у	<0,7 (2,0)	2,7±0,3 (3,3)	4,7±0,1 (5,7)	<0,7 (1,2)	<0,7 (2,0)
Яичко или яичник	<0,7 (2,0)	>5,7 (7,0)	>5,7 (6,8)	5,2±0,5 (6,2)	>5,7 (6,0)
Кусочек кожи с оспинкой	>5,7 (6,3)	>5,7 (7,9)	>5,7 (7,4)	<0,7 (1,5)	>5,7 (6,8)

Примечание: М – средняя величина концентрации вируса; I_{95} – доверительный интервал для М с вероятностью 95 %.

диционного метода и/н заражения мышей около 97 % вирусосодержащего материала попадает в желудочно-кишечный тракт и лишь около 3 % – в респираторный (наши данные, полученные с использованием физической метки). При этом, если учесть только количество апплицированного в дыхательном тракте материала, то ИД₅₀ ВОО для мышей в нашем случае должна быть существенно ниже (на 1,5 lg БОЕ). В этом смысле аэрозольный метод инфицирования животных и и/н, но с введением лишь микроколичеств вирусосодержащего материала на слизистую носа (как это делают некоторые исследователи [7]), являются наиболее эффективными, если рассматривать только респираторный путь инфицирования животных.

Ряд исследователей [6] отмечает снижение массы тела и взъерошенность шерсти у взрослых мышей BALB/c и C57BL/6 при и/н инфицировании только Центральным-Африканским штаммом ВОО, который является высоковирулентным для человека [5], в отличие от Западно-Африканского штамма, обладающего низкой вирулентностью. В нашем же случае при инфицировании штаммом Центральным-Африканского происхождения беспородных мышей ICR в тех же дозах заражения отмечались и другие ярко выраженные признаки заболевания: гнойный конъюнктивит и блефарит. Зарегистрированная нами более богатая клиническая симптоматика у этого вида животных объясняется, вероятно, существенной разницей в возрасте взятых в эксперименты мышей.

В нашей работе, кроме сурков, мышей и кроликов, исследованию были подвергнуты и мини-свиньи, несмотря на то, что этот вид животных ранее никто не использовал в своей работе с ВОО. Необходимость использования нами в экспериментах мини-свиней была обусловлена их выраженным сходством (по сравнению с другими видами лабораторных животных) с человеком по анатомии и физиологии сердечно-сосудистой и пищеварительной систем, строению кожи и картам генома клеток [3]. Тем не менее, чувствительность этих животных при и/н заражении ВОО оказалась более низкой, чем у человека.

Таким образом, в результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что чувствительными животными к ВОО являются сурки (ИД₅₀ и ЛД₅₀ < 2,5 lg БОЕ при п/к заражении) и мыши (ИД₅₀ = 4,8 lg БОЕ и ЛД₅₀ > 5 lg БОЕ при и/н заражении). При этом наиболее выраженные внешние клинические признаки заболевания отмечались у сурков: оспоподобная сыпь на коже по всей поверхности тела и слизистых, гнойные выделения из носовой полости, лимфаденит, нарушение координации, тремор конечностей, лихорадка, повышенная агрессивность, взъерошенность шерсти. У большинства павших сурков самые высокие концентрации вируса были обнаружены в стенке слизистой носа, трахее, легких и коже с оспинами (> 6,0 lg БОЕ/г). Заболевание у мышей по сравнению с сурками сопровождалось более скудной симптоматикой: гнойный конъюнктивит,

блефарит, взъерошенность шерсти, а у мини-свиней и кроликов каких-либо визуальных проявлений заболевания вообще не наблюдалось.

В рамках полученных результатов с целью завершения исследований по разработке модельной биосистемы для оценки эффективности действия лекарственных препаратов и диагностических тест-систем при оспе обезьян в дальнейшем предполагается акцентировать внимание только на двух видах испытанных нами животных: беспородных белых мышках ICR и сурках вида Байбак.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962. 256 с.
2. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
3. Тихонов В.Н. Лабораторные мини-свиньи: генетика и медико-биологическое использование. Новосибирск: Изд-во СО РАН; 2010. 304 с.
4. Ходакевич Л.Н. Экологические и эпидемиологические аспекты оспы обезьян. М.; 1990. 320 с.
5. Chen N., Li G., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Jahrling P.B. et al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo Basin. J. Virol. 2005; 340:46–63.
6. Hutson C.L., Abel J.A., Carroll D.S., Olson V.A., Braden Z.H., Hughes C.M. et al. Comparison of West African and Congo Basin Monkeypox Viruses in BALB/c and C57BL/6 Mice. Plos One 2009; 5(1):e8912.
7. Hutson C.L., Carroll D.S., Self J., Weiss S., Hughes C.M., Braden Z. et al. Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease. J. Virol. 2009; 402:72–82.
8. Lepar-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M-H, Fuchs F., Crance J-M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. J. Clin. Virol. 2005; 32:47–52.
9. Marennikova S.S., Seluhina E.M. Susceptibility of some rodent species to monkeypox virus, and course of the infection. Bull. World Health Organ. 1976; 53:13–20.
10. Marriott K.A., Parkinson C.V., Morefield S.I., Davenport R., Nichols R., Monath T.P. Clonal vaccinia virus grown in cell culture fully protects monkeys from lethal monkeypox challenge. Vaccine. 2007; 26:581–8.
11. Osorio J.E., Iams K.P., Meteyer C.U., Roche T.E. Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by *in vivo* imaging. Plos One 2009; 4(8):e6592.
12. Schultz D.A., Sagartz J.E., Huso D.L., Mark R., Buller L. Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus. J. Virol. 2009; 383(1):86–92.

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]. L.; 1962. 256 p.
2. National Research Council. [Guide for the Maintenance and Use of Laboratory Animals]. Washington; 1996.
3. Tikhonov V.N. [Laboratory Mini-Pigs: Genetics and Medical-Biological Usage]. Novosibirsk; 2010. 304 p.
4. Khodakevich L.N. [Ecological and Epidemiological Aspects of Monkeypox]. M.; 1990. 320 p.

Authors:

Sergeev A.A., Bulychev L.E., Pyankov O.V., Ar.A.Sergeev, Bodnev S.A., Kabanov A.S., Tumanov Yu.V., Yurganova I.A., Shishkina L.N., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сergeev A.A., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Туманов Ю.В., Юрганова И.А., Шишкина Л.Н., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 20.06.11.

Г.А.Афанасьева, Н.П.Чеснокова

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИНЦИПОВ ДЕПОТЕНЦИРОВАНИЯ ЛЕТАЛЬНОГО ЭФФЕКТА ТОКСИНОВ *YERSINIA PESTIS*

ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет», Саратов

Эффективным препаратом, обеспечивающим снижение летальной активности сочетанного воздействия липополисахарида и «мышинного» токсина *Y. pestis* является цитофлавин – антигипоксикант субстратного и регуляторного действия. Положительное корригирующее воздействие на летальную активность токсинов чумного микроба оказывает также эмоксипин – синтетический антирадикальный препарат, эффекты которого усиливаются контрикалом, клексаном и гемодезом.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, токсины, летальная активность, медикаментозная коррекция.

G.A.Afanas'eva, N.P.Chesnokova

Pathogenetic Grounds of Principles of Depotentiatio of Lethal Effects *Y. pestis* toxins

Saratov State Medical University, Saratov

Lethal combination of lypopolysaccharide and "mouse" *Y. pestis* toxin is decreased by the use of effective preparation - Cytoflavinum, the antihypoxant of substrate and regulatory activity. The positive resolving impact to the lethal activity of toxins of plague microbe provides also Emoxipinum, the synthetic preparation, the effect of which is enhanced by the use of Contrykal, Klexan, hemodez.

Key words: *Yersinia pestis*, toxins, lethal activity, medication.

Результаты экспериментов на моделях чумной интоксикации, достигаемых внутрибрюшинным введением животным различной видовой принадлежности (белые мыши и крысы) возрастающих доз липополисахарида (ЛПС), «мышинного» токсина *Yersinia pestis*, а также их сочетания, убедительно свидетельствуют о выраженной активации процессов липопероксидации, недостаточности ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы клеток крови и тканей различных органов [1–3].

Экспериментальные исследования были проведены на беспородных белых мышах обоего пола на модели чумной интоксикации, вызываемой внутрибрюшинным сочетанным введением ЛПС и «мышинного» токсина *Y. pestis* в дозах, эквивалентных ЛД₅₀. Токсины приготовлены в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» [6].

Определение и расчет летальной активности токсинов проводились по методу Литчфилда-Уилкоксона (1949) в модификации Ю.И.Иванова, О.Н.Погорелюк (1990).

Детоксицирующий эффект комплексов фармакологических препаратов оценивали на стадии выраженных клинических проявлений интоксикации спустя 4 ч после сочетанного введения токсинов по уровню молекул средней массы (МСМ) в сыворотке крови экспериментальных животных (В.И.Гудим, Н.И.Габриэлян, 1985) – интегративному показателю тяжести аутоинтоксикации.

Проведена сравнительная оценка эффектов различных комплексов препаратов со свойствами

антигипоксикантов, антиоксидантов и мембранопротекторов, которые вводились животным внутрибрюшинно в средних терапевтических дозах спустя 30 мин после инъекции токсинов (наблюдение за животными в течение 24 ч после введения токсинов) [4–5]. Первый комплекс включал реамберин, унитиол, диметилсульфоксид, селенит натрия. Во втором комплексе вместо реамберина использовался цитофлавин. Третий комплекс содержал эмоксипин, контрикал, клексан и гемодез.

В серии экспериментов по изучению возможностей фармакологической коррекции летальной активности токсинов *Y. pestis*, где использовался первый комплекс, не происходило достоверного снижения летальной активности ЛПС и «мышинного» токсина. Таким образом, использование в целях депотенцирования патогенных эффектов эндотоксина и «мышинного» токсина *Y. pestis* реамберина, антигипоксиканта субстратного действия в сочетании с другими антигипоксикантами, антиоксидантами и мембранопротекторными препаратами оказалось недостаточным для снижения летальной активности указанных токсинов.

Во втором варианте экспериментов вместо реамберина использовали цитофлавин, обладающий свойствами антигипоксиканта субстратного и регуляторного типа. Установлено увеличение продолжительности жизни и выживаемости белых мышей, то есть достоверное снижение летальной активности токсинов и, соответственно, возрастание ЛД₅₀ ($p < 0,001$) на фоне ограничения аутоинтоксикации и снижения уровня МСМ ($p < 0,001$). Таким образом, второй комплекс

препаратов, отличающийся от первого лишь заменой реамберина на цитофлавин, является достаточно эффективным.

В третьей серии экспериментов, где в целях депотенцирования летального эффекта ЛПС и «мышинного» токсина чумного микроба было использовано сочетанное введение эмоксипина, контрикала, клексана и гемодеза, также обнаружено снижение уровня МСМ в сыворотке крови ($p < 0,001$), увеличение продолжительности жизни и выживаемости белых мышей, то есть достоверное снижение летальной активности токсинов и увеличение их ЛД₅₀ ($p < 0,001$).

Полученный в данной модификации экспериментов положительный результат медикаментозной коррекции обусловлен способностью использованных препаратов обеспечивать стабилизацию биологических мембран, нормализацию коагуляционного потенциала крови, микрогемодинамики.

Тем не менее, сравнивая результаты депотенцирования летальной активности токсинов *Y. pestis* третьего и второго комплекса препаратов, следует отметить более высокий эффект воздействия цитофлавина в сочетании с унитиолом, димексидом и селенитом натрия.

Результаты проведенных нами исследований позволяют заключить, что летальный эффект сочетанного воздействия ЛПС и «мышинного» токсина *Y. pestis* в определенной степени можно уменьшить с помощью медикаментозной коррекции, включающей использование антиоксидантов и мембранопротекторов.

Эффективным препаратом, обеспечивающим снижение летальной активности указанных токсинов, является цитофлавин – антигипоксикант субстратного и регуляторного действия, включающий янтарную кислоту, рибоксин, рибофлавин и никотинамид.

Положительное корректирующее воздействие на летальную активность токсинов чумного микроба оказывает также эмоксипин – синтетический антира-

дикальный препарат, эффекты которого усиливаются контрикалом, клексаном и гемодезом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы нарушений реологических свойств крови под влиянием «мышинного» токсина *Y. pestis*. Саратовский научно-медицинский журн. 2007; 4:43–8.
2. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Значение активации процессов липопероксидации в развитии цитопатогенных эффектов фракции FII («мышинного» токсина). Вестник Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И.Вавилова. 2008; 2:18–9.
3. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Будник И.А. О патогенетической значимости активации процессов липопероксидации в механизмах нарушений реологических свойств крови при бактериальном эндотоксикозе. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2008; 1:3–8.
4. Бизенкова М.Н., Чеснокова Н.П., Романцов М.Г. Метаболические эффекты цитофлавина при острой экспериментальной гипоксической гипоксии. Успехи современного естествознания. 2007; 9:45–8.
5. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов. ФАРМиндекс-Практик. 2003; 5:85–111.
6. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Studies on Immunization against Plague. I. The Isolation and Characterization of the soluble Antigen of *Pasturella pestis*. J. Immunol. 1952; 68:131–45.
7. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Über die extraction von bacterien mit phenol. Z. Naturforsch. Teil. 1952; 7:533–69.

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

1. Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P. [Molecular-cellular mechanism of disturbances of the blood rheological properties under influence of "mouse" toxin *Y. pestis*]. Saratov. Nauchno-Meditsin. Zh. 2007; 4:43–8.
2. Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P. [Significance of activation of lipid peroxidation in the development of cytopathogenic effects of fraction FII ("mouse" toxin)]. Vestn. Saratovs. Gosudars. Agrarn. Univer. N.I.Vavilova. 2008; 2:18–9.
3. Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P., Budnik I.A. [On the pathogenetic significance of activation of lipid peroxidation in the mechanisms of disturbance of blood rheological properties in bacterial endotoxemia]. Izvest. Vysh. Ucheb. Zaved. Povolz. Reg. Meditsin. Nauki. 2008; 1:3–8.
4. Bizenkova M.N., Chesnokova N.P., Romanov M.G. [Metabolic effects of Cytoflavinum in experimental acute hypoxic hypoxia]. Uspekhi Sovr. Estestv. 2007; 9:45–8.
5. Okovityi S.V. [Clinical pharmacology of anti-oxidants]. FARMindex-Practic. 2003; 5:85–111.

Authors:

Afanas'eva G.A., Chesnokova N.P. Saratov State Medical University. B. Kazach'a St., 112, 410012, Saratov, Russia.

Об авторах:

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112.

Поступила 23.01.11.

Е.Н.Кочетов, А.И.Богачева, Ю.В.Андрущенко

ПОДГОТОВКА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ФОРМИРОВАНИЙ ЦГИЭ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия», Саранск

Представлены данные о проведении вторых республиканских соревнований групп санитарно-эпидемиологической разведки ЦГИЭ в Республике Мордовия. Отмечено, что соревнования проходили в условиях, имитирующих ЧС различного происхождения. Особенность соревнований заключалась в том, что все этапы были значительно усложнены, для обеспечения взаимодействия в группе были применены радиостанции, в программу проведения включены два новых этапа.

Ключевые слова: санитарно-противоэпидемический отряд, группа санитарно-эпидемиологической разведки, чрезвычайная ситуация.

E.N.Kochetov, A.I.Bogacheva, Yu.V.Andrushchenko

Training of Specialized Teams of Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia

Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia, Saransk

Presented are data on the second republican competition of sanitary and epidemiological reconnaissance groups from the Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia. The competition was held in conditions that imitated emergency situations of different origin. All stages of the competition were more complicated than those of the first one, two new stages were included in the program, radio transceivers were used to provide interactions in the group.

Key words: sanitary and anti-epidemic team, sanitary and epidemiological reconnaissance groups, emergency situation.

В течение 2010 г. была продолжена работа по подготовке групп санитарно-эпидемиологической разведки (ГСЭР) и санитарно-эпидемиологического отряда (СПЭО) в целом.

Итоги первых Республиканских соревнований ГСЭР показали их значимость в практической подготовке специалистов. По согласованию с Главным управлением МЧС Российской Федерации по Республике Мордовия соревнования были включены в План основных мероприятий в области гражданской обороны, предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций, обеспечения пожарной безопасности на 2010 г.

С учетом анализа накопленного опыта работы специализированных формирований ЦГИЭ и результатов первых Республиканских соревнований ГСЭР была поставлена задача усложнить этапы соревнования, максимально приблизив обстановку к условиям реальной ЧС, а также включив в программу оказание первой помощи и проведение частичной санитарной обработки личного состава, частичной дегазации и дезактивации закрепленного за группой автотранспорта.

27 августа 2010 г. проведены вторые Республиканские соревнования ГСЭР. В них приняли участие команды ЦГИЭ и его филиалов. Вторые соревнования ГСЭР состояли из 6 этапов:

1-й – проверка оснащения группы санитарно-эпидемиологической разведки и умения им пользоваться; 2-й – работа ГСЭР в зоне радиоактивного загрязнения местности; 3-й – работа ГСЭР в зоне химического поражения; 4-й – работа ГСЭР в очаге ин-

фекционной болезни; 5-й оказание первой помощи пострадавшему в ходе выполнения задач в зоне ЧС; 6-й – порядок снятия средств индивидуальной защиты после выхода из зоны ЧС. Частичная санитарная обработка личного состава. Дегазация, дезактивация автотранспорта.

Первый этап был усложнен: группа после надевания противогазов входила в палатку, наполненную дымом (использовалась дымовая шашка), и находилась внутри в течение 3 мин. Это позволило решить сразу две задачи: проверить правильность надевания, исправность противогаза и его подгонку каждым членом группы СЭР; психологически подготовить личный состав к работе в условиях зоны заражения отравляющими или химически опасными веществами.

На втором этапе, в зоне условного радиоактивного загрязнения, нововведением был расчет на компьютере дозы облучения, полученной населением в зоне ЧС, по заданным параметрам. Данный этап усложнен тем, что необходимо было осуществить поиск источника радиоактивного излучения (стронций 90) на местности и его обозначение флажком.

На третьем этапе участники соревнований осуществляли химическую разведку в зоне поражения, расчет параметров зоны ЧС на компьютере, оценку обстановки в зоне. Личный состав ГСЭР выполнял поставленные задачи в СИЗ и на задымленной местности (белый дым имитировал поражение зоны хлором). Для имитации условий в зоне ЧС использовались дымовые шашки.

Четвертый этап – действия в условном очаге

сибирской язвы. Задачами ГСЭР являлись обследование населенных пунктов и отдельных территорий, оценка их санитарно-гигиенического состояния, сбор и уточнение данных, которыми располагают местные органы здравоохранения, ветеринарная служба и др. Проведен отбор проб от людей, животных и из объектов окружающей среды для лабораторного исследования, предоставлены донесения о результатах эпидразведки. Отобранные пробы почвы, травы, воды были доставлены в лабораторию особо опасных инфекций с соблюдением всех требований. Пробы исследованы различными методами (микроскопия мазков из исходного материала, высева на питательные среды, постановка идентификационных тестов, МФА, гено-диагностический тест). Использовали также диагностические сибиреязвенные иммуноглобулины и диагностический бактериофаг Гамма А-26. Выделенные штаммы возбудителя сибирской язвы (по легенде) в установленном порядке отправлены в Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы.

Пятый этап соревнований включал в себя оказание первой помощи пострадавшему с использованием подручных средств, медицинского имущества и имеющихся в группе аптек в ходе выполнения задач в зоне ЧС. Искусственную вентиляцию легких и непрямой массаж сердца персонал группы отрабатывал на кукле-тренажере.

На шестом этапе группы санитарно-эпидемиологической разведки отрабатывали технику выхода из комбинированной зоны заражения, последовательность специальной обработки (дегазация, дезактивация) автотранспорта с помощью комплекта

ИДК-1, проведения частичной санитарной обработки личного состава группы подручными и средствами медицинской защиты, а также порядок снятия средств индивидуальной защиты органов дыхания, кожи на площадке специальной обработки. Оценивались знания, практические навыки и слаженность действия группы при выполнении мероприятий.

Параллельно с соревнованиями проведены тактико-специальные занятия санитарно-противоэпидемического отряда (СПЭО) по отдельному плану. Судейской комиссией и оргкомитетом проведен смотр средств наглядной агитации.

По итогам результатов 6 этапов соревнований судейская коллегия определила победителей и лучших в номинациях.

Цели и задачи соревнований были успешно достигнуты. Команды в полной мере подтвердили свое умение в короткие сроки проводить разведку и выполнять санитарные и противоэпидемические мероприятия в различных чрезвычайных ситуациях.

На проведенном совещании по итогам соревнований были разобраны допущенные ошибки и намечены пути по дальнейшему совершенствованию подготовки спецформирований.

Authors:

Kochetov E.N., Bogacheva A.I., Andrushchenko Yu.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia, Dal'nyaya St., 1a, Saransk, Republic of Mordovia, 430030, Russia. E-mail: cgie@moris.ru

Об авторах:

Кочетов Е.Н., Богачева А.И., Андрущенко Ю.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия. 430030, Республика Мордовия, Саранск, ул. Дальняя, 1а. E-mail: cgie@moris.ru

Поступила 12.01.11.

О.А.Лобовикова, И.В.Шульгина, А.К.Никифоров

СОЗДАНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА ПРОИЗВОДСТВА МИБП В РОСНИПЧИ «МИКРОБ»

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

Разработаны методические подходы к формированию системы менеджмента качества применительно к деятельности по производству профилактических и диагностических МИБП в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Проанализирована и обобщена действующая законодательно-нормативная база РФ в области обеспечения и контроля качества; выявлены факторы, влияющие на системное управление качеством. Система менеджмента качества аттестована на соответствие требованиям ИСО 9001.

Ключевые слова: менеджмент качества, медицинские иммунобиологические препараты.

O.A.Lobovikova, I.V.Shul'gina, A.K.Nikiforov

Development and Implementation of the Quality Management System as Applied to the Production of Medical Immunobiological Preparations at the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Developed are the methodical approaches for design and implementation of quality management system(QMS) in the production of preventive and diagnostic medical immunobiological preparations manufactured at the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Analyzed and generalized is the current legislative-normative framework of Russian Federation in the sphere of quality control and quality assurance. Factors influencing the quality management system are revealed. QMS is certified in conformity with the requirements of international standard ISO 9001.

Key words: quality management, medical immunobiological preparations.

Производство профилактических и диагностических медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) – важнейший фактор поддержания здоровья нации, один из аспектов обеспечения национальной безопасности страны.

Выпуск на рынок МИБП для профилактики и диагностики инфекционных болезней требует одновременного достижения нескольких основных целей: обеспечение надлежащего качества, поставки необходимого количества продукции в определенные сроки, прибыль при реализации. Это требует выполнения установленных норм к производству и готовой продукции; наличия квалифицированного персонала, материальных и информационных ресурсов, необходимых для реализации процессов производства и управления качеством.

Современные мировые представления о ключевых факторах, определяющих надлежащее качество продукции, приоритетное место отводят грамотному управлению. Именно функционирующая система управления (менеджмента) качества связывает требования и процессы с персоналом, ресурсами и финансами, организуя деятельность по выпуску продукции [1, 2, 3, 7].

Целью работы явилась разработка методических подходов к формированию системы менеджмента качества (СМК) применительно к деятельности по производству МИБП в РосНИПЧИ «Микроб». Для достижения поставленной цели определены задачи:

- проанализировать и обобщить действующую законодательно-нормативную базу служб обеспечения и контроля качества;
- выявить факторы, влияющие на системное управление качеством;

- разработать методические подходы к внедрению системного управления качеством в учреждении;

- сертифицировать систему менеджмента качества предприятия на соответствие ИСО 9001-2008 (ISO – International Organization for Standardization).

Методологическую основу работы составила современная концепция менеджмента качества, изложенная в международных стандартах серии ИСО 9000 [8], стандартах Европейского сообщества (ЕС), документах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), директивах *Food and Drug Administration (FDA)*, ГОСТ Р ИСО 9001-2008 «Система менеджмента качества. Требования» соответствующих гармонизированных национальных стандартах (ГОСТ ИСО 13485-2004, ГОСТ Р 52249-2009, ГОСТ Р 52537-2006) и санитарно-эпидемиологических правилах СП 3.3.2.1288-03 «Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов» [5]. Результаты проведенного анализа состояния системы обеспечения и контроля качества в РосНИПЧИ «Микроб» легли в основу разработки и внедрения системы менеджмента качества в соответствии с действующими стандартами.

Для внедрения СМК на предприятии разработан и реализован комплекс мероприятий:

1. Проведена государственная регистрация всех выпускаемых МИБП.

Введение в действие Приказов № 735, 736 МЗСР РФ от 30.10.06 г., разделяющих схемы регистрации лекарственных средств (ЛС) и изделий медицинского назначения (ИМН), повлекло за собой изменения комплекта регистрационной документации. До 2006 г. все МИБП подлежали государственной регистрации в качестве лекарственных средств. В настоящее время

мя наборы реагентов для диагностики *in vitro* и среды микробиологические регистрируют в качестве ИМН в соответствии с Административным регламентом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Росздравнадзор) по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения.

В 2007, 2008 гг. были разработаны Технические условия (ТУ) взамен действующих Фармакопейных статей предприятия (ФСП) на 22 диагностических препарата, подготовлены регистрационные досье и проведена государственная регистрация ИМН по новой схеме. В 2008 г. была завершена работа по регистрации «Вакцины холерной бивалентной химической», а в 2010 г. – «Иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого». В 2009–2011 гг. осуществлена регистрация 7 новых диагностических препаратов, проведены приемочно-технические и медицинские испытания еще 10 ИМН.

2. На основании ФЗ № 128 от 08.08.01 г. «О лицензировании отдельных видов деятельности» в 2006 г. в РосНИПЧИ «Микроб» осуществлено лицензирование производства лекарственных средств. После проведения инспекционной проверки соответствия условий производства требованиям Национального стандарта РФ «Правила производства и контроля качества лекарственных средств (GMP)», ГОСТ Р 52249-2009, Росздравнадзором выдана лицензия сроком на 5 лет. В соответствии с новым «Положением о лицензировании производства лекарственных средств» (ПП РФ № 684 от 03.09.10 г.) в апреле 2011 г. оформлена лицензия в Минпромторге.

3. Сформирована система обучения персонала, задействованного в производстве МИБП, включающая первичное, периодическое, специальное и экстренное обучение.

Первичная специализация и усовершенствование по особо опасным инфекциям осуществляется на базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов РосНИПЧИ «Микроб». Ведущие специалисты прошли обучение правилам организации производства и контроля качества лекарственных средств в соответствии с современными стандартами на базе кафедры организации управления в сфере обращения лекарственных средств ГОУ ВПО ММА им. И.М.Сеченова, ФГУ НЦЭСМП и в других учреждениях.

Разработаны и введены в практику единые формы документов, отражающие процесс обучения персонала: планы повышения квалификации специалистов; программы обучения персонала; досье на специалиста и индивидуальные карты учета обучения.

4. Определены в соответствии с требованиями национальных стандартов основные подходы по реформированию системы производственной документации в РосНИПЧИ «Микроб».

Подготовлен «Мастер-файл (досье производственных участков РосНИПЧИ «Микроб»)». Он содержит подробную информацию о выпускаемой продукции, кадровом составе, помещениях, коммуникациях, оборудовании, контроле качества, по-

ставке сырья, организации складской деятельности, валидации производства, самоинспекции, системы расследования рекламаций и отзыва продукции.

Разработано руководство по качеству, в котором определена политика в области качества, отражены основные принципы управления производственной деятельностью.

На все выпускаемые препараты сформированы досье, содержащие регистрационное удостоверение, сертификат производства МИБП, нормативный документ (ФСП/ТУ), промышленный регламент, инструкцию по применению, макеты внешней и внутренней маркировок, материалы государственных испытаний (приемочных и по медицинскому применению). Служба обеспечения качества несет ответственность за хранение полного комплекта оригиналов нормативной документации (НД) на всю выпускаемую номенклатуру МИБП, организует своевременный пересмотр, подготовку и представление НД в органы государственного надзора.

В соответствии с НД разработаны и периодически пересматриваются Стандартные операционные процедуры (СОП) на технологические и контрольные операции, складскую, управленческую деятельность.

Важное место в системе документации отводится протоколированию процесса производства конкретной серии продукции. Совокупность этих документов составляет досье на серию, которое является необходимым документом для выдачи разрешения на реализацию готовой продукции. Службами обеспечения и контроля качества определены основные принципы комплектации досье и разработаны стандартные формы составляющих его документов.

5. Разработаны подходы к проведению валидации оборудования, технологических процессов и методов контроля качества. Предложены методики проведения процедуры валидации различных типов производственного оборудования, которые изложены в виде СОП.

Применены нетрадиционные подходы к ретроспективной валидации процессов ввиду ряда технологических особенностей производства МИБП. Оценка репрезентативной выборки из произведенных в последние годы серий продукции позволяла выявить тенденции сохранения параметров качества продукции и получить достаточные данные для подтверждения стабильности процесса производства.

В ходе аттестации методов анализа качества готовой продукции [4] были определены их метрологические характеристики (линейность, диапазон определяемых величин, предел обнаружения или предел количественного определения) и показатели точности (повторяемость, воспроизводимость и правильность). При исследовании показателей точности проведена статистическая оценка погрешности для трех диапазонов измерений (верхняя, нижняя граница и среднее значение).

6. Произведено существенное реформирование организации работ складских зон, предназначенных для хранения сырья и готовой продукции. Мировой опыт показывает, что до 80 % случаев несоответ-

ствия лекарственных средств связано с нарушениями стандартов GMP именно в складской зоне.

Проведена капитальная реконструкция складов готовой продукции, сырья и материалов, предусматривающая организацию зон раздельного хранения продукции различного статуса и соблюдение требований «холодовой цепи» [6] за счет современных автоматических систем поддержания и мониторинга температурного режима.

Подготовлено Положение, регламентирующее порядок приемки, отбора проб, входного контроля качества поставляемой продукции; порядок выдачи продукции, разрешенной к использованию в производстве МИБП, и процедуру оформления рекламаций на поступающее некачественное сырье.

7. Разработана система мероприятий по рассмотрению причин внутрипроизводственного брака, рекламаций и отзыва продукции с рынка. В службе качества имеется картотека брака и рекламаций, материалы расследования их причин и документы по отзыву продукции. Расследование рекламаций и его документальное оформление проводит комиссия из представителей производителя, служб обеспечения и контроля качества.

Расследование рекламаций и причин брака предусматривает: контроль образцов серий, поступивших с рекламацией, в сравнении с арбитражными образцами; расследование причин возникновения брака в процессе изготовления серии; расследование причин невыявления брака при контроле серии в службе контроля качества; повторный контроль других серий препарата с действующими сроками годности.

Ответственными за своевременный отзыв продукции с рынка являются уполномоченный по качеству и начальник отдела материально-технического снабжения и сбыта.

Протоколы рекламаций подлежат регулярному анализу с целью выявления специфических и повторяющихся факторов, требующих особого внимания и способствующих отзыву продукции, а также внесения предложений по разработке комплекса профилактических мероприятий по предупреждению брака или выпуску продукции пониженного качества.

8. Сформулированы подходы к проведению внутреннего аудита (самоинспекции) для оценки соответствия производственных подразделений требованиям национальных стандартов по всем аспектам технологического процесса и контроля качества, а также с целью принятия необходимых мер по предупреждению и устранению недостатков. Самоинспекцию проводит постоянно действующая комиссия в соответствии с инструкцией, разработанной в службах качества и адаптированной к условиям производства РосНИПЧИ «Микроб». Разработан перечень контрольных вопросов для самоинспекции по подразделениям с учетом наиболее критичных участков производственного процесса.

9. С 2009 г. ежегодно проводится аттестация системы менеджмента качества РосНИПЧИ «Микроб» применительно к осуществлению деятельности по экспериментальному производству профилактиче-

ских и диагностических МИБП Органом по сертификации систем качества «Евро-регистр» на соответствие требованиям ГОСТ Р ИСО 9001-2008. Правила GMP требуют наличия системы менеджмента качества, но не дают конкретных рекомендаций по ее созданию [7], а стандарты серии ISO 9000 структурно описывают СМК без привязки к сфере деятельности предприятия. Поэтому сертификация системы менеджмента качества по ISO 9000 является дополнительным объективным и независимым подтверждением соответствия качества выпускаемой продукции [8].

Таким образом, разработанные методические подходы позволяют объективно выбирать формы управления производством, обеспечивающие наибольший эффект от мероприятий, направленных на повышение качества продукции. Повышение технического уровня и улучшение качества выпускаемой продукции является важнейшим фактором роста эффективности производства и решающим условием ее конкурентоспособности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Береговых В.В., Иващенко Н.В., Рудакова И.П., Пятигорская Н.В., Мешковский А.П., Ляпунов Н.А. Управление качеством в фармацевтической промышленности. М.: 2004. 268 с.
2. Колышкин В.М., Сухомлин И.Г., Мешковский А.П. Реализация современных мировых тенденций управления качеством при производстве лекарственных средств в проекте национального стандарта «Производство лекарственных средств. Система и менеджмент качества. Основополагающие сведения». Фармацевтическая промышленность. 2006; 6:18–23.
3. Ляпунов Н.А., Чибигяев Т.Х., Безуглая Е.П., Касакин И.А., Лопатухин Э.Ю. Руководство по надлежащей производственной практике лекарственных средств для человека. М.: 2008.
4. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности. Методические рекомендации. М.: 2007. 192 с.
5. СП 3.3.2.1288-03 Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов. М.: 2003.
6. СП 3.3.2.1248-03 Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. М.: 2003.
7. Сергеева Е.М. ISO, GMP и лекарственные средства для россиян. Чистые помещения и технологические среды. 2006; 2: 42–7.

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

1. Beregovykh V.V., Ivashchenko N.V., Rudakova I.P., Pyatigorskaya N.V., Meshkovskiy A.P., Lyapunov N.A. [Quality Management in Pharmaceutical Industry]. M.: 2004. 268 p.
2. Kolyshkin V.M., Sukhomlin I.G., and Meshkovskii A.P. [Realization of modern worldwide trends of quality management for manufacture of medical products in the national standard project "Manufacture of medical products. Quality management system. Fundamentals"]. Farmatsevt. Promysh. 2006; 6:18–23.
3. Lyapunov N.A., Chibigayev T.Kh., Bezuglaya E.P., Kasakin I.A., Lopatukhin E.Yu. [Guide to Good Manufacturing Practice for Medical Products Manufactured for Man]. M.: 2008.
4. [Guide for Pharmaceutical Industry Manufacturer. Methodological Instructive Regulations]. M.: 2007. 192 p.
5. Sanitary Regulations 3.3.2.1288-03 [Good manufacturing practice of medical immunobiological products]. M.: 2003.
6. Sanitary Regulations 3.3.2.1248-03 [Conditions of transportation and storage of medical immunobiological preparations]. M.: 2003.
7. Sergeeva E.M. [ISO, GMP and medical products for russians]. Chistye Pomeschen. Tekhnolog. Sredy. 2006; 2:42–7.
8. Sukhomlin I.G., Kolyshkin V.M. [Significance of QMS model in the scope of implementation of GMP in the drug establishments. State regulatory support]. Chistye Pomeschen. Tekhnolog. Sredy. 2006; 1:30–5.

Authors:

Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Никуфоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.02.11.

А.В.Ляпунов^{1,2}, М.А.Хаснатинов¹, Е.В.Арбатская¹,
Г.А.Данчинова¹

НАХОДКА КЛЕЩА *AMBLYOMMA AMERICANUM* L., 1758 В ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ (РОССИЯ)

¹Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН,

²ГОУ ВПО Иркутский государственный университет, Иркутск

В июне 2008 г. в пригородной зоне Иркутска зарегистрировано присасывание к человеку иксодового клеща неизвестного ранее вида. По морфологическим признакам данный клещ отнесен к виду *Amblyomma americanum* L., 1758, являющемуся эндемиком Северной, Центральной и Южной Америки. Факт обнаружения нового для региона и России вида иксодового клеща имеет, кроме научного значения, большой практический интерес в связи с тем, что клещи этого вида переносят целый ряд инфекционных болезней. Обсуждаются вероятные сценарии заноса на территорию Российской Федерации нового вида клеща и оцениваются связанные с этим риски.

Ключевые слова: амблиomma, *Amblyomma americanum*, инфекционные болезни, клещевой энцефалит, клещевой боррелиоз, клещевой риккетсиоз.

A.V.Lyapunov^{1,2}, M.A.Khasnatinov¹, E.V.Arbskaya¹, G.A.Danchinova¹

Findings of *Amblyomma americanum* L., 1758 in the Territory of Eastern Siberia (Russia)

¹Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center of Family Health and Human Reproduction of RAMS Siberian Branch, Irkutsk; ²Irkutsk State University

In June, 2008, in the Irkutsk suburban zone, a man was bitten by a tick of an unknown in this area species. According to its morphological characteristics this tick was classified as *Amblyomma americanum* L., 1758 species, which is the endemic one in the North, Central, and South America. In this respect, the discovery of the unknown previously in this region and in the Russian Federation species of the ixodic tick is not only of a great scientific importance, but presents specific practical interest, as the ticks of this species are the carriers of a wide range of infectious diseases. Probable scenarios of importation of the new species of ticks in the territory of the Russian Federation are under discussion now and the risks, related to this problem, are being assessed.

Key words: *Amblyomma americanum*, infectious diseases, tick-borne encephalitis, Lyme borreliosis, Rickettsia.

На территории Иркутской области установлено обитание 6 видов иксодовых клещей, которые являются переносчиками болезней вирусной, бактериальной и риккетсиозной этиологии. Это – *Ixodes persulcatus* P. Sch., 1930; *I. lividus*; *I. trianguliceps* Bir., 1895; *Dermacentor nuttalli* Ol., 1929; *D. silvarum* Ol., 1932 и *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844 [1, 4].

Девятого июня 2008 г. в Центр диагностики и профилактики клещевых инфекций обратился пострадавший, во время отдыха на Ершовском заливе Иркутского водохранилища подвергшийся укусу иксодового клеща, которого он самостоятельно извлек. Клещ был исследован с целью установления вида и инфицированности возбудителями клещевого энцефалита и клещевого боррелиоза.

Клещ был живой, пригоден для определения вида, головная и брюшная части сохранили естественную окраску и форму, структуры брюшной стороны (половая щель, анальная бороздка, анальное отверстие и пр.) были хорошо различимы, у него отлично сохранились пальпы и ноги.

Идентификацию клеща на первом этапе производили по морфологическим признакам в соответствии с определителями фауны иксодовых клещей СССР [5, 6].

На втором этапе видовую принадлежность клеща определяли в соответствии с определите-

лем иксодовых клещей подсем. *Amblyominae* [7] и онлайн-определителем «Tick identification key» (Университет г. Линкольн, Великобритания) [14]. Для подтверждения результатов использовали специализированные коллекции изображений клещей Discover Life [10] и др.

Для выявления вируса клещевого энцефалита проводили иммуноферментный анализ суспензии клеща с помощью тест-систем «ВектоВКЭ-антиген» (Вектор-Бест, Новосибирск) согласно инструкции производителя. Исследование на зараженность *Borrelia burgdorferi sensu lato* проводили с помощью прямой микроскопии препарата содержимого кишечника клеща, окрашенного по Романовскому-Гимза с доокраской кристаллическим фиолетовым [3].

Стадия развития и пол клеща были идентифицированы как имаго, самец. По морфологическим признакам мы отнесли клеща к роду *Amblyomma* на основании следующих особенностей: анальная бороздка окружает анус снизу; есть глаза; длина пальп больше их ширины; членик II пальпы приблизительно в 3 раза длиннее членика III. По овальной идиосоме с характерными фестонами (11 шт.) и своеобразному белому орнаменту на спинной стороне клещ отнесен к виду *A. americanum* L., 1758. При лабораторном исследовании клеща на зараженность вирусом клещевого энцефалита и возбудителями клещевого борре-

лиоза *Borrelia burgdorferi sensu lato* не выявлено ни одного из этих патогенов.

Согласно литературным данным, ареал распространения клеща *A. americanum* охватывает обширные территории в Северной, Центральной и Южной Америке. Эти клещи обычны в центральных и восточных районах США и Мексики, однако встречаются также на территории Канады, в некоторых странах Латинской и Южной Америки [2, 9, 12]. Клещи этого вида амблиомм переносят возбудителей туляремии, болезни Лайма, Q-лихорадки, пятнистой лихорадки Скалистых гор и моноцитарного эрлихиоза [9].

Амблиоммы в течение жизненного цикла меняют трех хозяев, при этом личинки и нимфы обычно нападают на птиц, крупных и средних млекопитающих, однако изредка могут питаться и на мелких млекопитающих. Взрослые клещи паразитируют на средних и крупных млекопитающих. Наиболее важными хозяевами являются домашний скот, дикие копытные, собаки. Отмечены случаи прокормления самок на птицах. В США все стадии *A. americanum* охотно нападают и на человека [9, 11]. Самки откладывают 3–5 тыс. яиц, из которых через 21–50 дней, в зависимости от внешних условий, выходят личинки. Личинки питаются кровью в течение 3–9 дней и через 13–40 дней линяют в нимфу. Нимфы питаются в течение 3–8 дней и через 13–46 дней линяют. Взрослые спариваются на хозяине, после чего самки питаются в течение 6–24 дней. Без питания личинки способны выживать до 279 дней, нимфы и имаго – 430–479 дней [13].

Особенности биологии клеща позволяют предположить несколько сценариев проникновения американских клещей в Восточную Сибирь. Наиболее простым и очевидным путем был бы ввоз клеща из-за границы на теле самого пострадавшего, либо с экзотическим домашним питомцем (например, домашние собаки, декоративные грызуны, рептилии или птицы). Однако сам пострадавший отрицал недавний визит в Америку, равно как и контакты с какими-либо домашними, а тем более с экзотическими животными.

Учитывая способность нимф и самок амблиомм питаться на птицах и принимая во внимание достаточно длительный период питания (до 24 сут), можно предположить, что произошел естественный занос единичной особи клеща мигрирующими либо залетными птицами. Данный сценарий не предполагает формирования устойчивой популяции новых видов клещей в Восточной Сибири, поскольку вероятность того, что занесенный клещ случайно попадет в район интенсивного выпаса скота – основного прокормителя амблиомм – мала. Однако в данном случае следует принимать во внимание, что подобные происшествия могут повторяться с различной частотой в зависимости от трансконтинентальных миграций или частоты пролетов птиц с американских континентов.

Кроме того, можно предположить третий сценарий, при котором произошла интродукция клещей вместе с импортированным из Америки скотом. После этого сформировалась локальная популяция *A. americanum*, из которой клещи были разнесены местными синантропными птицами и млекопитающими по экосистемам Восточной Сибири.

Импорт скота из Северной Америки является обычной практикой в сельском хозяйстве Иркутской области. Так, например, в конце 2007 г., как раз накануне сезона активности клещей 2008 г., в Приангарье было завезено стадо телят (порядка 400 голов), импортированных из Канады. Более ста канадских телят было размещено в поселке Пивовариха, в относительной близости от места нападения клеща на человека.

В случае реализации данного сценария чрезвычайно важен вопрос существования локальной популяции *A. americanum* и ее стабильности. На самом деле, крупное стадо скота может прокармливать тысячи клещей на различных стадиях развития. При этом клещи будут занимать компактное географическое пространство, насыщенное компетентными прокормителями, что позволит не только успешно питаться, откладывать яйца, проходить все стадии морфогенеза, но и с высокой вероятностью находить полового партнера, а также переносить неблагоприятные климатические условия. Стабильность подобной популяции может быть ограничена пределами конкретного хозяйства, однако не исключено, что с течением времени часть клещей может быть разнесена по окрестным природным сообществам синантропными птицами и мышевидными грызунами, которые как раз в зимне-весенний период концентрируются вокруг животноводческих хозяйств, а в летнее время мигрируют более свободно и широко. В этом случае ситуация представляется более тревожной, поскольку существует не только стабильный источник агрессивных по отношению к человеку переносчиков заболеваний, но и опасность его адаптации к восточно-сибирским ландшафтам, что делает распространение новых видов клещей неконтролируемым и может способствовать появлению новых угроз здоровью человека.

К сожалению, в настоящее время мы не располагаем достаточным объемом информации, чтобы установить реальный путь заноса *A. americanum* в Восточную Сибирь. По нашему мнению, для своевременного выявления и предотвращения возможной угрозы необходимы следующие меры: ежегодный мониторинг состояния природных очагов клещевых инфекций; проведение акарологического обследования хозяйств, в которые завозятся крупные партии скота из-за рубежа; подготовка информационно-методических и наглядных материалов для медицинских и ветеринарных учреждений о возможности заносов и находок новых видов клещей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данчинова Г.А. и др. Иксодовые клещи юга Восточной Сибири и Монголии и их спонтанная зараженность возбудителями природно-очаговых трансмиссивных инфекций. Бюл. сибирской медицины. 2006; 5(Прил. 1):137–43.
2. Колонин Г.В. Мировое распространение иксодовых клещей. Роды *Hyalomma*, *Aponomma*, *Amblyomma*. М.: Наука; 1983. 121 с.
3. Коренберг Э.И., редактор. Методические указания по эпидемиологии, диагностике, клинике и профилактике болезни Лайма. М.; 1991. 61 с.
4. Померанцев Б.И. Иксодовые клещи (*Ixodidae*). Сер. Фауна СССР. Паукообразные. Л.: 1950. Т. 4(2). 224 с.
5. Сердюкова Г.В. Иксодовые клещи фауны СССР. М.–Л.: Изд-во АН СССР; 1956. 122 с.
6. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Ixodinae*. В кн. Фауна СССР. Паукообразные. Л.: Наука; 1977. Т. IV(4). 396 с.
7. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. *Amblyomminae*. В кн. Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. СПб.: Наука; 1997. Т. IV(5). 383 с.
8. Barnard D.R. Cattle breed alters reproduction in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 1990; 10:105–9.
9. Childs J.E., Paddock C.D. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. Annu. Rev. Entomol. 2003. 48:307–37.
10. Discover Life [Internet]. Available from: <http://www.discoverlife.org/20/q?search=Amblyomma+americanum>
11. Kollars T. M. Jr., Oliver J.H. Jr., Durden L.A., Kollars P.G. Host Associations and Seasonal Activity of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Missouri. J. Parasitol. 2000; 86(5):1156–59.
12. Scott J.D., Fernando K., Banerjee S.N., Durden L.A., Byrne S.K., Banerjee M. et al. Birds disperse ixodid (Acari: Ixodidae) and *Borrelia burgdorferi*-infected ticks in Canada. J. Med. Entomol. 2001; 38(4):493–500.
13. Sonenshine D.E. Biology of Ticks. New York: Oxford University Press; 1991. Vol. 1. 449 p.
14. Tick Identification Key homepage [Internet]. University of Lincoln. [cited 18 Jan 2012]. Available from: <http://webpages.lincoln.ac.uk/fruedisueli/FR-webpages/parasitology/Ticks/TIK/tick-key/index.htm>

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

1. Danchinova G.A. Khasnatinov M.A., Zlobin V.I. et al. [Ixodic ticks found southward of the Eastern Siberia and Mongolia territory and their spontaneous infestation by agents of feral herd vector-borne infections]. Byul. Sib. Med. 2006; 5(Suppl. 1):137–43.
2. Kolonin G.V. [Distribution of Ixodic Ticks around the World. *Hyalomma*, *Aponomma*, *Amblyomma* species]. M.: Nauka. 1983. 121 p.
3. Korenberg E.I., editor. [Practical Guidelines on Epidemiology, Diagnostics, Clinical Picture, and Prophylaxis of Lyme disease]. M.; 1991. 61 p.
4. Pomerantsev B.I. [Ixodic ticks (*Ixodidae*)]. Ser. [USSR Fauna. Arachnida]. L.; 1950. Vol. 4 (2). 224 p.
5. Sersdyukova G.V. [Ixodic ticks of USSR Fauna]. M.–L.; 1956. 122 p.
6. Filippova N.A. [Ixodic ticks of *Ixodinae* ssp.]. In: [USSR Fauna. Arachnida]. L.: Nauka; 1977. Vol. IV (4). 396 p.
7. Filippova N.A. [Ixodic ticks of *Amblyomminae* ssp.]. In: [Fauna of the Russian Federation and Bordering Countries. Arachnida]. St. Petersburg.: Nauka; 1997. Vol. IV (5). 383 p.

Authors:

Lyapunov A.V., Khasnatinov M.A., Arbatskaya E.V., Danchinova G.A. Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Center of Family Health and Human Reproduction of RAMS Siberian Branch. K.Marks St., 3. Irkutsk, 664025, Russia. E-mail: liapunov.asp@mail.ru
Lyapunov A.V. Irkutsk State University. Irkutsk.

Об авторах:

Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А., Арбатская Е.В., Данчинова Г.А. Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ ПЗСРЧ СО РАМН. 664025, Иркутск, ул. К.Маркса, 3. E-mail: liapunov.asp@mail.ru
Ляпунов А.В. Иркутский государственный университет. Иркутск

Поступила 20.01.11.

А.В.Фадеева, Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинок, Н.А.Шарапова, Т.В.Валова, В.В.Кутырев

**РАЗРАБОТКА ПЦР С УНИВЕРСАЛЬНЫМИ ПРАЙМЕРАМИ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *tcpA***

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

Разработана ПЦР для выявления структурных генов токсинорегулируемых пилей адгезии – *tcpA* различных типов. Рассчитаны универсальные праймеры, использование которых обеспечивает детекцию этих генов у *V. cholerae* разных серогрупп. С помощью разработанной ПЦР определен новый вариант гена *tcpA* у токсигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогруппы.

Ключевые слова: возбудитель холеры, гены патогенности, ПЦР детекция.

A.V.Fadeeva, G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, N.A.Sharapova, T.V.Valova, V.V.Kutyrev

**Development of the PCR Assay with Universal Primers for the Detection
of Different *tcpA* Gene Variants**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

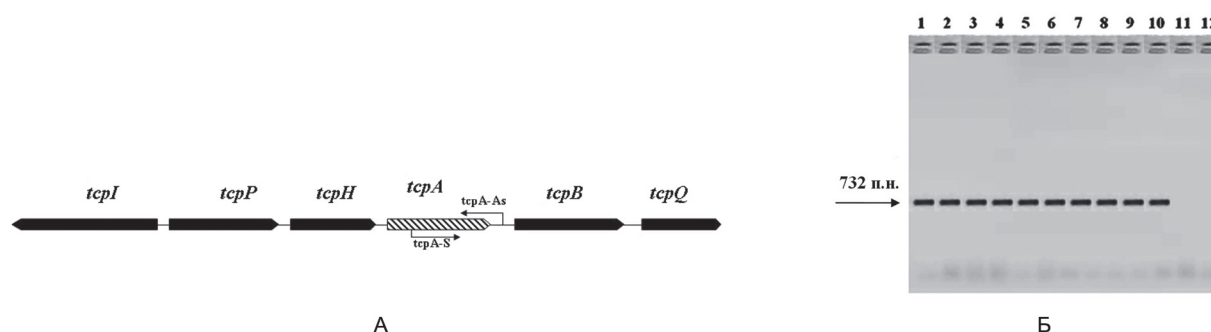
Developed is the PCR assay for the detection of the structural genes of toxin co-regulated adhesion piluses – *tcpA* of different types. Determined are the universal primers, the usage of which provides for the detection of the stated above genes in *V. cholerae* of various serogroups. With the help of this PCR assay identified is a new variant of *tcpA* gene in toxigenic cholera vibrio of non-O1/non-O139 serogroup.

Key words: cholera agent, pathogenicity gene, PCR detection.

Токсинорегулируемые пили адгезии (ТКПА) являются одним из основных факторов патогенности *Vibrio cholerae* и необходимы для колонизации холерными вибрионами тонкого кишечника [4]. Последовательность гена *tcpA*, кодирующего синтез основного белка ТКПА – пилина ТсрА, отличается значительной вариабельностью у холерных вибрионов разных серогрупп, в том числе и у близкородственных холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, которые имеют лишь 75 % идентичности аминокислотной последовательности кодируемого белка [1]. У холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп также выявлено несколько вариантов ТсрА и кодирующих их генов [3, 4]. В настоящее время для детекции *tcpA* используются праймеры, комплементарные этому гену у *V. cholerae* серогруппы O1, которые могут выявлять только гены классического

или эльтор типов [2]. Поскольку это может привести к ошибкам в определении наличия гена *tcpA* и неправильной оценке патогенного потенциала исследуемых изолятов, целью нашего исследования была разработка ПЦР с универсальными праймерами, обеспечивающими выявление разных вариантов гена *tcpA*.

На основе компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей генов *tcpA* у штаммов *V. cholerae* разных серогрупп, представленных в базе данных NCBI GenBank, нами выявлены консервативные участки ДНК, один из которых расположен в последовательности гена *tcpA* ближе к 5' концу, кодирующему N-терминальную часть молекулы пилина ТсрА, а второй высококонсервативный участок лежит за пределами этого гена и примыкает к гену *tcpA* с 3' конца (рисунок, А). На выявленные консервативные участки сконструированы праймеры, кото-



Положение рассчитанных праймеров для детекции различных вариантов гена *tcpA* на схеме *tcp* оперона *V. cholerae* (А), выявление генов *tcpA* в ПЦР с помощью универсальных праймеров у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп O1, классический биовар (Б):

1 – Дакка35; 2 – МАК154, биовар эльтор; 3 – Т4; 4 – 4А, O139; 5 – МО45; 6 – РО-7, O9; 7 – P16136, O28; 8 – P16132, O37; 9 – 1322-69, O74; 10 – P16152, O50; 11 – P-8845; 12 – отрицательный контроль

рые имеют следующий состав:

tcpAuniv-S GAA GAA CAC GAT AAG AAA AC
tcpAuniv-AS CCT TGT TGG TAT TTT CTC AT

Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: 1 цикл 94 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C – 45 с, 56 °C – 1 мин, 72 °C – 45 с и завершающий цикл – 72 °C – 3 мин.

Проведенный анализ эффективности разработанной ПЦР на 130 штаммах *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации (Астраханская, Саратовская, Самарская, Ростовская области, Калмыкия) и за рубежом в период с 1960 по 2006 год, показал, что ее использование обеспечивает детекцию генов *tcpA* у штаммов разных серогрупп (рисунок, Б). С ее помощью выявляются гены *tcpA* у штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров (рисунок, дорожки 1–4), O139 серогруппы (дорожки 5–6) и у токсигенных вибрионов других серогрупп (дорожки 5–10). У нетоксигенных холерных вибрионов (дорожка 11) ген *tcpA*, как правило, отсутствует, хотя иногда встречаются нетоксигенные штаммы не O1/не O139 серогруппы, содержащие различные варианты этого гена. Среди последних нами выявлены два штамма с геном *tcpA* классического типа, один из которых был выделен в Астраханской области в 1974 г., а второй – в Ростовской области в 1976 г. Три штамма *V. cholerae* не O1/не O139 серогруппы с геном *tcpA* типа эльтор выделены в Ростовской области в 1974–1975 гг. Значительно большее число штаммов с генами *tcpA* классического и эльтор типов обнаружено у *V. cholerae* не O1/не O139 зарубежного происхождения. Среди штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 из O-типизирующей коллекции Саказки выявлено 5 изолятов с генами *tcpA* классического и 7 – с генами эльтор типов. Один токсигенный штамм *V. cholerae* серогруппы O62 с геном *tcpA* классического типа был выделен в 1971 г. в Узбекистане, а второй штамм не O1/не O139 серогруппы, полученный на этой же территории в 1986 г., содержал этот ген типа эльтор.

С применением рассчитанных универсальных праймеров нам впервые удалось выявить наличие гена *tcpA* у группы токсигенных штаммов, выделенных в Узбекистане в 1987–1990 гг. (рисунок, дорожки 7–8, 10), которые, как считалось ранее, не содержат генов ТКПА. Проведенное секвенирование генов *tcpA* у этих токсигенных штаммов показало, что их последовательность имеет существенные отличия (165 замен единичных нуклеотидов на ПЦР фрагменте размером около 730 п.н.) от штамма O1 серогруппы *V. cholerae* 16961, а также от других штаммов, представленных в NCBI GenBank.

Таким образом, нами разработана ПЦР с универсальными праймерами, применение которой обеспечивает детекцию генов *tcpA* различных типов. С ее помощью нами выявлен новый вариант (аллель) этого гена у токсигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогруппы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bertran P., Delgado G., Navarro A., Truhillo F., Selander R.K., Gravioto A. Genetic diversity and population structure of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:581–90.
2. Keasler S.P., Hall R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet. 1993; 341:1661.
3. Nandi B., Nandy R.K., Vicente A.C., Ghose A.C. Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (*tcpA*) in a toxigenic non-O1/non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2000; 68:948–52.
4. Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J. Use of *phoA* gene fusion to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987; 84:2833–7.

Authors:

Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Sharapova N.A., Valova T.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Шарاپова Н.А., Валова Т.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.02.12.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ для публикации в журнале «Проблемы особо опасных инфекций»

При направлении статьи в редакцию следует соблюдать следующие правила:

1. Присылать один распечатанный экземпляр статьи и электронную копию на компакт-диске или по электронной почте. **Каждая статья должна иметь направление от учреждения, в котором она выполнена, экспертное заключение и лицензионный договор о предоставлении права использования произведения** (договор размещен на сайте РосНИПЧИ «Микроб» <http://microbe.rospotrebnadzor.ru>).

2. Размер статей (включая таблицы, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 8 стр., обзоров – 12–14 стр., кратких сообщений – 4–5 стр.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: материалы и методы, результаты и обсуждение. К оригинальным, проблемным статьям, обзорам и кратким сообщениям должны прилагаться резюме (не более 10 строк) и ключевые слова. Резюме и ключевые слова должны быть **на русском и английском языках**.

4. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, *названия учреждений – мест работы всех авторов, их должности и контактная информация (почтовый адрес с указанием индекса, телефон, адрес электронной почты)*. Статья должна быть подписана всеми авторами.

5. Количество иллюстраций не должно превышать 3 (либо 3 рис., либо 3 табл., либо 3 в совокупности).

6. Место расположения таблиц и рисунков в тексте отмечать ссылками на полях (только в распечатанных экземплярах).

7. Таблицы не должны дублировать графики, должны иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Числа в таблицах должны быть статистически обработаны. Цифровой материал из таблиц не должен повторяться в тексте статьи.

8. Рисунки должны быть четкими. *В случае необходимости каких-либо обозначений они должны быть сделаны на втором экземпляре рисунка или фотографии*. Количество обозначений должно быть сведено к минимуму. Все объяснения следует давать в подрисуночной подписи.

9. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название микроорганизма пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род – только одной прописной буквой, вид – полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

10. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых сокращений, мер физических и математических величин и терминов) допускается только с первоначальным указанием полного названия.

11. Математические формулы должны быть тщательно выверены. Во всех формулах необходимо размечать (только в распечатанных экземплярах):

строчные и прописные буквы: прописные обозначаются двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху;

латинские и греческие буквы: латинские подчеркиваются синим цветом, греческие – красным.

12. В списке литературы (в оригинальных статьях – не более 15 источников, проблемных и обзорах – не более 50, кратких сообщениях – не более 5–8) приводятся работы

отечественных и зарубежных авторов за последние 10 лет в алфавитном порядке (сначала русские авторы, потом – иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка (в квадратных скобках), а не на фамилию и годы.

В списке литературы приводятся авторы работы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>). Для книг и патентов давать точное название. Например, *статьи в журналах*:

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N. Engl. J. Med. 2002; 347(4):284-7.

Если в статье более 6 авторов, перечислите первых 6 авторов и добавьте «и др. (*et al.*)»

Книги и другие монографии

Физические лица в качестве авторов:

Martin E.W. Hazards of medication. 2nd ed. Ruskin A., Napke E., Alexander S., Kelsey F.O., Farage D.J., Mills D.H., Elkas R.W., editors. Philadelphia: Lippincott; 1978. 686 p.

Редакторы, составители в качестве авторов:

Celli L., editor. The elbow: traumatic lesions. Warr A., translator. Vienna (Austria): Springer-Verlag; 1991. 203 p.

Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Не допускаются ссылки на издания, недоступные для большинства читателей. К ним относятся приказы, распоряжения, ведомственные издания и инструкции, ГОСТы, ТУ, тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов, авторефераты докторских и кандидатских диссертаций и неопубликованные работы.

13. Фамилии иностранных авторов при упоминании в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

14. **Требования к электронным вариантам статей:** файлы с текстом и подрисуночными подписями должны быть в формате DOC (редактор Microsoft Word) или RTF; **рисунки и фотографии – в отдельных файлах в формате TIFF (разрешение – 300 пикс/дюйм); диаграммы и графики должны быть выполнены в программе Excel (в отдельных файлах в формате XLS)**. Рисунки, фотографии, диаграммы и графики не вставлять в текст в программе Microsoft Word.

15. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

16. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять, а также публиковать их в виде кратких сообщений (4–5 стр. текста с резюме и литературой без рисунков и таблиц). Вся работа проводится по авторскому оригиналу.

17. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование.

18. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

19. **Публикация – бесплатная.**

Статьи направлять по адресу:

410005, Саратов, Университетская, 46, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12. E-mail: rusrapi@microbe.ru