

# 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 4**

**2013**

**САРАТОВ**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.А.Бугоркова, докт. мед. наук  
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  
Н.И.Микшис, докт. мед. наук  
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  
А.В.Топорков, докт. мед. наук  
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор  
С.А.Щербакова, докт. биол. 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, профессор (Москва)  
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)  
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)  
В.Л.Мотин, профессор (Галвестон, США)  
А.В.Ракин, канд. биол. наук (Мюнхен, Германия)  
А.Н.Сергеев, докт. мед. наук, профессор (Кольцово)  
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)  
М.Скурник, профессор (Хельсинки, Финляндия)

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

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
Российский научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб», 2013

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

2013, Issue 4

## 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

Bugorkova S.A., Doctor of Medical Science  
Devdariani Z.L., Doctor of Medical Science, Professor  
Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science  
Karavaeva T.B. (executive secretary), Candidate of Medical Science  
Kouklev E.V., Doctor of Medical Science, Professor  
Mikshis N.I., Doctor of Medical Science  
Lyapin M.N., Candidate of Medical Science  
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 A.V., Doctor of Medical Science  
Toporkov V.P., Doctor of Medical Science, Professor  
Shcherbakova S.A., Doctor of Biological 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, Professor (Moscow)  
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)  
Lvov D.K., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)  
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)  
Motin V.L., Ph. D., Professor (Galveston, USA)  
Rakin A.V., Ph. D. (Munich, Germany)  
Sergeev A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Koltsovo)  
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)  
Skurnik M., Professor (Helsinki, Finland)

### Editorial Office Address:

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

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

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

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

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

Пробл. особо опасных инф. 2013. Вып. 4. 1–114

Редактор Е.С.Герасимова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваяевой, А.П.Рыжовой

Подписано в печать 04.12.13. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,7. Гарнитура Таймс. Заказ 1446  
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

## СОДЕРЖАНИЕ

Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухова И.Г., Топорков В.П., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 1. Эпидемиологические риски и основные направления мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки к проведению Саммита .

5

Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухова И.Г., Топорков В.П., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 2. Организация и приоритетные направления работы в период проведения Саммита .....

11

### Эпидемиология

Гражданов А.К., Кожанова О.И., Топорков А.В., Аязбаев Т.З., Матвеева Н.И., Карнаухова И.Г., Попов Н.В., Раздорский А.С., Архипова Г.Н. Сравнительный анализ проявлений опасных инфекций в Саратовской и Западно-Казахстанской областях в целях современной оценки эпидемиологических рисков .....

16

Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями как одно из направлений обеспечения биологической безопасности.....

24

Попков А.Ф., Балахонov С.В., Вержущий Д.Б., Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Афанасьев М.В., Базанова Л.П., Белькова С.А., Вержущая Ю.А., Вершинин Е.А., Воронова Г.А., Косилко С.А., Логачев А.И., Немченко Л.С., Никитин А.Я., Окунев Л.П., Токмакова Е.Г., Шестопалов М.Ю., Холин А.В., Михайлов Е.П., Глушков Э.А., Агапов В.А. Исследование структурно-функциональных аспектов эпизоотического процесса в синбирских природных очагах чумы .....

28

Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Булычев В.П., Ларин В.В. Дифференциация Волго-Уральского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений методом круговой экстраполяции.....

33

Тарасов М.А., Янович В.А., Копылов П.В., Иванов Л.И., Попов Н.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Эпизоотологическое обследование очагов зоонозов в условиях стихийного бедствия (наводнение) .....

37

Удовиченко С.К., Топорков А.В., Сафронов В.А., Карнаухова И.Г., Попов Н.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Совершенствование профилактических мероприятий при подготовке и проведении Универсиады-2013 в Казани на основе комплексной оценки эпидемиологического риска по природно-очаговым инфекционным болезням .....

42

### Микробиология

Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С. Холерные вибрионы не O1/не O139, выделенные в ходе мониторинга водоемов и стоков Ростова-Дону с 2009 по 2011 год .....

48

## CONTENTS

Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P., Rakitin I.A., Bashketova N.S., Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 1. Epidemiological Risks and Core Operations for Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to the Summit

Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P., Rakitin I.A., Bashketova N.S., Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 2. Management and Priority Areas of Anti-Epidemic Activities as Regards "G-20" Summit Campaign

### Epidemiology

Grazhdanov A.K., Kozhanova O.I., Toporkov A.V., Ayazbaev T.Z., Matveeva N.I., Karnaukhov I.G., Popov N.V., Razdorsky A.S., Arkhipova G.N. Comparative Analysis of Particularly Dangerous Infections Manifestations in the Territory of the Saratov and West-Kazakhstan Regions with a View to Advanced Epidemiological Risk Assessment

Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Demina Yu.V. Epidemiological Surveillance over Community-Acquired Pneumonia as One of the Means for Biological Safety Provision

Popkov A.F., Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Afanas'ev M.V., Bazanova L.P., Bel'kova S.A., Verzhutskaya Yu.A., Vershinin E.A., Voronova G.A., Kosilko S.A., Logachev A.I., Nemchenko L.S., Nikitin A.Ya., Okunev L.P., Tokmakova E.G., Shestopalov M.Yu., Kholin A.V., Mikhaylov E.P., Glushkov E.A., Agapov V.A. Investigations of Structural-Functional Aspects of Epizootic Process in Natural Plague Foci in Siberia

Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Bulychiev V.P., Larin V.V. Volga-Ural Sandy Plague Focus Differentiation against Epizootic Manifestations by Means of Circular Extrapolation

Tarasov M.A., Yanovich V.A., Kopylov P.V., Ivanov L.I., Popov N.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Epizootiological Surveillance of Zoonotic Disease Foci in case of Emergency Situation (Flood)

Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Safronov V.A., Karnaukhov I.G., Popov N.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Improvement of the Preventive Measures for Managing Universiade-2013 Held in Kazan, Based on Comprehensive Evaluation of Epidemiological Risks as Regards Natural-Focal Infectious Diseases

### Microbiology

Grigorenko L.V., Kругликов V.D., Mazrukho A.B., Arkhangel'skaya I.V., Zubkova D.A., Nepomnyashchaya N.B., Shestialtynova I.S. Cholera Vibrios non-O1/non-O139 Isolated in the Process of Epidemiological Monitoring over Rostov-on-Don Water Basins and Drain Sewage System within the Period of 2009–2011

Евченко Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезентев В.М., Белявцева Л.И., Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы .....

51

Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шестиалтынова И.С., Олейников И.П., Непомнящая Н.Б., Подойницына О.А. Холерные вибрионы O1 серогруппы, выделенные из водных объектов Ростова-на-Дону в ходе мониторинга в 2008–2012 гг. ....

56

Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор) .....

60

Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Влияние жидкой части крови и ее отдельных компонентов на взаимодействие бактерий *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека *in vitro* .....

69

Тучков И.В., Краснов Я.М., Горяев А.А., Матвеева Ж.В., Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства .....

73

## Диагностика

Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жданова Е.В., Цыганкова О.И., Буравцева Н.П., Еременко Е.И., Тюменцева И.С., Коготкова О.И., Зуенко А.А., Куличенко А.Н. Разработка и апробация тест-системы для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител .....

76

Башарова Л.А., Ярков С.П., Третьяков С.И., Злобин В.Н. Создание индикаторных иммунохроматографических элементов для выявления риккетсий Бернета .....

79

Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А., Щелкунов С.Н. Ортопоксвирусные инфекции: эпидемиология, клиника, диагностика (обзор) .....

82

Найденова Е.В., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Современное состояние лабораторной диагностики лихорадки денге (обзор) .....

89

## Биотехнология, иммунопрофилактика

Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) ....

95

Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Создание и изучение вариантов вакцинного штамма *Francisella tularensis* без генов *igI/C*. Сообщение 2 .....

102

Попова П.Ю., Бугоркова С.А., Микшис Н.И., Семакова А.П., Попов Ю.А., Щуковская Т.Н. Патоморфологические изменения у биомоделей в ответ на введение рекомбинантного протективного антигена сибиреязвенного микроба .....

106

## Краткие сообщения

Матюхин А.В., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Кузнецов А.А. Муха-кровососка *Icosta ardeae* – распространение и возможная роль в циркуляции вируса Западного Нила .....

110

Пушкарь В.Г., Кулаков М.Я. Совершенствование метода приготовления иммуносорбентов с магнитными свойствами для хемилюминесцентного анализа .....

112

Юбилей .....

114

Evchenko Yu.M., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Mezentsev V.M., Belyavtseva L.I., Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Kulichenko A.N. Studies of Genetic Diversity of *Yersinia pestis* Strains Isolated in Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

Ezhova M.I., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Shestialtyanova I.S., Oleynikov I.P., Nepomnyashchaya N.B., Podoyntsina O.A. O1 Serogroup Cholera Vibrios Isolated from the Rostov-on-Don Water Bodies in the Course of Surveillance in 2008–2012

Monakhova E.V. Cholera Vibrio Virulence Strategy and Ways of its Realization (Scientific Review)

Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. Impact of the Liquid Part and Some Separate Components of Blood on the Process of Interaction between *Yersinia pestis* EV NIEG Bacteria and Human Red Blood Cells *in vitro*

Tuchkov I.V., Krasnov Ya.M., Goryaev A.A., Matveeva Zh.V., Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of Glycoprotein-G of the Russian Fixed Rabies Virus Strain "Moscow 3253"

## Diagnostics

Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhdanova E.V., Tsygankova O.I., Buravtseva N.P., Eremenko E.I., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Zuenko A.A., Kulichenko A.N. Construction and Approval of the Test-System for the Detection of Antibodies to Anthrax Agent Using Indirect Fluorescent Immunoassay

Basharova L.A., Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Zlobin V.N. Construction of Immune-Chromatographic Indicator Elements for Burnet Rickettsia Detection

Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus Infections: Epidemiology, Clinical Picture, and Diagnostics (Scientific Review)

Naydenova E.V., Kuklev V.E., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Current State of Dengue Fever Laboratory Diagnostics (Scientific Review)

## Biotechnology, Immunoprophylaxis

Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. Methods and Technologies of Cholera Vibrio Cultivation (Scientific Review)

Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. Construction and Investigation of the Variants of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* Lacking *igI/C* Genes. Communication 2

Popova P.Yu., Bugorkova S.A., Mikshis N.I., Semakova A.P., Popov Yu.A., Shchukovskaya T.N. Pathomorphological Changes in Biomodels in Response to Recombinant Protective Anthrax Antigen Inoculation

## Brief Communication

Matyukhin A.V., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Kuznetsov A.A. Blood-Sucking Fly *Icosta ardeae* – Its Distribution and Probable Role in Circulation of West-Nile Fever Virus

Pushkar' V.G., Kulakov M.Ya. Improvement of Manufacturing Procedure as Regards Immunosorbents with Magnetic Properties for Chemiluminescent Assay

Anniversaries



Г.Г.Онищенко<sup>1</sup>, Б.П.Кузькин<sup>1</sup>, И.А.Ракитин<sup>2</sup>, Н.С.Башкетова<sup>2</sup>, Ю.Н.Коржаев<sup>3</sup>, Т.А.Гречанинова<sup>3</sup>,  
И.А.Дятлов<sup>4</sup>, В.В.Кутырев<sup>5</sup>, А.В.Топорков<sup>5</sup>, И.Г.Карнаухов<sup>5</sup>, В.П.Топорков<sup>5</sup>, С.А.Щербакова<sup>5</sup>,  
Е.С.Казакова<sup>5</sup>, И.Н.Шарова<sup>5</sup>

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ  
В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ САММИТА «ГРУППЫ ДВАДЦАТИ»  
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013 Г.  
СООБЩЕНИЕ 1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ РИСК И ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ  
МЕРОПРИЯТИЙ ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО  
БЛАГОПОЛУЧИЯ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ К ПРОВЕДЕНИЮ САММИТА**

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Российская Федерация; <sup>5</sup>ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В статье на примере Саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге (5–6 сентября 2013 г.) обоснованы основные принципы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки к мероприятию. Показана важность и необходимость оценки эпидемиологических рисков, определены приоритетные направления мероприятий в подготовительный период. Установлена приоритетность проведения эпидемиологического надзора и лабораторного контроля в отношении планируемых мест проживания участников мероприятия, поставщиков продуктов и предприятий общественного питания.

*Ключевые слова:* массовое мероприятие, эпидемиологический надзор, эпидемиологические риски, лабораторный контроль, противозидемические мероприятия.

G.G.Onishchenko<sup>1</sup>, B.P.Kuz'kin<sup>1</sup>, I.A.Rakitin<sup>2</sup>, N.S.Bashketova<sup>2</sup>, Yu.N.Korzhaev<sup>3</sup>, T.A.Grechaninova<sup>3</sup>,  
I.A.Dyatlov<sup>4</sup>, V.V.Kutyrev<sup>5</sup>, A.V.Toporkov<sup>5</sup>, I.G.Karnaukhov<sup>5</sup>, V.P.Toporkov<sup>5</sup>, S.A.Shcherbakova<sup>5</sup>,  
E.S.Kazakova<sup>5</sup>, I.N.Sharova<sup>5</sup>

**Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Management of the "G-20"  
Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 1. Epidemiological Risks and Core Operations  
for Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to the Summit**

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the city of Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation; <sup>4</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; <sup>5</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Established are the basic principles of sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to and managing of the public event by the example of "G-20" Summit. Outlined is the significance and essentiality of epidemiological risk assessment. Specified are the areas of priority as regards anti-epidemic activities in the run-up period. Established is the priority of epidemiological surveillance and laboratory control over the places of residence of participants, caterers and supplying companies, and public catering facilities.

*Key words:* mass event, epidemiological surveillance, epidemiological risks, laboratory control, anti-epidemic activities.

В последние годы в Российской Федерации неоднократно проводились как массовые спортивные, так и общественно-политические мероприятия с особым статусом, характеризующиеся кратковременностью, особой значимостью, международным участием. В связи с этим важным научно-практическим направлением становится обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в ходе проведения указанных мероприятий.

Одним из недавних международных общественно-политических мероприятий, проведенных на территории России, был саммит АТЭС на о. Русский. Опыт обеспечения санитарно-эпидемиологического

благополучия в период подготовки и проведения указанного мероприятия был проанализирован и представлен в виде монографии [2]. Авторами были выделены основные принципы обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности в период подготовки и проведения мероприятия: комплексность (эффективное взаимодействие всех заинтересованных служб и ведомств), системность (постоянный контроль за исполнением принятых решений) и приоритетность (определение ведущих в конкретной ситуации задач и их выполнение). Показано, что процесс подготовки к проведению мероприятия можно условно разделить на три этапа: аналитический,

организационно-методический и практический. Подчеркнута важность участия противочумных учреждений и специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) в обеспечении проведения мероприятия [3].

Известно, что при проведении спортивных, политических, культурных и других массовых мероприятий (далее – ММ) возможно возникновение эпидемиологических осложнений, обусловленных «внешними» и «внутренними» угрозами. «Внешние» угрозы предполагают возможность заноса инфекционных болезней приезжающими участниками и гостями в место проведения ММ и требуют комплексной оценки эпидемиологического риска по отношению к инфекционным болезням из перечней Международных медико-санитарных правил – ММСП (2005 г.) [1, 4, 5, 6, 7].

«Внутренние» угрозы связаны с возможной активизацией эндемичных и энзоотичных для территории проведения ММ инфекционных болезней вследствие увеличения концентрации людских контингентов, нагрузки на рекреационные зоны и контактов с факторами риска. Также не исключена возможность осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки вследствие совершения биотеррористических актов.

В связи с вышесказанным, санитарно-эпидемиологическое благополучие населения при проведении ММ обеспечивается усилением контроля указанных типов угроз. Основные направления принимаемых в таких случаях мер включают: оценку потенциальных эпидемиологических рисков; усиление существующей системы эпидемиологического надзора; контроль за санитарным состоянием объектов окружающей среды; создание групп реагирования на случай возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера; создание на время проведения ММ дополнительных структур, обеспечивающих централизацию и систематизацию получаемой информации о состоянии здоровья людей и объектах окружающей среды с целью принятия управленческих решений; привлечение специализированных мобильных формирований с целью усиления лабораторной службы; применение современных информационных технологий.

Состоявшийся в Санкт-Петербурге 5–6 сентября 2013 г. саммит стран «Группы двадцати» (далее – Саммит), несомненно, является массовым международным общественно-политическим мероприятием, так как, по данным ВОЗ, любое мероприятие может быть классифицировано как массовое, если оно требует заблаговременного планирования и обеспечения готовности страны-организатора к чрезвычайным ситуациям [7]. «Группа двадцати» – ведущий форум международного сотрудничества по наиболее важным аспектам международной экономической и финансовой повестки дня. В настоящее время статус постоянного члена «Группы двадцати» имеют 19 стран и Европейский союз. В состав «двадцатки», помимо России, входят Аргентина,

Австралия, Бразилия, Великобритания, Германия, Индия, Индонезия, Италия, Канада, Китай, Мексика, Саудовская Аравия, США, Турция, Франция, ЮАР, Южная Корея и Япония.

Рассмотрим меры, применявшиеся в период подготовки и проведения Саммита для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия.

**Эпидемиологическая обстановка в период, предшествовавший проведению Саммита.** В январе–августе 2013 г., по сравнению с аналогичным периодом 2012 г., отмечалась стабилизация или снижение показателей инфекционной заболеваемости по 30 нозологическим формам. В то же время отмечен рост заболеваемости краснухой на 44 %; ОРВИ – на 13,0 %, гриппом – в 5 раз, энтеровирусной инфекцией – в 2 раза. С начала 2013 г. выявлено 5 больных геморрагическими лихорадками, из них 4 завозных случая лихорадки денге, 1 – ГЛПС.

Количество групповых очагов инфекционных болезней за 8 месяцев 2013 г., относительно аналогичного периода 2012 г., уменьшилось почти вдвое и составило 6 очагов с 405 пострадавшими. При установлении этиологической причины вспышек были выявлены ротавирусная, сальмонеллезная и стафилококковая инфекции.

В июне 2013 г. в Санкт-Петербурге произошла вспышка эшерихиозов. Источником вспышки явилось сырое молоко, реализуемое в молочных автоматах города. Всего заболело шесть детей. В результате бактериологического и молекулярно-генетического анализа биологического материала (от больных) и предполагаемого источника инфекции – пакетированного молока, проведенных с участием специалистов ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, выявлены две группы штаммов патогенных эшерихий: энтерогеморрагические *E. coli* (EHEC) серотипа O157:H7 и энтеротоксигенные *E. coli* (STEC).

В период с 26.08 по 28.08.2013 г. было зарегистрировано 363 случая пищевого отравления среди рабочих, занятых на строительной площадке терминала аэропорта «Пулково». На 09:00 29.08.2013 г. все пострадавшие были выписаны в удовлетворительном состоянии. Окончательный диагноз – «пищевая токсикоинфекция». Летальных исходов не зарегистрировано. Своевременно проведенные противоэпидемические мероприятия позволили быстро и эффективно купировать вспышку.

Таким образом, проанализировав эпидемиологическую ситуацию в Санкт-Петербурге в период, предшествовавший проведению Саммита, необходимо было учитывать существующие риски осложнения эпидемиологической обстановки по инфекциям с аэрогенным механизмом передачи (грипп, ОРВИ и др.) и кишечным инфекциям различной этиологии.

**Эпидемиологические риски в отношении возможности завоза опасных инфекционных болезней.** Учитывая данные анализа эпидемиологической ситуации по опасным инфекционным болезням в тех

регионах мира, представители стран которых должны были принять участие в Саммите, наиболее вероятен был риск заноса лихорадки денге, малярии, кори, полиомиелита из стран регионов Западной части Тихого океана, Юго-Восточной Азии и Африки. Существовала вероятность заноса чумы, холеры, желтой лихорадки из стран Юго-Восточной Азии, Африки и Южной Америки. В связи с тем, что в Саудовской Аравии продолжают регистрировать заболевания, возбудителем которых является коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром, нельзя было исключить возможность заноса этого заболевания.

**Организационные мероприятия.** Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период проведения Саммита осуществлялось в соответствии с межведомственным «Планом обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, биологической, химической и радиационной безопасности в период проведения в 2013 году в городе Санкт-Петербурге встречи Глав государств и правительств «Группы двадцати».

Изданы шесть приказов Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербург (далее – Управление) по вопросам, касающимся санитарно-эпидемиологического обеспечения, создания оперативного штаба для координации всех мероприятий, организации дежурств в период подготовки и проведения Саммита, организации обследования объектов Саммита.

Изданы два постановления Главного государственного санитарного врача по городу Санкт-Петербургу по вопросам усиления борьбы с грызунами и проведения акарицидных и ларвицидных обработок территорий и водоемов в Санкт-Петербурге.

Вопрос об обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения Саммита рассматривался на заседаниях санитарно-противоэпидемической комиссии при Правительстве Санкт-Петербурга и четырех Межведомственных совещаниях, в том числе с участием представителей Главного Медицинского Управления Управления Делами Президента Российской Федерации (далее – ГМУ УД Президента Российской Федерации).

Управлением утвержден план мероприятий, выполняемых ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга», направленных на предотвращение ЧС санитарно-эпидемиологического характера в период подготовки и проведения Саммита.

В целях обеспечения деятельности Управления на объектах Саммита созданы и аккредитованы шесть дежурных бригад круглосуточной готовности для проведения отбора проб окружающей среды, мониторинга факторов среды обитания, радиационной обстановки.

Приняты меры по повышению антитеррористической защищенности лабораторий, в том числе по защите от несанкционированного доступа к исполь-

зуемым патогенным биологическим агентам (ПБА).

Управлением и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» (далее – Центр) были заключены соглашения о взаимодействии с учреждениями эпидемиологического, гигиенического и медико-биологического профиля, имеющимися в Санкт-Петербурге, в том числе с НИИ радиационной гигиены им. П.В.Рамзаева, на случай возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера.

Информация о ходе подготовки к проведению Саммита и результатах контрольно-надзорных мероприятий в отношении объектов, задействованных в Саммите, направлялась Управлением в ГМУ УД Президента Российской Федерации.

#### **Мероприятия в период подготовки к Саммиту.**

В период подготовки к проведению Саммита был усилен санитарно-гигиенический и микробиологический контроль объектов окружающей среды – воды водопроводной и поверхностных водоемов, пищевых продуктов и продовольственного сырья, атмосферного воздуха, радиационной обстановки.

За период с января по сентябрь 2013 г. выполнены исследования 5132 проб холодной и горячей воды из 144 контрольных точек на выходе из водопроводных станций и в разводящей сети. Превышения микробиологических показателей выявлены в 0,16 % проб, санитарно-химических показателей – в 2,03 %. За период с мая по сентябрь отобрано и исследовано 822 пробы воды открытых водоемов из 45 водных объектов в 133 контрольных точках. Результаты исследований воды водоемов были на уровне средне-многолетних значений.

Удельный вес пищевых продуктов, не отвечающих требованиям безопасности, составил по микробиологическим показателям в первом полугодии 2013 г. – 2,8 % (по РФ – 4, 7 %) , по санитарно-химическим – 0,5 % (по РФ – 2,7 %).

Управлением проведены плановые и внеплановые, на основании требований Прокуратуры Санкт-Петербурга, проверки объектов размещения, проживания, питания, медицинского обеспечения и поставщиков продукции, задействованных в мероприятиях Саммита. Проведены проверки 42 гостиниц, задействованных в размещении гостей и участников Саммита (согласно предварительной информации, поступившей из ГМУ УД Президента Российской Федерации), а также 11 лечебно-профилактических организаций (далее – ЛПО). В ходе проверок были выявлены нарушения санитарно-противоэпидемического режима, условий хранения пищевой продукции и сырья, недостаточность производственного контроля за состоянием водопроводной горячей и холодной воды, не полный охват медицинскими осмотрами и вакцинацией сотрудников.

За выявленные нарушения юридические и ответственные должностные лица были привлечены к административной ответственности, администрациям гостиниц и ЛПО даны предписания об устранении выявленных нарушений. Одна ЛПО исключена



из перечня объектов Саммита. Информация о выявленных нарушениях направлена в ФГБУ «Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора» Управления делами Президента Российской Федерации.

В ходе проверок поставщиков пищевых продуктов и продовольственного сырья выявлены нарушения санитарно-эпидемиологических требований: неудовлетворительное состояние отделки части производственных и складских помещений; отсутствие должного производственного контроля режима хранения пищевых продуктов; несоблюдение сроков прохождения медицинских осмотров работающего персонала. Управлением даны предписания об устранении выявленных нарушений.

В период подготовки к проведению Саммита (январь–сентябрь 2013 г.) проводился лабораторный мониторинг в 36 гостиницах города и 9 ЛПО. Проведено лабораторное исследование 1034 проб пищевых продуктов, 230 проб воды питьевой пищеблоков, 1385 смывов пищеблоков, 150 проб холодной воды систем водоснабжения гостиниц, ЛПО, бассейнов, 73 пробы горячей воды систем водоснабжения гостиниц, ЛПО. Выявлено 2,35 % неудовлетворительных проб пищевых продуктов, 0,02 % питьевой воды, 0,9 % смывов пищеблоков.

При исследовании проб воды из гостиниц в одном случае в пробе горячей воды обнаружено превышение концентрации легионелл, в двух – несоответствие холодной воды по санитарно-химическим показателям. За выявленные нарушения Управлением вынесено 286 штрафов в соответствии с Кодексом административных правонарушений Российской Федерации. Центром проведены санитарно-эпидемиологические экспертизы программ и результатов исследований, выполненных в рамках производственного контроля 26 гостиниц и 5 ЛПО.

За период июль–август 2013 г. исследовано 765 проб воды 48 поверхностных водоемов из 85 стационарных точек на наличие холерных вибрионов, из них в 172 пробах выделены атоксигенные холерные вибрионы *V. cholerae* не O1, не O139. За период январь–август 2013 г. по городу было выполнено 22171 исследование атмосферного воздуха в 46 фиксированных точках и двух дополнительных. Превышения гигиенических нормативов выявлены в 0,32 % исследованных проб.

На объектах бюджетной сферы, в жилищном фонде и коммерческих предприятиях города, в том числе задействованных в обеспечении мероприятий Саммита, была проведена единовременная сплошная дератизация. Обработано 28706 объектов города общей площадью 102987000 кв.м. После проведения дератизации 92,8 % объектов и 89,2 % площадей освобождены от грызунов. В мае–июне 2013 г. выполнены акарицидные обработки территорий города на общей площади 352 га. Дополнительно проведены акарицидные и ларвицидные обработки территории ФГБУ «Государственный Комплекс «Дворец

Конгрессов» и прилегающей к нему территории на общей площади 3 га, эффективность – 100 %. На 22.08.2013 г. проведена трехкратная обработка 236 анофелогенных водоемов на общей площади 734,2 га, эффективность обработок – 98,5 %.

В Санкт-Петербурге в стационарных точках мониторинга показателей радиационной безопасности обеспечивался сбор и анализ данных о радиационной обстановке по следующим показателям: мощность дозы гамма-излучения на открытой местности; суммарная бета-активность атмосферных выпадений; суммарная удельная активность альфа- и бета-излучающих радионуклидов в питьевой воде водоемчиков и распределительной сети. Введена дополнительная мониторинговая точка контроля мощности дозы гамма-излучения.

Выполнена автомобильная гамма-съемка участков дорожного полотна на маршрутах от аэропорта Пулково до пересечения Санкт-Петербургского шоссе и Красносельского шоссе.

Результаты исследований и измерений не превышали регламентированных санитарными правилами значений параметров радиационной обстановки. Отработаны схемы оповещения и оперативного реагирования специализированных подразделений МЧС и Роспотребнадзора в случае аварийной ситуации, связанной с обнаружением неконтролируемого источника ионизирующего излучения. Проведена проверка готовности радиологических бригад Центра и профильного отдела Управления.

**Санитарно-карантинные пункты пропуска.** Управлением утверждены «Оперативные планы проведения первичных противоэпидемических мероприятий в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации» на водном и воздушном пунктах пропуска. Актуализированы схемы оповещения должностных лиц при выявлении больного (подозрительного на инфекционное заболевание). Проведены тренировочные учения с вводом условного больного в воздушном и морском пунктах пропуска.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора от 27.08.2012 № 871 «О типовых требованиях к оснащению и оборудованию санитарно-карантинных пунктов и организаций, обеспечивающих деятельность санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации» санитарно-карантинные пункты в полном объеме оснащены оборудованием для дистанционного измерения температуры тела (9 стационарных и 13 переносных тепловизоров), универсальными укладками для забора материала на исследование, противоэпидемическим имуществом.

Для участия в Саммите на территории пунктов пропуска заявлены 11 организаций, оказывающих услуги общественного питания и 1 цех бортового питания. В мае 2013 г. в отношении всех объектов проведены контрольно-надзорные мероприятия, выявлены типовые нарушения санитарно-эпидемиоло-



гического режима: отсутствие маркировки разделочного и уборочного инвентаря, несоблюдение графика уборки помещений. За выявленные нарушения юридические и должностные лица привлечены к административной ответственности.

Для участия в Саммите заявлены 27 водных транспортных средств, 26 из которых обследованы и на них выданы судовые санитарные свидетельства. Одно транспортное средство не обследовано ввиду его реконструкции.

Бункеровка питьевой водой водных транспортных средств осуществлялась из гидрантов береговой водораспределительной сети ОАО «Пассажирский порт Санкт-Петербург «Морской фасад». Производственный контроль качества питьевой воды осуществлялся в течение всего навигационного периода (ежемесячно). Нарушений при обеспечении водных судов питьевой водой не установлено.

Воздушные суда снабжались питьевой водой централизованно от сетей ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга» через водозаправочную станцию. Производственный контроль за качеством питьевой воды на водозаправочной станции проводился ежемесячно. По результатам экспертной оценки, питьевая вода за истекший период 2013 г. соответствовала гигиеническим нормативам.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, можно сделать следующие выводы:

1. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки к проведению Саммита осуществлялось в соответствии с основными принципами – комплексностью, системностью и приоритетностью в организации и проведении мероприятий.

2. Органы и учреждения Роспотребнадзора в период подготовки к проведению Саммита в условиях мегаполиса (Санкт-Петербург) в полной мере обеспечивали эпидемиологический надзор с лабораторным контролем инфекционных болезней и вредных факторов окружающей среды.

3. На основе ретроспективного анализа эпидемиологической обстановки и оценки эпидемиологических рисков в период подготовки к Саммиту были спланированы и проведены адекватные организационные мероприятия.

4. В связи со сжатыми сроками проведения Саммита, максимальный объем работы пришелся на подготовительный период и включал следующие направления мероприятий:

- подготовку распорядительных документов, планов, соглашений по вопросам межведомственного взаимодействия, по созданию структуры для координации всех мероприятий, по проведению профилактических мероприятий, в том числе дезинсекции и дератизации;

- проведение постоянного анализа инфекционной заболеваемости;

- усиление надзорных мероприятий в отноше-

нии гостиниц, ЛПО, поставщиков продуктов питания, предприятий общественного питания;

- усиление санитарно-гигиенического и микробиологического контроля за объектами окружающей среды – водой водопроводной и поверхностных водоемов, продовольственным сырьем и пищевыми продуктами, атмосферным воздухом, радиационной обстановкой;

- определение лабораторной базы, порядка забора для лабораторных исследований и доставки в лаборатории проб клинического материала и объектов окружающей среды в период проведения Саммита;

- проведение санитарно-эпидемиологических экспертиз программ производственного контроля гостиниц, ЛПО, предприятий общественного питания;

- проверку готовности и оснащения СКП в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации;

- проверку готовности специализированных формирований, предназначенных для реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера.

При сжатых сроках проведения массовых мероприятий, что имело место в случае саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге, возрастает значение подготовительного периода, в течение которого необходимо оценить основные эпидемиологические риски и адекватно спланировать проведение профилактических (противоэпидемических) и надзорных мероприятий. При этом необходимо акцентировать усилия на проведении эпидемиологического надзора и лабораторного контроля в отношении планируемых мест проживания участников мероприятия, поставщиков продуктов и предприятий общественного питания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быстрая оценка событий, представляющих непосредственную опасность для здоровья населения. WHO/HSE/GAR/ARO/2012.1. Женева: ВОЗ, 2012. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70810/6/WHO\\_HSE\\_GAR\\_ARO\\_2012.1\\_rus.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70810/6/WHO_HSE_GAR_ARO_2012.1_rus.pdf) (дата обращения: 30.10.2013)
2. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Косилко С.А., Никитин А.Я. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012. Новосибирск: Наука-Центр; 2013. 419 с.
3. Балахонов С.В., Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Алленов А.В., Хоменко Т.В., Иванов Л.И., Никитин А.Я., Косилко С.А., Ковальский А.Г., Куликалова Е.С. Роль противочумных учреждений в обеспечении эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении саммита АТЭС-2012. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:5–12.
4. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Сафронов В.А., Кедрова О.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:26–32.
5. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Куклев Е.В., Кедрова О.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Попов Н.В., Князева Т.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка потенциальной эпидемической опасности международных массовых мероприятий по актуальным инфекционным болезням. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:29–39.
6. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М: Практическая медицина; 2007. 480 с.
7. WHO. Communicable disease alert and response for mass gatherings: key considerations, 2008. [http://www.who.int/csr/Mass\\_gatherings2.pdf](http://www.who.int/csr/Mass_gatherings2.pdf) (дата обращения: 12.02.2013 г.).

## References

1. Rapid risk assessment of acute public health events. WHO/HSE/GAR/ARO/2012.1. Geneva: WHO, 2012 [cited 30 Oct 2013]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70810/6/WHO\\_HSE\\_GAR\\_ARO\\_2012.1\\_rus.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70810/6/WHO_HSE_GAR_ARO_2012.1_rus.pdf)
2. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Kosilko S.A., Nikitin A.Ya. [Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Managing of APEC-2012 Summit]. Novosibirsk: Nauka-Tsent; 2013. 419 p.
3. Balakhonov S.V., Andaev E.I., Chesnokova M.V., Allenov A.V., Khomenko T.V., Ivanov L.I., Nikitin A.Ya., Kosilko S.A., Koval'sky A.G., Kulikalova E.S. [The role of anti-plague institutions in provision of the epidemiological well-being during the preparation and carrying out of the APEC 2012 Summit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:5–12.
4. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Safronov V.A., Kedrova O.V., Toporkov V.P., Kutuyev V.V. [Evaluation of external and internal threats to sanitary-epidemiological welfare of the population in the context of mass sporting events]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:26–32.
5. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Kuklev E.V., Kedrova O.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Popov N.V., Knyazeva T.V., Toporkov V.P., Kutuyev V.V. [Assessment of the potential epidemic hazard as regards international public events in terms of the currently important infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:29–39.
6. Cherkassky B.L. [The Concept of Risk in Epidemiology]. M.: Praktich. Meditsina; 2007. 480 p.
7. WHO. Communicable disease alert and response for mass gatherings: key considerations, 2008 [cited 12 Feb 2013]. Available from: [http://www.who.int/csr/Mass\\_gatherings2.pdf](http://www.who.int/csr/Mass_gatherings2.pdf).

## Authors:

*Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P.* Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.  
*Rakitin I.A., Bashketova N.S.* Rospotrebnadzor Administration in Saint-Petersburg. 19, Stremyannaya St., Saint-Petersburg, 191025, Russian

Federation. E-mail: [uprav@78rospotrebnadzor.ru](mailto:uprav@78rospotrebnadzor.ru)

*Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A.* Center of Hygiene and Epidemiology in the city of Saint-Petersburg. 1, Saint-Petersburg, 191023, Russian Federation. E-mail: [centr@78cege.ru](mailto:centr@78cege.ru)

*Dyatlov I.A.* State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)

*Kutuyev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

## Об авторах:

*Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П.* Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, г. Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

*Ракитин И.А., Башкетова Н.С.* Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Российская Федерация, 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19. E-mail: [uprav@78rospotrebnadzor.ru](mailto:uprav@78rospotrebnadzor.ru)

*Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А.* Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург. Российская Федерация, 191023, Санкт-Петербург, Малая Садовая, д. 1. E-mail: [centr@78cege.ru](mailto:centr@78cege.ru)

*Дятлов И.А.* Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)

*Кутуев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Щербак С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Поступила 15.11.13.

Г.Г.Онищенко<sup>1</sup>, Б.П.Кузькин<sup>1</sup>, И.А.Ракитин<sup>2</sup>, Н.С.Башкетова<sup>2</sup>, Ю.Н.Коржаев<sup>3</sup>, Т.А.Гречанинова<sup>3</sup>,  
И.А.Дятлов<sup>4</sup>, В.В.Кутырев<sup>5</sup>, А.В.Топорков<sup>5</sup>, И.Г.Карнаухов<sup>5</sup>, В.П.Топорков<sup>5</sup>, С.А.Щербакова<sup>5</sup>,  
Е.С.Казакова<sup>5</sup>, И.Н.Шарова<sup>5</sup>

**ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ  
В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ САММИТА «ГРУППЫ ДВАДЦАТИ»  
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013 Г.  
СООБЩЕНИЕ 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРИОРИТЕТНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАБОТЫ  
В ПЕРИОД ПРОВЕДЕНИЯ САММИТА**

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Российская Федерация; <sup>5</sup>ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В статье определены приоритетные направления противоэпидемических мероприятий непосредственно в период проведения Саммита. Охарактеризованы условия, требующие привлечения дополнительных сил для усиления лабораторного контроля в рамках эпидемиологического надзора. Обосновано привлечение мобильной группы СПЭБ для обеспечения лабораторного контроля объектов окружающей среды на наличие ПБА I–II групп патогенности. Представлена тактика использования СПЭБ в ходе обеспечения проведения массовых мероприятий. Показана необходимость применения современных методов экспресс и ускоренной диагностики в рамках лабораторного обеспечения надзорных мероприятий в ходе Саммита.

*Ключевые слова:* массовые мероприятия, саммит, эпидемиологический надзор, лабораторный контроль, СПЭБ, санитарно-эпидемиологическое благополучие.

G.G.Onishchenko<sup>1</sup>, B.P.Kuz'kin<sup>1</sup>, I.A.Rakitin<sup>2</sup>, N.S.Bashketova<sup>2</sup>, Yu.N.Korzhaev<sup>3</sup>, T.A.Grechaninova<sup>3</sup>,  
I.A.Dyatlov<sup>4</sup>, V.V.Kutyrev<sup>5</sup>, A.V.Toporkov<sup>5</sup>, I.G.Karnaukhov<sup>5</sup>, V.P.Toporkov<sup>5</sup>, S.A.Shcherbakova<sup>5</sup>,  
E.S.Kazakova<sup>5</sup>, I.N.Sharova<sup>5</sup>

**Sanitary-Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 2. Management and Priority Areas of Anti-Epidemic Activities as Regards "G-20" Summit Campaign**

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the city of Saint-Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation; <sup>4</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; <sup>5</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Specified are the priority areas as regards anti-epidemic activities relevant to the carrying out of the event itself. Characterized are the factors that require participation of auxiliary force for straightening of laboratory control within the frames of epidemiological surveillance. Justified is the involvement of mobile specialized anti-epidemic teams (SAET) with a view to provision of laboratory control over ambient environment objects for the presence of PBA of the I–II groups of pathogenicity. Discussed is the tactics of SAET mobilization for the provision of mass event support. Outlined is the necessity of application of the state-of-the-art methods for express- and rapid diagnostics within the frames of laboratory support as concerns monitoring activities in the course of the Summit as such.

*Key words:* mass events, summit, epidemiological surveillance, laboratory control, SAET, sanitary-epidemiological welfare.

Как уже было отмечено в сообщении 1, состоявшийся в Санкт-Петербурге 5–6 сентября 2013 г. саммит стран «Группы двадцати» (далее – Саммит) является массовым общественно-политическим мероприятием с международным участием (далее – Мероприятие). В период подготовки к проведению Саммита были оценены существующие эпидемиологические риски. Установлены риски осложнения эпидемиологической обстановки по инфекциям с аэрогенным механизмом передачи (грипп, ОРВИ и др.) и кишечным инфекциям различной этиологии.

Наиболее вероятен был риск заноса лихорадки денге, малярии, кори, полиомиелита из стран регионов Западной части Тихого океана, Юго-Восточной Азии и Африки. Существовала вероятность заноса чумы, холеры, желтой лихорадки из стран Юго-Восточной Азии, Африки и Южной Америки. В подготовительный период в соответствии с основными принципами – комплексностью, системностью и приоритетностью – были проведены адекватные организационные и профилактические мероприятия.

Одним из важнейших аспектов при организа-

ции и проведении мероприятия такого уровня является обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. При этом значительная роль отводится лабораторному обеспечению эпидемиологического надзора за инфекционной заболеваемостью и факторами окружающей среды, которые могут оказать негативное воздействие на здоровье участников и гостей. Саммит является мероприятием с особым статусом, что определяется его кратковременностью, особой значимостью, международным уровнем. В связи с тем, что в период проведения подобных мероприятий возрастает потенциальная опасность и риск преднамеренного применения ПБА в террористических целях, возникает необходимость проведения широкомасштабного лабораторного скрининга объектов окружающей среды (прежде всего, пищевых продуктов, продовольственного сырья, воды) на наличие ПБА и биологических токсинов.

Кроме того, возникают такие дополнительные задачи в рамках лабораторной диагностики, как обеспечение готовности к проведению лабораторных исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекционных болезней; обеспечение готовности к проведению лабораторных исследований на максимальный спектр возбудителей инфекционных болезней и токсинов; обеспечение увеличения объемов лабораторных исследований.

В связи с вышесказанным, несмотря на самодостаточность лабораторной базы учреждений Роспотребнадзора, на территории проведения Мероприятия, в связи с его особым статусом, для осуществления лабораторного обеспечения могут использоваться приданные силы – специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ) Роспотребнадзора, функционирующие на базе научно-исследовательских противочумных институтов, мобильные формирования и группы специалистов научно-исследовательских институтов эпидемиологического, микробиологического, радиологического профиля.

Основанием привлечения СПЭБ в ходе подготовки и проведения массовых мероприятий (ММ) является возникновение (риск возникновения) ЧС санитарно-эпидемиологического характера, являющейся объектом деятельности СПЭБ. Тактика использования СПЭБ в ходе обеспечения проведения ММ варьирует в зависимости от эпидемиологической обстановки, наличия эпидемиологических рисков, стоящих перед СПЭБ задач и планируемых объемов исследований.

СПЭБ в полном (или усиленном) составе задействуется для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в ходе проведения ММ, когда необходимо решение нескольких задач:

- обеспечение готовности к проведению лабораторной диагностики, противоэпидемических (профилактических) мероприятий при выявлении больного (подозрительного) на особо опасные инфекционные болезни и при регистрации очагов инфекционных

болезней с групповой заболеваемостью;

- оказание практической и методической помощи органам и организациям Роспотребнадзора, здравоохранения по вопросам готовности к работе в условиях ЧС санитарно-эпидемиологического характера;

- участие в мониторинге возбудителей инфекционных болезней в материале от людей и из объектов окружающей среды.

СПЭБ в полном (или усиленном) составе также может привлекаться в случае осложнения эпидемиологической обстановки в период подготовки или проведения ММ – возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера (вспышки опасных инфекционных болезней, в том числе новых).

СПЭБ в виде отдельных лабораторных модулей или групп специалистов задействуется в следующих случаях: при необходимости выполнения большого объема исследований за короткий период, индикации возбудителей инфекционных болезней в клиническом материале и объектах окружающей среды в максимально короткие сроки при проведении лабораторного скрининга объектов окружающей среды на наличие ПБА; при необходимости усиления местной противоэпидемической службы при осложнении эпидемиологической обстановки в период подготовки к ММ.

Важным аспектом при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в период Мероприятия является время выдачи лабораторией ответа при исследовании клинического материала от больного с подозрением на инфекционное заболевание, а также при проведении скрининговых исследований на наличие ПБА и токсинов. В данной ситуации необходимо получение ответа относительно этиологии болезни или наличия ПБА в пробах объектов окружающей среды в максимально короткие сроки для того, чтобы своевременно были приняты соответствующие управленческие решения, проведены адекватные противоэпидемические и профилактические мероприятия. Максимально быстро результат исследований может быть выдан только на основании использования ускоренных методов лабораторной диагностики. Такой алгоритм должен быть введен распорядительным документом Управления Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации.

#### ***Мероприятия в период проведения Саммита.***

В период проведения Саммита с 04.09. по 06.09.2013 г. эпидемиологическая обстановка в Санкт-Петербурге оценивалась как благополучная. Всего зарегистрировано 1014 случаев инфекционных и паразитарных заболеваний, из них: ОКИ – 348 случаев, ОРВИ и грипп – 194, вирусные гепатиты – 138, туберкулез – 109, скарлатина – 5, ветряная оспа – 5, эпидемический паротит – 2, инфекционный мононуклеоз – 2, краснуха – 1, дифтерия – 1, коклюш – 6, сальмонеллез – 5, чесотка – 14, микозы – 48, клещевой боррелиоз – 7. Всего в период с 04.09. по 06.09.2013 г. госпи-



тализовано 642 инфекционных больных.

Показатели заболеваемости основными нозологическими формами соответствовали среднемуго-летним значениям. Случаев инфекционных и паразитарных заболеваний, неэндемичных для территории города, не выявлено. Групповых очагов инфекционных и паразитарных заболеваний не зарегистрировано. Зарегистрировано три случая инфекционных заболеваний среди лиц, участвующих в обеспечении проведения Саммита (два случая ветряной оспы у сотрудников ОМОН, один случай острого энтероколита у сотрудника МВД). Информация о выявлении инфекционных больных среди лиц, обеспечивающих проведение Саммита, была незамедлительно передана в штаб рабочей группы по медицинскому обеспечению мероприятий Саммита.

В воздушном пункте пропуска в период с 04.09 по 06.09.2013 г. осуществлялась термометрия прибывающих лиц. Термометрии подвергнуто 1058 человек, прибывших на 38 рейсах. Организована круглосуточная термометрия лиц перед посадкой на водные транспортные средства («Метеоры») на территории Морского вокзала № 4. За период с 04.09 по 07.09.2013 г. проведен контроль 5310 человек. Лиц с повышенной температурой тела не выявлено.

Приказом Управления Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу (далее – Управление) от 02.09.2013 г. № 178 «Об обследовании объектов саммита» был определен перечень мест размещения делегаций саммита и объектов общественного питания, в отношении которых в период с 03.09 по 07.09.2013 г. ежедневно проводились надзорные мероприятия с отбором проб пищевого сырья, продукции и воды на соответствие требованиям санитарных правил и нормативов. Также упомянутый приказ определял логику отбора и доставки проб для лабораторного исследования. Нарушения требований санитарных правил выявлены в 8 гостиницах, выданы соответствующие предписания об устранении выявленных нарушений.

Информация о повреждениях и авариях на городских сетях водоснабжения и канализования в Управление не поступала.

В период проведения Саммита с 01.09 по 10.09.2013 г. проводился ежедневный контроль питьевой воды, предназначенной для заправки транспортных средств. Неудовлетворительных результатов не зарегистрировано. Специалистами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» (далее – Центр) отобраны и проведены лабораторные исследования проб из 23 гостиниц, предприятий бортового питания, в том числе 609 проб горячей и холодной воды для проведения лабораторных исследований на микробиологические показатели, включая исследование 69 проб на особо опасные инфекции, легионеллы, вирусы, 98 проб на санитарно-химические показатели; 443 пробы пищевых продуктов и продовольственного сырья, в том числе 341 проба на микробиологические показатели,

106 – на санитарно-химические, 192 – на особо опасные инфекции.

Неудовлетворительные результаты получены по 26 пробам, в том числе в 10 пробах по БГКП, 1 – по ОМЧ, 1 – по ОКБ и ТКБ, 2 – КМАФАнМ, 5 – стафилококковый энтеротоксин; 1 – по химическим показателям, 1 – обнаружена сальмонелла. Недоброкачественная продукция общим объемом 716,5 кг и 6600 яиц уничтожена в соответствии с Постановлениями об утилизации.

В ИЛЦ Центра проведены лабораторные исследования 270 проб, отобранных специалистами ФСО, в том числе проб пищевых продуктов – 244; проб воздуха – 12; проб пищевых продуктов на токсикологию – 14, проб пищевых продуктов на радиологические исследования – 6. Из них не соответствовали требованиям нормативных документов 49 проб. Забраковано и утилизировано 3 партии сырья и готовой продукции объемом 83 кг, не соответствующих нормативным требованиям по микробиологическим показателям.

В ходе осуществления Центром мониторинга атмосферного воздуха превышений гигиенических нормативов для атмосферного воздуха населенных мест в мониторинговых и дополнительных точках в пос. Стрельна не выявлено.

В дополнительных точках исследований воды водных объектов пос. Стрельна: рек Кикенка, Стрелка, Троицкого ручья, Орловского пруда зарегистрировано превышение микробиологических показателей – ОКБ и ТКБ от 2,4 до 24,0 ПДК. Проведены дополнительные исследования воды водных объектов Государственного музея-заповедника «Петергоф»: чаша фонтана «Самсон», Верхнесадский канал, Ольгинский канал, Большой круглый пруд. Превышений санитарно-химических показателей не зарегистрировано.

В период проведения Саммита обеспечено круглосуточное дежурство радиологических бригад и специалистов отдела надзора за радиационной безопасностью Управления. Значимых колебаний мощности дозы гамма-излучения по данным радиационно-гигиенического мониторинга, в том числе в дополнительной мониторинговой точке пос. Стрельна не выявлено. Соответствие радиационной обстановки требованиям санитарных правил и нормативов также подтверждается данными Автоматизированной системы контроля за радиационной обстановкой (16 стационарных постов наблюдения АСКРО Санкт-Петербурга). Информация о радиационных происшествиях и авариях на радиационных объектах, поднадзорных Управлению, не поступала.

В целях усиления лабораторной базы Центра, расширения спектра нозологических форм инфекционных болезней в рамках лабораторной диагностики, обеспечения проведения лабораторной диагностики возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности и биологических токсинов, в Санкт-Петербург в соответствии с приказом

Роспотребнадзора от 30.08.2013 г. № 632 в период с 1 по 7 сентября 2013 г. была направлена группа специалистов (10 чел.) СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» с двумя лабораториями на базе автошасси. Уже имелся опыт использования группы специалистов СПЭБ в ходе обеспечения саммита АТЭС на острове Русский в 2012 году [1, 2]. Однако впервые передислокация группы СПЭБ с автолабораториями была осуществлена транспортной авиацией (Ил-76 МД). Основные задачи, поставленные перед мобильной группой СПЭБ, включали:

- проведение в рамках эпидемиологического надзора лабораторного контроля питьевой воды и пищевых продуктов на наличие возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии;

- мониторинг воды открытых водоемов на вибриофлору;

- исследование воды систем горячего водоснабжения гостиниц на наличие возбудителя легионеллеза.

Исходя из этого, мобильная группа СПЭБ была укомплектована диагностическими препаратами и тест-системами, обеспечивающими индикацию широкого спектра возбудителей опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы, токсинов.

Задействование СПЭБ в виде мобильной группы с автолабораториями и поставленные перед СПЭБ задачи вполне согласуются с тактикой использования данных формирований и их функциями, регламентированными нормативными документами [3, 4].

Автолаборатории СПЭБ были развернуты на территории Центра. В период проведения Саммита (3–6 сентября) в мобильных лабораториях СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» исследованы 261 проба (отобранных и доставленных специалистами Центра), в том числе: вода открытых водоемов – 12; вода из номерного фонда и пищеблоков гостиниц на ООИ – 21; пищевые продукты и сырье из ресторанов гостиниц – 157; вода систем горячего водоснабжения гостиниц – 36; бортовое питание (для транспортных средств) – 35. Все протоколы лабораторных исследований передавались в Управление.

В связи с необходимостью получения результатов исследования в возможно более короткие сроки, использовались ускоренные и экспресс-методы анализа. Проведено исследование: МФА – 212 проб, 1241 исследование (на возбудители чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, сапа, мелиоидоза, легионеллеза, норо-, рота-, астра- и энтеровирусы), все результаты отрицательные; ПЦР – 160 проб, 854 исследования (на возбудители чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза, легионеллеза, норо-, рота-, астра- и энтеровирусы). В ряде случаев, в связи с большим количеством проб и нагрузкой на специалистов, проводилось объединение проб на этапе постановки ПЦР (пробы из одного адреса отбора, одного вида продукции). Выделение НК из об-

разцов проб осуществлялось индивидуально.

Дополнительно проведено исследование методом ИХА 66 проб (330 исследований) пищевых продуктов из 9 наиболее значимых гостиниц (объекты госохраны) на наличие биологических токсинов – ботулинического типов А и В, рицина, стафилококкового энтеротоксина, холерного токсина. Результаты были отрицательные. При исследовании методом ИХА пробы пищевых продуктов получена положительная реакция на стафилококковый энтеротоксин. При исследовании этой же пробы методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией обнаружена ДНК *St. aureus*. При бактериологическом исследовании данной пробы специалистами филиала Центра получена культура *St. aureus*, которая передана для дальнейшей идентификации и углубленного изучения, с учетом имеющихся эпидемиологических данных, ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ) и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Специалисты ГНЦ ПМБ (5 чел.) в период проведения Саммита усиливали лабораторию особо опасных и вирусологических исследований Центра. Совместно с ними проведена идентификация 21 подозрительных на патогенную микрофлору культур с использованием микробиологического анализатора и методом ПЦР. В ГНЦ ПМБ направлены 18 культур микроорганизмов для дальнейшего типирования и идентификации.

Таким образом, учитывая вышеизложенное, можно сделать следующие выводы:

1. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия непосредственно в период проведения Саммита так же, как и в период подготовки, осуществлялось в соответствии с основными принципами – комплексностью, системностью и приоритетностью в организации и проведении мероприятий.

2. Определены ситуации в рамках массовых мероприятий, которые, несмотря на достаточность сил и средств учреждений Роспотребнадзора на территории мегаполиса, требуют привлечения дополнительных сил для проведения лабораторного контроля и характеризуются:

- необходимостью обеспечения готовности к проведению лабораторных исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекционных болезней;

- необходимостью обеспечения готовности к проведению лабораторных исследований на максимальный спектр возбудителей инфекционных болезней и токсинов;

- необходимостью проведения широкомасштабного лабораторного скрининга объектов окружающей среды на наличие ПБА и биологических токсинов;

- необходимостью обеспечения увеличения объемов лабораторных исследований.

3. Приоритетными направлениями мероприятий в период проведения Саммита являлись:

- эпидемиологический надзор за инфекционной заболеваемостью;

- усиленный надзор за местами размещения, питания участников и гостей Саммита с осуществлением лабораторного контроля продовольственного сырья, пищевых продуктов, воды;

- продолжение усиленного контроля объектов окружающей среды (вода, воздух, радиационная обстановка);

- проведение широкомасштабного лабораторного скрининга объектов окружающей среды (прежде всего пищевых продуктов, продовольственного сырья, воды) на наличие ПБА и биологических токсинов.

4. Задействование мобильной группы СПЭБ в период проведения Саммита позволило расширить спектр нозологических форм инфекционных болезней в рамках лабораторной диагностики, обеспечить проведение большого объема лабораторных исследований (скрининг) на наличие возбудителей опасных инфекционных болезней, что в данном случае объяснялось потенциальной возможностью возникновения случаев особо опасных инфекций.

5. В период проведения Саммита, при большом объеме лабораторных исследований, высокой нагрузке на персонал лабораторий, использование методов экспресс и ускоренной диагностики (ПЦР, ИФА, МФА) при исследовании клинического материала и автоматизированных технологий при исследовании пищевых продуктов, использовании приема группировки проб, позволило сократить время анализа (до 6–24 ч) и увеличить объем исследований до 50 %.

6. Необходимо закрепление в нормативно-методических документах алгоритма осуществления лабораторной диагностики при проведении массовых мероприятий с международным участием.

В целом комплекс мероприятий, проведенных органами и учреждениями Роспотребнадзора, других ведомств и приданными силами под контролем ГМУ УД Президента Российской Федерации, в период подготовки и работы саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в сентябре 2013 г. позволил обеспечить санитарно-эпидемиологическое благополучие в ходе его проведения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Косилко С.А., Никитин А.Я. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012. Новосибирск: Наука-Центр; 2013. 419 с.
2. Балахонов С.В., Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Алленов А.В., Хоменко Т.В., Иванов Л.И., Никитин А.Я., Косилко С.А., Ковальский А.Г., Куликалова Е.С. Роль противочумных учрежде-

ний в обеспечении эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении саммита АТЭС-2012. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:5–12.

3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Куличенко А.Н., Топорков В.П. Специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ): опыт работы и тактика применения в современных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 4(98):5–14.

4. Регламент (стандарт) функционирования специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) при ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера. В кн.: Сборник нормативно-методических документов по организации работы специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора. Саратов: ОАО «Приволжское издательство»; 2008. С. 31–164.

#### References

1. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Kosilko S.A., Nikitin A. Ya. [Sanitary–Epidemiological Welfare Provision in the Preparations to and Managing of APEC-2012 Summit]. Novosibirsk: Nauka-Tsentr; 2013. 419 p.

2. Balakhonov S.V., Andaev E.I., Chesnokova M.V., Allenov A.V., Khomenko T.V., Ivanov L.I., Nikitin A. Ya., Kosilko S.A., Koval'sky A.G., Kulikalova E.S. [The Role of anti-plague institutions in provision of the epidemiological well-being during the preparation and carrying out of the APEC 2012 Summit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:5–12.

3. Onischenko G.G., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Koulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Specialized anti-epidemic teams (SAET): the experience of work and tactics of their employment in modern conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 4(98):5–14.

4. [Regulation (standard) of specialized anti-epidemic teams (SAET) functioning during liquidation of natural and technogenous emergency recovery and response to medical-sanitary implications and aftermaths]. In: [Package of Regulatory and Procedural Guidelines on the Rospotrebnadzor SAET Activity Management]. Saratov; 2008. P. 31–164.

#### Authors:

Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.

Rakitin I.A., Bashketova N.S. Rospotrebnadzor Administration in Saint-Petersburg. 19, Stremyannaya St., Saint-Petersburg, 191025, Russian Federation. E-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Korzhayev Yu.N., Grechaninova T.A. Center of Hygiene and Epidemiology in the city of Saint-Petersburg. 1, Saint-Petersburg, 191023, Russian Federation. E-mail: centr@78ce.ru

Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

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

#### Об авторах:

Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, г. Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Ракитин И.А., Башкетова Н.С. Управление Роспотребнадзора по городу Санкт-Петербургу, Российская Федерация, 191025, Санкт-Петербург, ул. Стремянная, д. 19. E-mail: uprav@78rospotrebnadzor.ru

Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А. Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург. Российская Федерация, 191023, Санкт-Петербург, Малая Садовая, д. 1. E-mail: centr@78ce.ru

Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

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

Поступила 15.11.13.



А.К.Гражданов<sup>1</sup>, О.И.Кожанова<sup>2</sup>, А.В.Топорков<sup>1</sup>, Т.З.Аязбаев<sup>3</sup>, Н.И.Матвеева<sup>2</sup>, И.Г.Карнаухов<sup>1</sup>,  
Н.В.Попов<sup>1</sup>, А.С.Раздорский<sup>1</sup>, Г.Н.Архипова<sup>2</sup>

# **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЯВЛЕНИЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В САРАТОВСКОЙ И ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ ОБЛАСТЯХ В ЦЕЛЯХ СОВРЕМЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ**

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, Саратов, Российская Федерация;  
<sup>3</sup>Уральская противочумная станция Комитета Госсанэпиднадзора Минздрава Республики Казахстан, Уральск, Республика Казахстан

На примере Саратовской и Западно-Казахстанской областей проведен анализ современной эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в приграничных регионах двух государств: Российской Федерации и Республики Казахстан. Показано общее пространство природно-очаговых территорий не только давно существующих здесь инфекций, таких как туляремия, но интенсивное распространение и формирование природных очагов новых инфекционных болезней: Крымской геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила. Особую актуальность данное явление приобретает в связи с тем, что распространение ранее неизвестных в этих местах инфекций происходит одновременно на смежных территориях двух областей. Выявленная однотипность эпидемиологических рисков для населения в соседних регионах обуславливает необходимость выработки единой системы предупреждения чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера на территориях обеих областей.

*Ключевые слова:* чума, туляремия, холера, бруцеллез, сибирская язва, бешенство, геморрагические лихорадки, природный очаг, эпидемиологические риски, профилактика.

A.K.Grazhdanov<sup>1</sup>, O.I.Kozhanova<sup>2</sup>, A.V.Toporkov<sup>1</sup>, T.Z.Ayazbaev<sup>3</sup>, N.I.Matveeva<sup>2</sup>, I.G.Karnaukhov<sup>1</sup>,  
N.V.Popov<sup>1</sup>, A.S.Razdorsky<sup>1</sup>, G.N.Arkipova<sup>2</sup>

# **Comparative Analysis of Particularly Dangerous Infections Manifestations in the Territory of the Saratov and West-Kazakhstan Regions with a View to Advanced Epidemiological Risk Assessment**

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Saratov Region, Saratov, Russian Federation; <sup>3</sup>Uralsk Plague Control Station of the Committee for Sanitary and Epidemiological Surveillance, Ministry of Health in the Republic of Kazakhstan, Uralsk, Republic of Kazakhstan

On the model of the Saratov and West-Kazakhstan regions carried out is the analysis of the current epidemiological and epizootological situations in the cross-border territories of the two states: the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan. Depicted is not only the common area of natural-focal territories of old-established infections, such as tularemia, but an intense outspread and formation of natural foci of the emerging infectious diseases too: Crimean hemorrhagic and West Nile fevers. This phenomenon assumes a great deal of importance due to dissemination and circulation of previously unknown to these areas infections concurrently in the two neighboring regions. Specified uniformity of epidemiological public risks in the bordering regions testifies to the need for development and implementation of the integrated system for prevention and response to the emergency situations in the sphere of sanitary-epidemiological welfare of the population in the territory of both of them.

*Key words:* plague, tularemia, cholera, brucellosis, anthrax, rabies, hemorrhagic fevers, natural focus, epidemiological risks, prophylaxis.

В рамках развивающихся двусторонних отношений Российской Федерации и Республики Казахстан в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения успешно функционирует приграничное сотрудничество Саратовской и Западно-Казахстанской областей (ЗКО). Имея общую границу протяженностью 568,3 км и занимая смежную территорию, области имеют много сходных и отличительных природно-климатических характеристик. Саратовская область занимает площадь 101240 км<sup>2</sup> и располагается в лесостепной, степной и полупустынной природных

зонах, а ЗКО находится южнее – в степной, полупустынной и пустынной зонах и занимает 151339 км<sup>2</sup>. С целью дальнейшего развития регионального партнерства санитарно-эпидемиологических служб двух областей в сфере эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории необходим систематический обмен информацией и обсуждение современных проявлений инфекционной заболеваемости. Рассмотрим эпидемиологическую и эпизоотологическую ситуацию по опасным инфекциям, представляющим реальную (потенциальную) угрозу санитарно-эпидемиологическому благополучию населения,



эпидемические проявления которых приравнены к чрезвычайной ситуации. Это важно для определения совместных действий по сохранению общего эпидемиологического благополучия.

**Чума.** В Саратовской области природные очаги чумы не выявлены. Но на границе с южной оконечностью Саратовского Заволжья располагается северная окраина Волго-Уральского степного очага чумы. На соседней территории Казахстана в непосредственной близости от Александрово-Гайского и Новоузенского районов в начале XX в. имели место эпизоотии чумы среди малых сусликов, которые неоднократно вызвали эпидемические вспышки чумы среди людей. Последний раз чума проявила себя здесь в виде эпизоотий в 1931 г. С того времени и до сегодняшнего дня (80 лет) эпизоотии чумы на этой территории не регистрируются несмотря на систематическое обследование.

В ЗКО природная очаговость чумы установлена в 1913 г. Здесь расположены три природных очага чумы: Волго-Уральский песчаный, Волго-Уральский степной и Зауральский (Урало-Уильский) степной, которые занимают 75 % общей площади области. Все три природных очага относятся к эпидемически высокоактивным. Это положение ярко иллюстрируют сведения из недавней истории: только в одной Западно-Казахстанской области зарегистрирована почти четвертая часть всех заболевших и умерших от чумы на территории бывшего СССР за вековой период. Критически высокая эпидемичность территории обусловлена частыми и острыми эпизоотиями чумы среди грызунов, высокой вирулентностью циркулирующих штаммов возбудителя чумы и особенностями быта и хозяйственной деятельности местного населения. В последующие десятилетия, благодаря активно проводимым профилактическим мероприятиям и коренному улучшению медицинского обеспечения, эпидемические вспышки чумы уже не регистрируются. В то же время эпизоотии чумы среди грызунов выявляются почти ежегодно. Так, за 100 лет наблюдения (1913–2012 гг.) эпизоотии чумы на территории ЗКО обнаруживались 78 лет. В силу чего постоянно сохраняются реальные эпидемиологические риски заражения человека, что выражается в спорадической заболеваемости. Последний случай заболевания чумой в Волго-Уральских песках отмечен в 1997 г. Ежегодно эпизоотологическому обследованию на чуму подвергается вся энзоотичная территория. В настоящее время в природных очагах чумы Западного Казахстана наступил межэпизоотический период. Средняя длительность межэпизоотического периода на этой территории составляет 3–4 года, максимум – 9 лет. Последние эпизоотии чумы здесь выявлены в 2007 г. В предшествующие годы (1971–2007 гг.) в пределах Жангалинского района, расположенного на севере Волго-Уральских песков, эпизоотии чумы регистрировались 37 лет подряд. В связи с благоприятными погодными условиями идет интенсивное восстановление численности носите-

лей и переносчиков инфекции, что может привести к новой эпизоотической активизации очага. Учитывая эти обстоятельства, ситуацию в природных очагах чумы следует расценивать как неустойчивую. При возобновлении эпизоотий чумы возможны заболевания людей и занос опасной инфекции на соседние территории.

Отсутствие в последние годы заболеваний людей чумой не должно дезориентировать службы здравоохранения. Чума остается актуальной инфекцией, способной вызвать чрезвычайную ситуацию санитарно-эпидемиологического характера. Необходимо продолжать совместную работу по повышению эффективности эпидемиологического надзора, принимать адекватные меры для своевременно выявления больных чумой в природных очагах.

**Туляремия.** В Саратовской области природная очаговость туляремии установлена в 1931 г. Здесь выявлено несколько типов природных очагов: степной, пойменно-болотный, лесной. Доминирующее положение занимает степной тип. К настоящему времени эпизоотии туляремии зарегистрированы в 24 из 38 сельских районов и в зеленой зоне Саратова. В прошлом имели место частые и крупные эпидемические вспышки туляремии. Так, в период с 1931 по 1993 год всего по области зарегистрировано 50973 больных туляремией [16]. По условиям заражения людей отмечены три основных эпидемиологических типа: трансмиссивный, промысловый и сельскохозяйственный. После официального запрещения охоты на водяную полевку промысловый тип заражения перестал иметь преобладающее значение и число вспышек пошло на убыль. Главную роль в прекращении эпидемических вспышек туляремии сыграла массовая вакцинация населения, после проведения которой заболеваемость уже не превышала спорадический уровень. Природные очаги туляремии до сегодняшнего дня остаются эпизоотически активными. Последний случай заболевания туляремией среди жителей Саратовской области зарегистрирован в 2000 г. В 2007 г. имело место заражение туляремией жителя Москвы на территории Новоузенского района.

В ЗКО природная очаговость туляремии установлена в 1928 г. Здесь выделены природные очаги двух типов: степной и пойменно-болотный. Основные носители инфекции – водяная полевка и мелкие мышевидные грызуны, основные переносчики – иксодовые клещи. До 1960 г. регистрировались крупные эпидемические вспышки, которые сменялись единичными заболеваниями. За период с 1928 по 1960 год всего зарегистрировано 854 больных. Эпидемическая активность резко снизилась после начала массовой вакцинации населения против туляремии. За последние полвека в области выявлено всего три случая заболевания туляремией (1965, 2002, 2007 гг.). За период наблюдения эпизоотии туляремии обнаружены на территории всех 12 административных районов. В настоящее время эпизоотии туляремии регистрируются ежегодно. Эпизоотическая ситуация крайне

обострилась в 2011–2012 гг., когда возбудитель туляремии, кроме грызунов и клещей, был выделен из воды небольшой реки и, впервые в Казахстане, от птицы – каменки-плясуньи. Появление новых эпидемиологических рисков заражения людей потребовало дополнительных мер профилактики. Еще одной особенностью современной туляремии является то, что исконные носители чумы – малые суслики и песчанки – стали принимать все более активное участие в эпизоотиях этой инфекции. Это привело к активизации и распространению туляремии на энзоотичные по чуме территории и формированию новых сочетанных природных очагов чумы и туляремии. На пограничных с Россией территориях наиболее высокая эпизоотическая активность отмечена в долинах рек Большого и Малого Узень в пределах Казталовского района. Этот участок определен как территория с высоким уровнем риска заражения туляремией [6].

Таким образом, территории Саратовской и Западно-Казахстанской областей имеют близкие по типам природные очаги туляремии, эпизоотии в которых регистрируются почти ежегодно. В поймах рек Большой и Малый Узень сформировалась общая трансграничная природно-очаговая территория. Активизация проявлений туляремии в Саратовской области и ЗКО также происходит синхронно. Так, после длительного перерыва в 2007 г. почти одновременно в обеих областях произошло по одному случаю заражения людей туляремией. Принимая во внимание, что на сегодняшний день имеется испытанная временем высокоэффективная вакцина, эпидемиологические риски инфицирования туляремией людей на территории эпизоотий могут быть сведены к нулю.

**Холера.** В Саратовской области все эпидемии холеры имели заносной характер. Заносы холеры происходили чаще всего из городов Нижнего Поволжья (Астрахань, Волгоград). Если рассматривать период после 1923 г., то заболевания холерой в Саратовской области регистрировались в 1942 г. и в 1970–1976 гг. [8]. Первые больные холерой в 1942 г. прибыли из Сталинграда, где имела место эпидемическая вспышка холеры. Всего в Саратовской области в 1942 г. выявлено 210 больных холерой (в Саратове – 202). В период седьмой пандемии, когда эпидемические вспышки холеры охватили европейскую часть юго-востока России, заболевания холерой в Саратовской области были связаны с заносом инфекции из Астрахани (1970–1976 гг.). Всего диагностирован 131 больной холерой в основном в расположенных по берегам Волги городах: Саратове, Вольске, Балаково. Своевременно проведенные противоэпидемические мероприятия позволяли каждый раз быстро купировать инфекцию. В настоящее время в Саратовской области осуществляется систематический мониторинг холеры. В 2011 г. из объектов окружающей среды культуры холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп не выделены [7]. Токсигенный холерный вибрион из воды открытых водоемов не

выделялся с 2001 г. Не выделен холерный вибрион и из клинического материала больных кишечной инфекцией. В результате лабораторных исследований воды открытых водоемов в 2011 г. в 12,8 % проб выделены атоксигенные холерные вибрионы не O1 серогруппы.

В ЗКО известны только заносные случаи холеры. После 1923 г. заболевания холерой в области имели место во время войны – в сентябре 1942 г. Больные холерой обнаружены среди пассажиров двух пароходов, которые прибыли по реке Урал из Астрахани с эвакуируемыми людьми. Пароходы были остановлены в поселке Калмыково, здесь организовали госпиталь. По официальным данным, в Калмыково зарегистрировано 19 больных холерой. Установлено, что первые заболевания связаны с пребыванием пассажиров в Астрахани, где была вспышка холеры. Уже после Астраханской эпидемии холеры в 1970 г. в Уральске в восьми случаях выявляли вибрионосителей холеры среди здоровых работников речного порта, совершающих рейсы по реке Урал от Уральска до Гурьева (1970, 1972, 1974 гг.). Все последующие годы в области продолжается постоянный мониторинг проявлений холеры. В сентябре 2005 г. в Уральске зарегистрировано два случая выделения холерных вибрионов O1 биовара Эльтор серовара Инаба от двух женщин, прибывших из Южно-Казахстанской области. Эти женщины (мать и дочь) находились на отдыхе в санатории, где мать заболела, у нее был частый жидкий стул. По прибытии в Уральск больная госпитализирована в инфекционный стационар. Дочь оставалась здоровой, каких-либо клинических проявлений кишечной инфекции не наблюдалось. Оба штамма холерного вибриона, выделенных от больной и контактной, были гемолизотрицательные и обладали холерогенностью. Холерогенность (токсигенность) культур изучали на кроликах-сосунках и в ПЦР. По совокупности данных эти два случая выделения токсигенных штаммов холерных вибрионов определены как завозные. В 2010 г. от семи больных острыми кишечными инфекциями, двух пациентов психоневрологического диспансера и двух контактных по семейному очагу выделены культуры холерного вибриона не O1 серогруппы, по результатам молекулярно-генетического исследования – нетоксигенные. В 2011 г. от одного больного ОКИ и двух пациентов психоневрологического диспансера выделено три штамма холерного вибриона не O1 серогруппы, нетоксигенные. Летом этого же года из воды пруда в Казталовском районе выделено четыре штамма холерных вибрионов O1 серогруппы биовара Эльтор серовара Инаба, все нетоксигенные. В ПЦР выявлена ДНК холерного вибриона и антиген O1. Редкие случаи однократного выделения таких холерных вибрионов из воды небольшого искусственного водоема, расположенного в «глухой» степи, пока не поддаются удовлетворительному объяснению. Обсемененность проб воды открытых

водоемов холерными вибрионами не O1 серогруппы в ЗКО составляет в среднем 50 %.

Территории Саратовской и Западно-Казахстанской областей равнозначны по проявлениям холеры. Здесь возможны только заносные случаи заболеваний холерой, так как нет природных и социальных условий для укоренения этой инфекции. Учитывая неблагоприятный мировой прогноз, необходимо выполнение всех мероприятий эпиднадзора по холере, а взаимодействие двух областей даст более эффективные результаты, тем более что опыт сотрудничества в этой области был приобретен еще в период эпидемии холеры в СССР в 1970 г., когда для оказания помощи в проведении массовых диагностических исследований в Саратове была привлечена специализированная противоэпидемическая бригада (СПЭБ) Уральской противочумной станции.

**Бруцеллез.** В Саратовской области в период 2000–2009 гг. выявлено 77 больных бруцеллезом [9]. В последние годы случаи бруцеллеза у людей не регистрируются. Несмотря на достигнутые успехи в профилактике этого заболевания эпизоотологическая ситуация по бруцеллезу среди сельскохозяйственных животных остается неблагополучной. Ежегодно выявляют эпизоотические очаги среди крупного рогатого скота в хозяйствах частного и общественного секторов.

ЗКО стабильно неблагополучна по бруцеллезу людей и сельскохозяйственных животных. В период с 2000 по 2009 год диагностировано 373 больных бруцеллезом. В 2010 г. выявлен 61 больной первичным бруцеллезом. Диагноз подтвержден выделением возбудителя в 70,3 % случаев. Все выделенные культуры изучены и идентифицированы как *Brucella melitensis*. В 2011 г. в области установлено 55 заболеваний людей бруцеллезом (Акжайикский район – 14, Бокейординский – 1, Бурлинский – 3, Жанибекский – 3, Зеленовский – 2, Казталовский – 4, Каратобинский – 2, Сырымский – 14, Теректинский – 1, Чингирлауский – 9, Уральск – 2), у 90 % больных выделен возбудитель. В 2011 г., впервые за последние 20 лет, от одного больного изолирован штамм *Brucella abortus*, 1 биотип. Источником инфекции во всех случаях послужили больные домашние животные из индивидуальных хозяйств. В 2011 г. проводилось оздоровление по бруцеллезу среди крупного рогатого скота четырех населенных пунктов.

В связи с общим увеличением численности домашнего скота, наличием неблагополучных по бруцеллезу хозяйств остаются высокими эпидемиологические риски заболевания людей. Для предупреждения заражения людей следует совместно с ветеринарной службой направить основные усилия на своевременное выявление бруцеллезных очагов и проведение мероприятий по их локализации и ликвидации. В связи с образованием единого таможенного пространства между Россией и Казахстаном с обеих сторон требуется более жесткий контроль над трансграничным перемещением домашнего скота.

Необходимо определить порядок такого контроля в рамках Таможенного союза.

**Сибирская язва.** Саратовская область энзоотична по сибирской язве. По официальным данным, на территории всех районов области существует более 3000 стационарно неблагополучных пунктов [1]. Наличие множества почвенных очагов сибирской язвы в местах выпаса скота создает реальную угрозу заражения травоядных животных, что при определенных условиях может привести к заболеванию людей. В 2011 г. случаев заболевания людей и животных сибирской язвой в области не зарегистрировано.

ЗКО также энзоотична по сибирской язве. Здесь имеется 157 стационарно неблагополучных пунктов, которые располагаются во всех районах области [14]. Заболевания людей возникают периодически на фоне эпизоотий среди сельскохозяйственных животных и всегда связаны с нарушением ветеринарно-санитарных правил. В августе 2011 г. в поселке Таловка Жанибекского района два человека заболели сибирской язвой. Оба участвовали в вынужденном забое теленка. Обоим поставлен диагноз – кожная форма сибирской язвы. Диагноз подтвержден обнаружением ДНК возбудителя сибирской язвы у одного больного. От забитого животного и из пробы почвы с места забоя изолирован возбудитель сибирской язвы. Результаты лабораторных исследований позволили установить источник заражения людей, пути передачи инфекции и, в конечном итоге, своевременно провести мероприятия по локализации и ликвидации очага сибирской язвы. На сегодняшний день на территории ЗКО имеются четыре активных стационарно неблагополучных пункта с высоким риском инфицирования возбудителем сибирской язвы.

В Российской Федерации и Республике Казахстан составлены и опубликованы Кадастры стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. Эти документы служат основой для планирования профилактических мероприятий, центральное место в которых принадлежит вакцинации сельскохозяйственных животных. Необходимо постоянно обновлять существующую базу данных за счет еще неучтенных неблагополучных пунктов. Анализ материалов показал, что главной причиной продолжающихся эпизоотий и эпидемических проявлений сибирской язвы в каждом отдельном случае является нарушение ветеринарно-санитарных правил. Именно в этом кроются современные эпидемиологические риски заражения сибирской язвой местного населения. Только предупреждение нарушений ветеринарно-санитарных правил может сохранять эпидемиологическое благополучие на территориях, потенциально опасных по этой инфекции.

**Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС).** В Саратовской области природная очаговость ГЛПС установлена в 1964 г. [10]. На сегодня эпизоотии ГЛПС выявлены на территории 30 районов и в зеленой зоне Саратова. По официальным данным, за весь период наблюдения (1964–2011 гг.)



в области зарегистрировано 6283 больных этой лихорадкой, из них 31 умер [1]. Уровень заболеваемости людей ГЛПС в Саратовской области выше, чем в среднем по России. Подъемы заболеваемости отмечаются каждые 5–6 лет и связаны с увеличением численности рыжей полевки – основного носителя вируса. Наиболее высокий уровень заболеваемости зарегистрирован в 1986 г., когда было выявлено 2349 больных ГЛПС. В последние годы эпидемиологическая ситуация по этой инфекции стабилизировалась. В 2011 г. в городах и районах области отмечено 37 случаев ГЛПС. Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил 1,44. Для области характерны лесной и бытовой типы заражения людей. Чаще всего больные поступали в осенне-зимние месяцы, преобладали тяжелые и средней тяжести клинические формы. Эпизоотологические прогнозы составляют по результатам ежегодно проводимого обследования территории природных очагов. На наиболее опасных участках проводится поселковая и барьерная дератизация.

В ЗКО впервые больные ГЛПС были диагностированы в 2000 г., а в 2001 г. установлена природная очаговость этой инфекции [2]. Дальнейшие исследования позволили очертить ареал распространения и определить круг носителей хантавируса. Эпидемические вспышки ГЛПС приурочены к долине реки Урал, где обитает рыжая полевка. В годы высокой численности рыжей полевки наблюдаются заболевания людей. В период с 2000 по 2010 год заболевания отмечались ежегодно, за исключением 2002 г. Всего зарегистрировано и лабораторно подтверждено 194 случая ГЛПС, один закончился летально. Заболеваемость по годам была неравномерной, наибольшая отмечена в 2005 г. Чаще всего регистрировались тяжелые и средней степени тяжести клинические формы заболевания. Установлена этиологическая роль хантавируса серотипа Пуумала, который обнаружен у грызунов и людей. Заболеваемость ГЛПС носит ярко выраженный сезонный характер. Самое большое число больных выявляли в ноябре. Наиболее часто реализуется лесной тип заражения людей. В 2011 г. было выявлено шесть больных ГЛПС. Все они отмечали пребывание на территории эпизоотий. Профилактические мероприятия направлены на ограничение возможных контактов людей с грызунами. По эпидпоказаниям проводится поселковая дератизация.

Постоянно сохраняющиеся эпидемиологические риски в природных очагах приводят к ежегодной заболеваемости ГЛПС, что представляет определенную проблему для здравоохранения обеих областей. Дорогостоящие работы по снижению численности грызунов, являющихся источником инфекции, дают лишь кратковременный эффект. Кардинальным образом ситуацию по борьбе с ГЛПС может изменить лишь вакцинопрофилактика. Экспериментальные серии отечественной вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом уже имеют-

ся, но лабораторные и полевые испытания до сих пор не завершены [15].

**Бешенство.** Саратовская область является территорией с высокой степенью риска заражения населения бешенством [9]. Природные очаги бешенства имеются во всех районах области, случаи бешенства у животных регистрируются ежегодно. Превалирует бешенство у лис. В последние годы отмечается активное вовлечение в эпизоотии бешенства домашних животных (собак и кошек). Ситуация усугубляется ростом числа безнадзорных собак и кошек, отсутствием регламентирующих документов по правилам содержания домашних животных [17]. За счет одичавших собак происходит перенос инфекции из природных в антропоургические очаги. Постоянно увеличивается число пострадавших от укусов бродячими собаками. Остается высокой обращаемость населения за медицинской помощью по поводу повреждений, нанесенных животными, с назначением антирабической вакцинации. В 2011 г. заболевания бешенством среди людей в Саратовской области не зарегистрированы.

Вся территория ЗКО энзоотична по бешенству. Заболевания бешенством систематически регистрируются среди домашних и диких животных: коров, овец, лошадей, собак, кошек, волков и лисиц. На этом фоне спорадически возникают заболевания людей. В последние годы участились случаи нападения на людей волков, что связано с резким увеличением численности этих хищников на территории области. В 2011 г. один случай заболевания человека бешенством с летальным исходом имел место в пос. Жанибек. Источником инфекции послужила собственная собака. Этот больной по поводу укуса собаки за медицинской помощью не обращался. Для профилактики бешенства в области постоянно проводится отлов бродячих собак, а также внедряется вакцинация собак и кошек.

В целях снижения эпидемиологических рисков заражения бешенством в Саратовской и Западно-Казахстанской областях целесообразно проводить пероральную вакцинацию не только домашних, но и диких плотоядных животных в природных условиях. Необходимо осуществлять регулирование численности диких животных для уменьшения активности природных очагов, а также повсеместно сокращать количество бродячих собак в населенных пунктах. Чрезвычайно важно введение на законодательной основе правил содержания домашних животных, регламентирующих и меры ответственности владельцев за их нарушение.

**Лихорадка Западного Нила (ЛЗН).** В Саратовской области первый больной лихорадкой Западного Нила выявлен в 2010 г., в эпиданамнезе этого больного отмечалось посещение в летний период островов на р. Волга, где он был покусан комарами [11]. В летне-осенний период 2012 г. только до середины сентября лихорадка Западного Нила диагностирована у четырех больных. На территории



области установлена циркуляция вируса Западного Нила среди мелких млекопитающих, птиц и клещей [13, 19, 21]. Специальными исследованиями обнаружена иммунная прослойка к этой инфекции у местного населения [18, 20]. Эти эпидемиологические и эпизоотологические факторы свидетельствуют о формирования здесь природного очага ЛЗН.

В ЗКО впервые наличие специфических антител к лихорадке Западного Нила у людей установлено в 2010 г. [5]. В 2011 г. методом ПЦР обнаружена РНК вируса Западного Нила в восьми пробах четырех видов комаров, выловленных на территории Жанибекского и Бокейординского районов. Повторные исследования подтвердили наличие специфических антител к возбудителю ЛЗН у части населения Жанибекского района.

Мы являемся свидетелями уникального естественного явления: на смежных территориях Саратовской и Западно-Казахстанской областей вдоль пролетных трасс мигрирующих птиц формируется новый природный очаг лихорадки Западного Нила. Учитывая способность этой опасной инфекции к быстрому распространению, необходимо продолжить совместную обследовательскую и профилактическую работу в целях обозначения границы очага, степени его устойчивости и определения основных эпидемиологических рисков заражения людей.

**Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ).** В Саратовской области больные Крымской геморрагической лихорадкой не зарегистрированы. Но в последние годы получены сведения, указывающие на циркуляцию вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) среди грызунов и клещей [19, 21]. У части обследованных людей и сельскохозяйственных животных выявлены специфические антитела к вирусу ККГЛ [20]. Эти данные свидетельствуют о наличии на территории области потенциальных возможностей становления природной очаговости КГЛ. Необходимо продолжить исследования.

В ЗКО циркуляция вируса ККГЛ среди крупного рогатого скота впервые обнаружена в 2007 г. [4]. В дальнейшем на территории Жанибекского и Бокейординского районов установлена высокая численность основных переносчиков этой инфекции – клещей *Hyalomma marginatum*, зараженных вирусом ККГЛ. Антиген этого вируса выявлен у малых сусликов и обитающих здесь птиц. У местного населения обнаружены специфические антитела к вирусу ККГЛ. На сегодняшний день в ЗКО имеются все экологические условия для укоренения инфекции в местных биоценозах. Заболевания КГЛ в области не выявлены.

В современный период в Саратовской и Западно-Казахстанской областях, наряду с ЛЗН, идет процесс активной циркуляции и распространения на новые территории вируса ККГЛ, что представляет потенциальную эпидемическую опасность для людей (рисунок). Эти обстоятельства требуют опережающих мер контроля и противодействия.

**Клещевой боррелиоз (КБ).** В Саратовской области в 2011 г. впервые зарегистрированы три случая заболевания клещевым боррелиозом. Эпидрасследование показало, что один человек заразился КБ в местных условиях, два других случая – завозные. В первом полугодии 2012 г. выявлены еще два больных клещевым боррелиозом. На территории области установлена природная очаговость КБ, обнаружены специфические переносчики возбудителя болезни – клещи рода *Ixodes*, численность которых ежегодно возрастает [12]. Продолжается работа по оценке потенциала новой для территории природно-очаговой инфекции.

В ЗКО в 2011 г. также впервые зарегистрирован случай клещевого боррелиоза. Согласно эпиданамнезу больная накануне заболевания была покусана клещами при посещении леса в Пензенской области России, где и произошло заражение. Диагноз клеще-



Единое эпизоотологическое пространство приграничных территорий Саратовской и Западно-Казахстанской областей, где формируются природные очаги ЛЗН и КГЛ

вого боррелиоза подтвержден лабораторными исследованиями. После лечения пациентка выписана в удовлетворительном состоянии. Это первый опыт диагностики и ведения таких больных в Казахстане. В настоящее время проводится эпизоотологическое обследование территории области на КБ, организован лабораторный мониторинг этой инфекции.

**Пастереллез.** В ЗКО имело место природное явление, которое можно прировнять к стихийному бедствию. Дважды, в мае 2010 г. и 2011 г., на территории Жанибекского района зарегистрирован массовый падеж сайги. Только в 2010 г. в течение двух недель погибло более 12 тыс. этих антилоп. Скопившиеся для окота животные были сконцентрированы на небольшой территории. Гибли в основном недавно родившие самки и их детеныши. Безусловно, эту часть стада животных можно отнести к «группе риска». От павших сайгаков был выделен возбудитель пастереллеза (*Pasteurella multocida*). Окончательно причина массовой гибели сайгаков на западе Казахстана до сих пор не установлена, но основной версией падежа диких животных остается эпизоотия пастереллеза. Территория области энзоотична по этой инфекции. В разные годы от мелких млекопитающих и сельскохозяйственных животных выделяли возбудитель пастереллеза. Был случай заболевания пастереллезом человека с летальным исходом. Следовательно, пастереллезная инфекция устойчиво сохраняется среди диких и домашних животных и при определенных условиях может вызвать эпизоотию среди сайгаков.

**Другие новые в краевой патологии природно-очаговые инфекции.** В Саратовской области в последние годы получены достоверные сведения о циркуляции вируса клещевого энцефалита среди мелких млекопитающих, клещей, птиц и людей [20, 21]. В ЗКО впервые в 2011 г. методом ПЦР выявлена зараженность вирусом клещевого энцефалита иксодовых клещей, получены данные о циркуляции этой инфекции среди населения. В 2004 г. впервые в ЗКО обнаружена спонтанная зараженность клещей *Rhipicephalus pumilio* возбудителем астраханской пятнистой лихорадки [3]. Установлена высокая численность этих клещей. В настоящее время продолжают исследования с целью обозначить границы ареала возбудителя и возможности укоренения природного очага.

Таким образом, Саратовская и Западно-Казахстанская области имеют по ряду опасных инфекций единое эпизоотологическое и эпидемиологическое пространство, что подтверждается одновременным их проявлением (туляремия, заносы холеры). В современный период общая ситуация осложняется формированием на этих территориях новых сочетанных природных очагов опасных инфекционных заболеваний. Тесные экономические и культурные связи двух областей обуславливают проведение адекватных мероприятий по санитарной охране территорий. В 2011 г. подписано Соглашение о сотрудничестве для реализации мероприятий по са-

нитарной охране территорий между Управлением Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Саратовской области и Департаментом Комитета государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Республики Казахстан по Западно-Казахстанской области. В условиях Таможенного союза необходимы унифицированные и более совершенные организационные формы сотрудничества в целях снижения эпидемиологических рисков, чтобы не только осуществлять эффективный надзор, но и взаимно гарантировать санитарно-эпидемиологическое благополучие на приграничной территории.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Саратовской области в 2011 году». Саратов; 2012. 387 с.
2. Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К., Рахманкулов Р.Р., Пак М.В., Белоножкина Л.Б., Андрищенко В.В., Токтаров М.И., Кдырсих Б.Г. Некоторые аспекты эпизоотологии Урало-Илекского очага геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2004; 2(10):96–104.
3. Гражданов А.К., Бидашко Ф.Г., Танитовский В.А., Смирнова С.Е., Карань Л.С., Платонов А.Е., Коротина Н.А. Астраханская риккетсиозная пятнистая лихорадка – новый потенциальный зооноз на западе Казахстана. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2005; 1–2 (11–12):17–20.
4. Гражданов А.К., Танитовский В.А., Белоножкина Л.Б., Бидашко Ф.Г., Смирнова С.Е., Захаров А.В., Андрищенко А.В. О новой природно-очаговой территории Крымской-Конго геморрагической лихорадки на западе Казахстана. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2009; 1–2(19–20): 33–7.
5. Гражданов А.К., Аязбаев Т.З., Белоножкина Л.Б., Захаров А.В., Бидашко Ф.Г., Андрищенко А.В. Первые сведения о проявлении в Казахстане лихорадки Западного Нила. *Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане*. 2011; 1–2(23–24):58–61.
6. Избанова У.А., Куница Т.Н., Гражданов А.К., Лухнова Л.Ю., Мека-Меченко Т.В., Пак М.В., Бидашко Ф.Г., Пазылов Е.К. Очаги туляремии как источники угрозы заражения людей на территории Западно-Казахстанской области Республики Казахстан. *Дезинфекция. Антисептика*. 2012; 2(10):28–33.
7. Кожанова О.И., Фролова Л.Н. Проведение эпидемиологического надзора за холерой на территории Саратовской области. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):157.
8. Кологоров А.И., Кедрова О.В., Васенин А.С., Кокушкин А.М., Малыгина З.В. Закономерности заноса и характера распространения эпидемических проявлений холеры в Саратовской области. В кн.: Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье. Волгоград; 2000. С. 116–23.
9. Кологоров А.И., Дмитриева Л.Н., Шиянова А.Е., Тарасов М.А., Поршаков А.М., Попов Н.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым и зоонозным инфекциям в Приволжском Федеральном округе в 2000–2009 гг. и прогноз на 2010 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 2(104):5–10.
10. Коротков В.Б., Наумов А.В., Самойлова Л.В. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в Саратовской области (эпидемиологические аспекты). Саратов; 1996. 128 с.
11. Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Рябова А.В., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Федорова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кутырев В.В. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):13–7.
12. Кресова У.А., Казакова Л.В., Гаранина С.Б., Кожанова О.И. Актуальные клещевые инфекции Саратовской области. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):160.
13. Кутырев И.В., Билько Е.А., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Чекашов В.Н., Матросов А.Н. Оценка роли фоновых видов мышевидных грызунов в сохранении возбудителей арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):19–22.
14. Лухнова Л.Ю., Айкимбаев А.М., Пазылов Е.К., Гражданов А.К., Соломадин М.В., Иманкул С.И., Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е. Эпидемиологическая и эпизоотологическая



ситуация по сибирской язве на территории Западно-Казахстанской области. *Дезинфекция. Антисептика*. 2012; 1(9):31–5.

15. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Набатников П.А., Коротина Н.А., Шевелев А.Б., Соцкова С.Е., Малкин А.Е., Киктенко А.В., Воробьева М.С., Михайлов М.И. Разработка вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):202.

16. Федорова З.П., Коротков В.Б., Агафонова Т.К., Барабанова А.В. О заболеваемости туляремией в Саратовской области и современном состоянии природных очагов. *Пробл. особо опасных инф.* 1993; 1–2:163–6.

17. Федорова З.П., Кожанова О.И., Красильникова Н.Н. Актуальные вопросы снижения уровня обращаемости населения за медицинской помощью по поводу укусов животными. *Инфекция и иммунитет*. 2012; 2(1–2):206.

18. Щербакова С.А., Головинская О.Н., Ключева Е.В., Гаранина С.Б., Савицкая Л.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Результаты исследования сывороток крови населения Саратова на антитела к арбовирусам. *Вопр. вирусол.* 2002; 3:32–4.

19. Щербакова С.А., Билько Е.А., Ключева Е.В., Данилов А.Н., Плотнова Е.А., Тарасов М.А., Чекашов В.Н., Удовиков А.И., Князева Т.В., Шилов М.М., Самойлова Л.В., Храмов В.Н., Казакова Л.В., Куклев Е.В., Куличенко А.Н. Экология распространения арбовирусов на территории Саратовской области. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 5:27–30.

20. Щербакова С.А., Билько Е.А., Найденкова Е.В., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Пионтковский С.А., Уткин Д.В., Чекашов В.Н., Слудский А.А., Попов Н.В., Куклев Е.В., Фирстов Е.Н., Потемина Л.П., Логунова Т.Е., Водина Е.А., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Экологические и эпидемиологические аспекты циркуляции арбовирусов на территории Саратовской области. В кн.: *Арбовирусы и арбовирусные инфекции*. М.; 2007. С. 150–2.

21. Щербакова С.А., Билько Е.А., Найденкова Е.В., Кутырев И.В., Красовская Т.Ю., Слудский А.А., Князева Т.В., Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Шарова И.Н., Самойлова Л.В. Выявление антигенов арбовирусов в комарах и клещах, обитающих на территории Саратовской области. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2009; 2:38–41.

## References

1. State report on the "Sanitary-epidemiological situation in the Saratov region in 2011". Saratov; 2012. 387 p.
2. Bidashko F.G., Grazhdanov A.K., Rakhmankulov R.R., Pak M.V., Belonozhkina L.B., Andryushchenko V.V., Toktarov M.I., Kdysikh B.G. [Certain aspects of epizootiology as concerns Ural-Ilekk focus of hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2004; 2(10):96–104.
3. Grazhdanov A.K., Bidashko F.G., Tanitovsky V.A., Smirnova S.E., Karan' L.S., Platonov A.E., Korotina N.A. [Astrakhan rickettsial spotted fever – novel potential zoonotic infection in the west of the Republic of Kazakhstan]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2005; 1–2(11–12):17–20.
4. Grazhdanov A.K., Tanitovsky V.A., Belonozhkina L.B., Bidashko F.G., Smirnova S.E., Zakharov A.V., Andryushchenko A.V. [Regarding a new natural-focal territory of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the west of the Republic of Kazakhstan]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2009; 1–2(19–20):33–7.
5. Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Belonozhkina L.B., Zakharov A.V., Bidashko F.G., Andryushchenko A.V. [First knowledge of onset of the West Nile fever in Kazakhstan]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2011; 1–2(23–24):58–61.
6. Izbanova U.A., Kunitsa T.N., Grazhdanov A.K., Lukhnova L.Yu., Meka-Mechenko T.V., Pak M.V., Bidashko F.G., Pazylov E.K. [Tularemia foci as a source of threat of population infection in the territory of the West-Kazakhstan region of the Republic of Kazakhstan]. *Dezinfektsiya. Antiseptika*. 2012; 2(10):28–33.
7. Kozhanova O.I., Frolova L.N. [Epidemiological surveillance over cholera in the territory of the Saratov region]. *Infektsiya i Immunitet*. 2012; 2(1–2):157.
8. Kologorov A.I., Kedrova O.V., Vasenin A.S., Kokushkin A.M., Malykhina Z.V. [Regularities of import and distributional pattern of epidemiological cholera manifestations in the Saratov region]. In: [Natural-Focal Infections in the Lower Volga Region]. Volgograd; 2000. P. 116–23.
9. Kologorov A.I., Dmitrieva L.N., Shiyanova A.E., Tarasov M.A., Porshakov A.M., Popov N.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Epidemiologic Situation on Natural Focal and Zoonotic Infections in

Privolzhskiy Federal District in 2000–2009 and the Prognosis for 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; (104): 5–10.

10. Korotkov V.B., Naumov A.V., Samoylova L.V. [Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in the Territory of the Saratov Region (Epidemiological Aspects)]. Saratov; 1996. 128 p.

11. Krasovskaya T.Yu., Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Naydenova E.V., Bil'ko E.A., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Porshakov A.M., Shilov M.M., Ryabova A.V., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Fedorova Z.P., Kresova U.A., Talaeva E.A., Mironova N.I., Kutyrev V.V. [Studies of West Nile virus circulation in the territory of the Saratov region in 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (109): 13–7.

12. Kresova U.A., Kazakova L.V., Garanina S.B., Kozhanova O.I. [Present-day tick-borne infections in the territory of the Saratov region]. *Infektsiya i Immunitet*. 2012; 2(1–2):160.

13. Kutyrev I.V., Bil'ko E.A., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Chekashov V.N., Matrosov A.N. [Assessment of the role of mouse-like rodents background species in the preservation of Arboviral infections agents in the semi-desert zone of Saratov Zavolzhie]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; (97):19–22.

14. Lukhnova L.Yu., Aikimbaev A.M., Pazylov E.K., Grazhdanov A.K., Solomadin M.B., Imankul S.I., Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E. [Epidemiological and epizootological situation on anthrax in the territory of the West-Kazakhstan region]. *Dezinfektsiya. Antiseptika*. 2012; 1(9):31–5.

15. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Nabatnikov P.A., Korotina N.A., Shevelev A.B., Sotskova S.E., Malkin A.E., Kiktenko A.V., Vorob'eva M.S., Mikhaylov M.I. [Construction of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Infektsiya i Immunitet*. 2012; 2(1–2):202.

16. Fedorova Z.P., Korotkov V.B., Agafonova T.K., Barabanova A.V. [Concerning morbidity rate for tularemia infection in the territory of the Saratov region and current state of the natural foci]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1993; 1–2:163–6.

17. Fedorova Z.P., Kozhanova O.I., Krasil'nikova N.N. [Pressing issues of level decline as regards health encounters among the population on the occasion of animal bites]. *Infektsiya i Immunitet*. 2012; 2(1–2):206.

18. Shcherbakova S.A., Golovinskaya O.N., Klyueva E.V., Garanina S.B., Savitskaya L.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Results of blood sera testing obtained from the citizenry of the Saratov region for the presence of antibodies to Arboviruses]. *Vopr. Virusol.* 2002; 3:32–4.

19. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Klyueva E.V., Danilov A.N., Plotnikova E.A., Tarasov M.A., Chekashov V.N., Udobikov A.I., Knyazeva T.V., Shilov M.M., Samoylova L.V., Khramov V.N., Kazakova L.V., Kulev E.V., Kulichenko A.N. [Ecology of arbovirus distribution in the territory of the Saratov region]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 5:27–30.

20. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Naidenova E.V., Krasovskaya T.Yu., Sharova I.N., Piontkovsky S.A., Utkin D.V., Chekashov V.N., Sludsky A.A., Popov N.V., Kulev E.V., Firsov E.N., Potemina L.P., Logunova T.E., Vodina E.A., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Ecological and Epidemiological aspects of arbovirus circulation in the territory of the Saratov region]. In: [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.; 2007. P. 150–2.

21. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Naidenova E.V., Kutyrev I.V., Krasovskaya T.Yu., Sludsky A.A., Knyazeva T.V., Matrosov A.N., Chekashov V.N., Sharova I.N., Samoylova L.V. [Detection of arbovirus antigens in ticks and mosquitoes, habitant in the territory of the Saratov region]. *Med. Parazitarn. Bol.* 2009; 2:38–41.

## Authors:

Grazhdanov A.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Popov N.V., Razdorsky A.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Kozhanova O.I., Matveeva N.I., Arkhipova G.N. Rosпотребнадзор Administration in the Saratov Region. 7, Volskaya St., Saratov, 410028, Russian Federation. E-mail: sarprn@san.ru

Ayazbaev T.Z. Uralsk Plague Control Station. 36/1, Chapaeva St., Uralsk, 090001, Republic of Kazakhstan. E-mail: pchum@mail.ru

## Об авторах:

Гражданов А.К., Топорков А.В., Карнаухова И.Г., Попов Н.В., Раздорский А.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Кожанова О.И., Матвеева Н.И., Архипова Г.Н. Управление Роспотребнадзора по Саратовской области. Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. Вольская, 7. E-mail: sarprn@san.ru

Аязбаев Т.З. Уральская противочумная станция. 090001, Республика Казахстан, Западно-Казахстанская область, г. Уральск, ул. Чапаева, 36/1. E-mail: pchum@mail.ru

Поступила 08.04.13.



Г.Г.Онищенко, Е.Б.Ежлова, Ю.В.Демина

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ КАК ОДНО ИЗ НАПРАВЛЕНИЙ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

*Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва,  
Российская Федерация*

Внебольничные пневмонии (ВП) относятся к числу наиболее распространенных острых инфекционных болезней как в мире, так и в Российской Федерации и являются одной из основных причин заболеваемости и смертности среди населения. В большей степени от внебольничных пневмоний страдает взрослое население, смертность часто отмечают у лиц трудоспособного возраста. По расчетам в России заболеваемость ВП составляет 14–15 %, а реальная заболеваемость пневмониями существенно выше регистрируемой, абсолютное число случаев составляет около 1,5 млн в год. Основной объем заболеваемости приходится на бактериальные пневмонии. Однако немалая их часть вызывается и иными микроорганизмами, в т.ч. вирусами. Внебольничные пневмонии в настоящее время представляют большую эпидемиологическую и медицинскую значимость и разработка системы эпидемиологического надзора является необходимостью, которая позволит разработать методику мониторинговых исследований и профилактических мер.

*Ключевые слова:* внебольничные пневмонии, эпидемические очаги, биологическая безопасность, заболеваемость, эпидемиологический надзор.

G.G.Onishchenko, E.B.Ezhlova, Yu.V.Demina

## Epidemiological Surveillance over Community-Acquired Pneumonia as One of the Means for Biological Safety Provision

*Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation*

Community-acquired pneumonia (CAP) ranges among the most widely spread emerging infectious diseases both in the Russian Federation and around the world. It is one of the main factors contributing to morbidity and mortality among the population. Adult cohort suffers from community-acquired pneumonia to the highest degree. Lethal cases are often registered in the active working age. According to the statistics morbidity rate for CAP in Russia reaches 14–15 %, while actual value is significantly higher, than the one under record. Total number is approximately 1,5 million cases per year. Base number of infections is accounted for bacterial pneumonia. However considerable part of it is caused by other microorganisms, including viruses. Up-to-date community-acquired pneumonia is of a great epidemiological and clinical value, and development of epidemiological surveillance system is an urging issue, that might allow for elaboration of the methodology for carrying out proper monitoring and preventive measures.

*Key words:* community-acquired pneumonia, epidemic foci, biological safety, morbidity, epidemiological surveillance.

В последние годы совершенствование профилактических мер в отношении инфекций верхних и нижних дыхательных путей является одним из важнейших направлений деятельности федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

В 2009 г. в условиях объявленной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пандемии гриппа актуализировался вопрос о регистрации и наблюдении за внебольничными пневмониями (ВП). С целью объективной оценки ситуации в ноябре 2009 г. Роспотребнадзором была отдельно введена еженедельная регистрация ВП как объективного индикатора распространения и тяжести эпидемического процесса гриппа и ОРВИ.

Вопрос о введении действенного эпидемиологического надзора за внебольничными пневмониями назрел уже давно.

Во-первых, с учетом плохой этиологической расшифровки данной патологии [3, 4, 5] диагноз «внебольничная пневмония» скрывает как извест-

ные инфекционные заболевания (легионеллез, орнитоз (пситтакоз), лихорадка Ку и другие), так и новые инфекции, вызванные ранее не известными возбудителями (тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), высокопатогенный грипп (АН5N1, АН7N9), ближневосточный респираторный синдром (новая коронавирусная инфекция).

Во-вторых, ВП формируют эпидемические очаги как в организованных коллективах, так и среди населения. За последние 6 лет были официально зарегистрированы вспышки орнитоза (Оренбургская, Курганская области, 2008–2009 гг.), легионеллеза (Свердловская область, 2007 г.), внебольничной пневмонии неуточненной этиологии (Апатиты, 2008 г., Амурская область, 2009 г.), пневмонии гриппозной этиологии (Забайкальский край, Красноярский край, Челябинская область, 2009 г.), пневмонии коксиелезной природы (лихорадка Ку в Кировской области, 2011 г.), микоплазменной пневмонии (Москва, Московская и Нижегородская области, 2012 г.), пневмококковой пневмонии (Республика Хакасия, 2012 г., Амурская область, 2013 г.), сочетанных оча-

гов (микоплазма и пневмококк в Смоленской области, 2013 г., риновирусы, парагрипп, стрептококки и кандиды в доме-интернате для умственно отсталых детей в Вологодской области, 2013 г.).

Отдельную проблему представляют внебольничные пневмонии в закрытых воинских коллективах [1, 2], где уровни заболеваемости данной нозологией превышают показатели среди гражданского населения в несколько раз и приводят в целом к снижению боеспособности войск. Все это позволяет рассматривать внебольничную пневмонию как одну из актуальных проблем биологической безопасности и диктует необходимость разработки адекватных мероприятий как по стабилизации ситуации в стране, так и для определения тактики по отработке эпидемических очагов ВП.

До 2011 г. в статистических данных Российской Федерации пневмонии не разделялись на внебольничные и внутрибольничные, поэтому ретроспективный эпидемиологический анализ проводился по официальным цифрам, указанным в отчетных формах Министерства здравоохранения СССР и Российской Федерации.

На протяжении последних 25 лет заболеваемость пневмонией в Российской Федерации можно расценить как стабильно высокую – от 350,4 до 519,1 на 100 тыс. населения с незначительными ежегодными колебаниями без выраженной тенденции в многолетней динамике, что свидетельствует о постоянстве действующих на заболеваемость факторов эпидемического процесса. Вместе с тем в течение последних 16 лет необходимо констатировать рост заболеваемости среди детей и подростков в возрасте до 17 лет со средним приростом 3,6 % ежегодно. При этом в официальных цифрах до 2011 г. отсутствовало разделение на нозокомиальную пневмонию и внебольничную, которые принципиально различаются по эпидемиологии, включающей как спектр возбудителей, так и факторы эпидемического процесса.

Для мониторинга и разработки адекватных противоэпидемических мероприятий Роспотребнадзором с 2011 г. ВП введены в ежемесячные и ежегодные формы отраслевого и государственного статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (форма 1 и 2), утвержденные приказом Росстата от 31.12.2010 № 482 «Об утверждении статистического инструментария для организации Роспотребнадзором федерального статистического наблюдения за заболеваемостью населения за инфекционными и паразитарными болезнями и профилактическими прививками».

В результате анализа материалов, поступавших в Роспотребнадзор в течение 3 лет, можно констатировать, что в структуре больных ВП преобладает взрослое население, а дети до 17 лет составляют около 30,0 %. При этом чаще болеют городские жители, составившие около 80,0 % пострадавших.

В течение последних 3 лет наблюдается тенденция к росту заболеваемости ВП по России. В 2011 г.

заболеваемость ВП составляла 316,0 на 100 тыс. населения, в 2012 г. – 344,0, а за 9 мес. 2013 г. – 288,7 (412729), что на 33,2 % выше аналогичных показателей 2012 г. среди совокупного населения и практически в 1,5 раза (43,2 %) – среди детей до 17 лет.

Показатель летальности в 2012 г. среди всего населения составил 2,62 на 100 тыс. населения, среди детей – 0,31. Смертность от ВП в среднем составляет 0,7–0,8 %, достигнув в период пандемии 2009 г. 2,0 %.

За 9 мес. текущего года наиболее неблагоприятным по внебольничным пневмониям является Приволжский федеральный округ, уровни заболеваемости в котором составляют 403,5 на 100 тыс. населения. Далее следуют Уральский (361,0), Сибирский (346,4) и Дальневосточный (300,7) федеральные округа. Показатели заболеваемости ВП превышают аналогичные цифры по Российской Федерации в 42 субъектах страны. Ситуация требует определения причинно-следственной связи роста заболеваемости и разработки адекватных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

Для годовой динамики заболеваемости внебольничными пневмониями характерна слабо выраженная сезонность: 60 % заболеваний приходится на осенне-зимний период. При этом доля заболеваний, связанных с сезонными факторами, составляет 40,7 %. Также в годовой динамике внебольничных пневмоний доказана прямая тесная связь с заболеваемостью ОРВИ, что позволяет планировать профилактические мероприятия с более широким спектром воздействия на эпидемический процесс внебольничных пневмоний.

Анализ этиологической структуры ВП зависит, прежде всего, от уровня стандартизации и частоты применения методов лабораторной диагностики. Недостаточный уровень стандартизации, отсутствие четких алгоритмов диагностики ВП приводит к различной интерпретации результатов лабораторных исследований, в основном точечного характера (на базе одной больницы, одного эпидемического очага).

В Российской Федерации на внебольничную пневмонию пневмококковой этиологии, по данным разных авторов, приходится от 15 до 76 % этиологически расшифрованных случаев у взрослых [3, 6, 7, 8].

По данным формы (ф-2) государственного статистического наблюдения за 2011–2012 гг., 43–44 % ВП имеют бактериальную природу. При этом диагноз *Streptococcus pneumoniae* был подтвержден только в 1,2–1,3 % от всех зарегистрированных в стране ВП и 2,6–3,08 % – от всех ВП бактериальной природы. Удельный вес ВП вирусной этиологии составил 0,25 % в 2011 г., и 2,1 % – в 2012. Рост данного показателя может свидетельствовать, с одной стороны, об улучшении этиологической расшифровки ВП, с другой – поднимать ряд вопросов о качестве проводимых исследований и обоснованно-

сти выводов о возрастании роли вирусных агентов в развитии пневмонии. Все это требует дальнейшего наблюдения и изучения. Более половины (54 %) внебольничных пневмоний остается этиологически нерасшифрованными.

В соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 24.02.2009 г. № 11 «О внеочередных донесениях о чрезвычайных ситуациях в общественном здравоохранении санитарно-эпидемиологического характера», письмом Роспотребнадзора от 15.11.2012 г. № 01/12895-12-32 в 2012 г. было зарегистрировано 6 эпидемических очагов внебольничных пневмоний, связанных с нарушениями санитарного законодательства по условиям размещения детей в организованных коллективах, отсутствием своевременной изоляции больных острыми респираторными вирусными инфекциями, поздним началом противоэпидемических мероприятий (Московская область – 2, Республика Хакасия – 1, Москва – 1, Нижегородская область – 2).

За прошедший период 2013 г. уже зарегистрировано 4 очага ВП: в январе–феврале в общеобразовательной школе пос. Береговое Амурской области 10 случаев заболеваний в течение одной недели; в феврале в общеобразовательной школе пос. Озерный Смоленской области 9 случаев; в августе в интернате для умственно отсталых детей Вологодской области 7 случаев, в том числе 1 случай, закончившийся летальным исходом; в октябре более 50 случаев ВП в школах города Нововоронеж.

В июле 2013 г. было зарегистрировано 2 завозных случая внебольничной пневмонии с тяжелым клиническим течением заболеваний. Супружеская пара из Республики Коми отдыхала в Арабских Эмиратах и по возвращении домой обратилась за медицинской помощью с симптоматикой тяжелого острого респираторного синдрома. Специалистами Роспотребнадзора был проведен полный комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий с отработкой алгоритмов при выявлении больных с подозрением на особо опасную инфекцию. В течение суток была проведена доставка материала в ведущие научно-исследовательские организации и получены результаты о наличии в материале от больных легионелл.

Таким образом, актуальность и значимость проблемы ВП не только как тяжелой и широко распространенной нозологической формы, но и как индикатора опасных инфекций в настоящее время не вызывает сомнений. Рассматривая ВП как инфекционное заболевание, необходимо отработать методику мониторинговых и профилактических мер.

В январе 2013 г. руководителем Роспотребнадзора были утверждены методические указания МУ 3.1.2.3047-13 «Эпидемиологический надзор за внебольничными пневмониями», которые определили основные подходы к проведению эпидемиологического надзора и организации профилактических

мероприятий в очагах ВП.

В настоящее время подготовлен к утверждению проект методических указаний «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний», который послужит базовым документом по тактике проведения этиологической расшифровки ВП как в эпидемических очагах, так и при спорадической заболеваемости.

Уже закончено общественное обсуждение по проекту санитарно-эпидемиологических правил «Профилактика внебольничных пневмоний», призванному определить стратегию по оптимизации эпидемиологического надзора и профилактики ВП на ближайшие годы.

Документы определяют позиции эпидемиологического надзора за ВП, порядок выявления и регистрации случаев ВП, алгоритм отработки очагов, основные профилактические меры.

Основными направлениями эпидемиологического надзора за ВП на ближайшую перспективу являются:

- продолжение мониторинга заболеваемости ВП, введение в учетно-отчетные документы здравоохранения стандартов определения внебольничных пневмоний, изучение особенностей эпидемического процесса ВП в отдельно взятых регионах, определение контингентов риска;

- внедрение в практику лабораторий технологии этиологической расшифровки ВП, внедрение микробиологического мониторинга, как системы слежения за циркуляцией и распространением возбудителей ВП;

- внедрение в практику органов и организаций Роспотребнадзора эпидемиологической диагностики ВП, прогнозирования и оценки эффективности проводимых мероприятий, алгоритма работы специалистов в очагах ВП;

- изучение эффективности иммунизации населения против гриппа, пневмококковой инфекции и гемофильной инфекции в целях профилактики ВП, разработка подходов к экстренной профилактике в очагах внебольничных пневмоний.

Разработанные меры призваны совершенствовать профилактику ВП, привести к снижению уровня заболеваемости и смертности от указанной нозологии, а также оптимизировать противоэпидемическую работу в очагах с целью обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гучев И.А., Клочков О.И. Антибиотикопрофилактика вспышек внебольничной пневмонии в гомогенной популяции. *Качественная клиническая практика*. 2003; 1:24–9.
2. Мельниченко П.И., Огарков П.И., Жоголев С.Д., Харитонов М.А., Комаревцев В.Н. Особенности эпидемиологии и профилактики пневмоний у военнослужащих в условиях локальных войн и вооруженных конфликтов. *Военно-мед. журн.* 2001; 8:54–61.
3. Синопальников А.И., Фесенко О.В., Тихонов Ю.Г., Дуганов В.К. Тяжелая внебольничная пневмония: этиологическая структура. *Антибиотики и химиотерапия*. 2001; 46(6):6–11.
4. Синопальников А.И., Зайцев А.А. «Трудная» пневмония. М.; 2010. 56 с.



5. Чучалин А.Г. Синопальников А.И., Чернеховская Н.Е. Пневмония. М.: Экономика и информатика; 2002. 480 с.
6. Чучалин А.Г. Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.; 2010. 60 с.
7. Чучалин А.Г. Цой А.Н., Архипов В.В., Левшин И.Б. Пневмония с точки зрения доказательной медицины. М.; 2002. 111 с.
8. Чучалин А.Г. Синопальников А.И., Страчунский Л.С. Пневмония. М.: МИА; 2006. 464 с.

#### References

1. Guchev I.A., Klochkov O.I. [Antibiotic prophylaxis of community-acquired pneumonia onsets in a homogenous population]. *Kachestv. Klinich. Praktika*. 2003; 1:24–9.
2. Mel'nichenko P.I., Ogarkov P.I., Zhogolev S.D., Kharitonov M.A., Komarevtsev V.N. [Peculiarities of pneumonia epidemiology and prophylaxis in military men under the conditions of localized wars or armed conflicts]. *Voenno-Med. Zh.* 2001; 8:54–61.
3. Sinopal'nikov A.I., Fesenko O.V., Tikhonov Yu.G., Duganov V.K. [Severe community-acquired pneumonia: etiological structure]. *Antibiot. Khimioterap.* 2001; 46(6):6–11.
4. Sinopal'nikov A.I., Zaytsev A.A. ["Severe" Pneumonia]. М.;

2010. 56 p.

5. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Chernekhovskaya N.E. [Pneumonia]. М.: Ekonomika i Informatika; 2002. 480 p.
6. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S., Tyurin I.E., Rachina S.A. [Community-Acquired Pneumonia in Adults. Practice Guidelines on Diagnostics, Treatment, and Prophylaxis]. М.; 2010. 60 p.
7. Chuchalin A.G., Tsoy A.N., Arkhipov V.V., Levshin I.B. [Pneumonia from the View Point of Evidence-Based Medicine]. М; 2002. 111 p.
8. Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Strachunsky L.S. [Pneumonia]. М.: MIA; 2006. 464 p.

#### Authors:

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

#### Об авторах:

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

Поступила 22.10.13.

А.Ф.Попков<sup>1</sup>, С.В.Балахонов<sup>1</sup>, Д.Б.Вержущий<sup>1</sup>, В.М.Корзун<sup>1</sup>, Е.В.Чипанин<sup>1</sup>, Т.И.Иннокентьева<sup>1</sup>,  
М.В.Афанасьев<sup>1</sup>, Л.П.Базанова<sup>1</sup>, С.А.Белькова<sup>1</sup>, Ю.А.Вержущая<sup>1</sup>, Е.А.Вершинин<sup>1</sup>, Г.А.Воронова<sup>1</sup>,  
С.А.Косилко<sup>1</sup>, А.И.Логачев<sup>1</sup>, Л.С.Немченко<sup>1</sup>, А.Я.Никитин<sup>1</sup>, Л.П.Окунев<sup>1</sup>, Е.Г.Токмакова<sup>1</sup>,  
М.Ю.Шестопалов<sup>1</sup>, А.В.Холин<sup>1</sup>, Е.П.Михайлов<sup>2</sup>, Э.А.Глушков<sup>3</sup>, В.А.Агапов<sup>4</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АСПЕКТОВ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА В СИБИРСКИХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ

<sup>1</sup>ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Тувинская противочумная станция», Кызыл, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФКУЗ «Читинская противочумная станция», Чита, Российская Федерация

Проводилось комплексное изучение структурных компонентов экосистем сибирских природных очагов чумы, уровней интеграции составляющих эпизоотического процесса, путей их функционального взаимодействия. На основе применения интегрального подхода к исследованию структурно-функциональных элементов паразитарной системы и изучению динамики эпизоотического процесса установлены особенности протекания эпизоотий, трансформации структуры популяций и сообществ носителей и переносчиков во времени и пространстве. Выявлено генетическое разнообразие чумного микроба, циркулирующего в пределах отдельных очагов и участков очаговости. Установлен длительный противозепидемиологический эффект (более 20 лет) полевой дезинсекции в пределах Саглинского мезоочага Тувинского природного очага чумы.

**Ключевые слова:** сибирские природные очаги чумы, структурно-функциональные элементы, эпизоотический процесс.

A.F.Popkov<sup>1</sup>, S.V.Balakhonov<sup>1</sup>, D.B.Verzhutsky<sup>1</sup>, V.M.Korzun<sup>1</sup>, E.V.Chipanin<sup>1</sup>, T.I.Innokent'eva<sup>1</sup>,  
M.V.Afanasyev<sup>1</sup>, L.P.Bazanov<sup>1</sup>, S.A.Bel'kova<sup>1</sup>, Yu.A.Verzhutskaya<sup>1</sup>, E.A.Vershinin<sup>1</sup>, G.A.Voronova<sup>1</sup>,  
S.A.Kosilko<sup>1</sup>, A.I.Logachev<sup>1</sup>, L.S.Nemchenko<sup>1</sup>, A.Ya.Nikitin<sup>1</sup>, L.P.Okunev<sup>1</sup>, E.G.Tokmakova<sup>1</sup>, M.Yu.Shestopalov<sup>1</sup>,  
A.V.Kholin<sup>1</sup>, E.P.Mikhaylov<sup>2</sup>, E.A.Glushkov<sup>3</sup>, V.A.Agapov<sup>4</sup>

## Investigations of Structural-Functional Aspects of Epizootic Process in Natural Plague Foci in Siberia

<sup>1</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; <sup>2</sup>Altay Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; <sup>3</sup>Tuva Plague Control Station, Kyzyl, Russian Federation; <sup>4</sup>Chita Plague Control Station, Chita, Russian Federation

Comprehensively studied have been structural elements of ecosystems of Siberian natural plague foci, as well as levels of integration among epizootic process components, and ways of their functional interaction. Application of the complex approach to the surveillance over structural-functional elements of the parasitic system along with investigations of epizootic process dynamics has provided for identification of peculiarities as regards epizootics development, transformation and evolution of population and carrier/vector coenosis structure in time and space. Revealed is the genetic diversity of plague microbe circulating within the bounds of separate foci and zones of focality. Determined is a long-lasting anti-epidemic effect (more than 20 years) of the field disinsection in the Saglinsk meso-focus of the Tuva natural plague focus.

**Key words:** Siberian natural plague foci, structural-functional elements, epizootic process.

Функционирование природных очагов инфекций как сложных многоуровневых паразитарных систем определяется взаимодействием популяций носителей, переносчиков, возбудителя в конкретных экологических условиях.

В настоящее время ключевым направлением исследования энзоотии чумы в Сибири и разработки методов ее профилактики является изучение природной очаговости этой инфекции на основе развития популяционно-экологических представлений о движущих факторах эпизоотического процесса [5, 9].

Основная концепция заключается в том, что существование природных очагов чумы определяется взаимодействием членов эпизоотической триады на основе процессов саморегуляции. Популяции носителей и переносчиков возбудителя инфекции выступают в роли компонентов этой системы, в них осуществляются процессы авторегуляции, обеспечи-

вающие их гомеостаз. Неравнозначность для жизнедеятельности чумного микроба отдельных внутрипопуляционных группировок основного носителя и связанных с ним сообществ переносчиков обуславливает тот или иной характер эпизоотической активности очага, его пространственную организацию и эпидемиологическую значимость [3, 16].

В сибирских природных очагах чумы изучение механизмов эпизоотического процесса и выявление причин, влияющих на его динамику, проводилось на основании ранее разработанного популяционно-методологического подхода, заключающегося в анализе особенностей эпизоотических проявлений с учетом пространственной структурированности и гетерогенности сочленов эпизоотической триады. Магистральным направлением исследований явилось комплексное изучение структурных компонентов экосистем природных очагов чумы, уровней ин-

теграции составляющих эпизоотического процесса и путей их функционального взаимодействия с целью совершенствования мероприятий по профилактике этой инфекции.

В настоящем сообщении приводятся основные результаты исследований, проведенных в сибирских природных очагах чумы в 2006–2010 гг.

В Горно-Алтайском природном очаге чумы в последнее пятилетие наблюдалась высокая эпизоотическая активность. Относительное количество эпизоотических участков за это время изменялось от 50,0 до 68,8 % и значительно превышало средний многолетний уровень, который на 2005 г. составлял для очага 30,0 %. За указанный период изолирован 361 штамм возбудителя, получено 116 положительных серологических реакций на чуму.

К настоящему времени в границах очага по характеру проявления эпизоотического процесса, специфике видового спектра носителей и переносчиков, их популяционной структуре выделены три относительно независимых участка очаговости (Уландрыкский, Тархатинский и Курайский), которые территориально и функционально связаны с популяциями монгольской пищухи [3].

В этом очаге прослежена многолетняя динамика эпизоотической активности и численности населения монгольской пищухи – основного носителя возбудителя. На фоне долговременного роста численности населения монгольской пищухи наблюдаются ее циклические колебания с периодом около восьми лет. Установлено, что закономерные изменения эпизоотической активности очага связаны с циклами численности. В фазе ее роста происходит возрастание эпизоотической активности. Пик последней, оцениваемой по комплексу прямых и косвенных параметров, в том числе и по количеству изолируемых культур, совпадает или приходится на следующий год после пика численности зверька, то есть на начало фазы спада. При депрессии и на начальном этапе

роста численности пищухи активность очага минимальная [10].

Исследование популяционной структуры основного носителя в Горно-Алтайском очаге показало, что каждая из трех выделяемых группировок монгольской пищухи характеризуется своими индивидуальными особенностями изменения численности (по средним значениям, по амплитуде колебаний, по долговременной центральной тенденции), проявляющимися при многолетней динамике. Полученные данные подтверждают популяционную самостоятельность выделенных в пределах очага трех субвидовых группировок этого зверька.

За последние годы в очаге обнаружены новые эпизоотические участки. Одной из самых вероятных причин расширения энзоотичной территории является относительно стабильная высокая численность монгольской пищухи в 1999–2010 гг., и, как следствие, расширение ее ареала в Юго-Восточном Алтае [3, 7, 8]. Именно на вновь выявленных участках обитания монгольской пищухи с 2003 по 2010 год были обнаружены до этого не регистрируемые эпизоотические проявления: вблизи с. Бельтир (долины рек Талдура, Кускуннур, Чаган), с. Ортолык (район бугров Бигдон и южный склон Курайского хребта от русла р. Чичке-Терек до р. Ян-Терек), в верхней части долины р. Большие Шибеты и ее левого притока р. Аксай (рис. 1).

При анализе долговременного изменения структуры сообществ блох в Горно-Алтайском очаге на обширных территориях, занимаемых двумя популяциями монгольской пищухи, выявлено постепенное расселение ее специфичной и массовой блохи *Ctenophyllus hirticrus*. Распространение возбудителя чумы на эти участки произошло вскоре после подъема численности здесь данных эктопаразитов. Предполагается, что одним из факторов, определивших распространение эпизоотий в пределах очага и образование новых участков стойкого сохранения

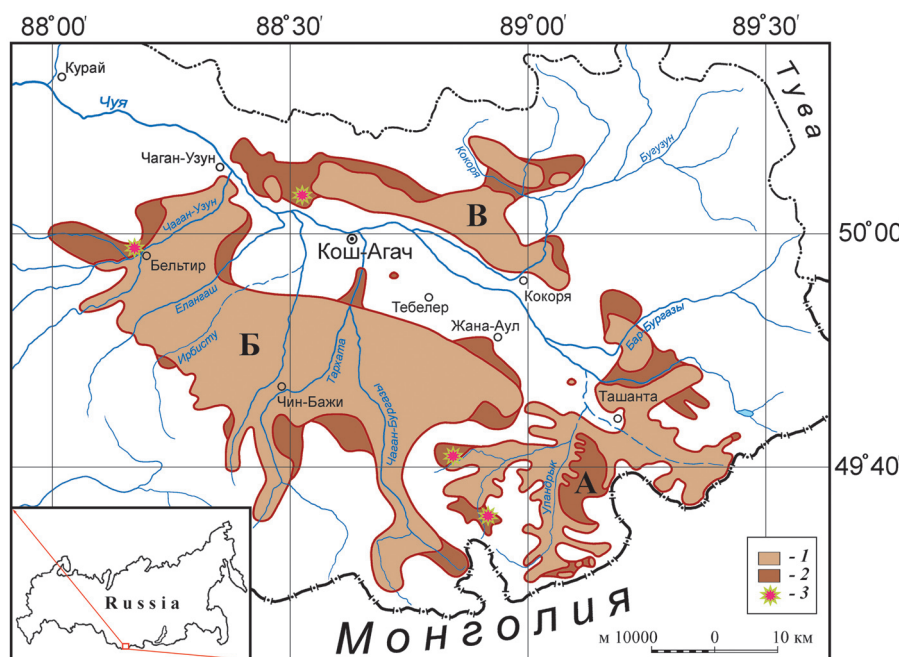


Рис. 1. Поселения монгольской пищухи в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы:

1 – в 2003 г.; 2 – в 2010 г.; 3 – новые места обнаружения возбудителя чумы в 2003–2011 гг. Популяции монгольской пищухи: А – Уландрыкская, Б – Тархатинская, В – Курайская



возбудителя чумы, является заселение этих районов *C. hirticrus* [11].

В Тувинском природном очаге эпизоотическая активность носила преимущественно микроочаговый вялотекущий характер. Всего за пятилетие изолировано 153 культуры чумного микроба и получено 90 положительных серологических реакций на чуму. Эпизоотии разлитого типа, как это наблюдалось ранее в долинах рек Барлык и Каргы, на территории очага не регистрировались. В 2006–2008 гг. отмечалось изменение пространственной приуроченности обнаруживаемых эпизоотических проявлений. В пределах известной очаговой территории Барлыкского мезоочага возбудитель чумы в 2006 г. после 17-летнего перерыва был вновь обнаружен в долине р. Оначи, а в 2008 г. – на новом участке в среднем течении долины р. Барлыкский Эльды-Хем. В 2006 и 2008 гг. эпизоотические проявления были выявлены на новых участках в долине р. Толайлыг (Толайлыгский мезоочаг). В пределах наиболее активного в эпизоотологическом плане Монгун-Тайгинского мезоочага также происходило изменение пространственной локализации эпизоотий. В 2007 г., впервые после 40-летнего перерыва, возбудитель чумы был выявлен от блох длиннохвостого суслика в зоне сухих степей на нижней высотной границе очага в непосредственной близости от районного центра – пос. Мугур-Аксы. На следующий год эпизоотические проявления были обнаружены в субальпийском поясе (урочища Верхний Узун-Хем и Верхний Оюн-Хем), где до этого возбудитель чумы никогда не регистрировался. Проникновение чумного микроба в плотные поселения длиннохвостого суслика в субальпийской зоне было вызвано, по всей видимости, климатическими изменениями, создавшими условия для увеличения здесь численности населения основного переносчика чумы – блохи *Citellophilus tesquorum*. Кроме известной энзоотичной по чуме территории, группы положительных серологических реакций на чуму были выявлены в 2006 г. в долине р. Моген-Бурен в нескольких десятках километров западнее существующих границ очага, а в 2008 г. – в урочище Чозы, расположенном на несколько десятков километров восточнее известных ранее эпизоотических участков. В 2010 г., несмотря на интенсивное обследование очага, культур возбудителя чумы выделить не удалось. Получено только 20 положительных серологических реакций на чуму. При общей оценке эпизоотической ситуации в очаге следует обратить внимание на выявление в 2010 г. резкого повышения численности всех групп эктопаразитов в Саглинском мезоочаге, где до сих пор сказывалось воздействие сплошных дезинсекционных мероприятий, проведенных в 1981–1985 гг.

Проведенные исследования показали, что парцеллярные группировки популяций длиннохвостого суслика в Южной и Юго-Западной Туве характеризуются определенными различиями по численности и половозрастной структуре. Распределение таких поселений по территории неравномерно, что может сказываться и на возможности циркуляции чумного

микроба. Наиболее оптимальные условия для этого складываются в поселениях суслика, где в мае-июне формируются агрегации самок и накапливаются высокие плотности блох. Эти данные позволяют в значительной степени оптимизировать тактику эпизоотологического обследования в Тувинском природном очаге чумы [9].

Установлено, что каждая из популяций суслика характеризуется четко выраженной высокоспецифичной структурой таксоценоза блох (рис. 2). Это позволяет использовать особенности населения блох для определения границ отдельных популяций зверька и установления степени связи между ними, дает важную информацию для выявления пространственной организации Тувинского очага чумы, его генезиса и возможностей трансформации границ эпизоотических проявлений в будущем.

Данные эпизоотологического мониторинга в Забайкальском природном очаге чумы показали, что воздействие ряда неблагоприятных факторов внешней среды и хозяйственной деятельности человека (дефицит и неравномерность выпадения осадков, сухостей, систематические пожары, изменение характера выпаса скота), приводящее к трансформации местных биоценозов, вызвало глубокую депрессию численности основного и второстепенных носителей, сводя к минимуму возможность циркуляции чумного микроба. Сложившаяся ситуация вызвала необходимость разработки новых подходов к обследованию данной территории.

На основании анализа ретроспективных литературных и архивных данных, касающихся эпидемических и эпизоотических проявлений чумы, а также оценки современного состояния биоценозов Юго-Восточного Забайкалья и социально-экономической обстановки, проведены эпизоотологическая дифференциация и эпидемиологическое районирование территории Забайкальского природного очага чумы. С учетом новых данных разработаны методические и тактические приемы эпизоотологического обследования очага.

Интересные факты были выявлены при исследовании особенностей трансмиссии чумного микроба в паразитоценозе. Экспериментально показана неоднородность разных половозрастных групп блох в передаче и сохранении чумного микроба [2]. Установлено, что изогенный мутантный вариант чумного микроба И-3480, утративший две плазмиды (pCad, pPst), в условиях опыта не отличался по способности блокировать преджелудок у блох от полноценного штамма И-2638, имеющего четыре плазмиды (pCad, pPst, pFra, pTP33). При этом передачу возбудителя чумы, утратившего плазмиды pCad, pPst, несмотря на высокий процент блокирования им блох, не наблюдали. Следовательно, наличие блока преджелудка не всегда является показателем эффективности передачи возбудителя чумы блохами [8]. Выявлена возможность формирования тесных функциональных связей (возбудитель – переносчик) между чумным микробом и блохами из географически разобщенных популяций.

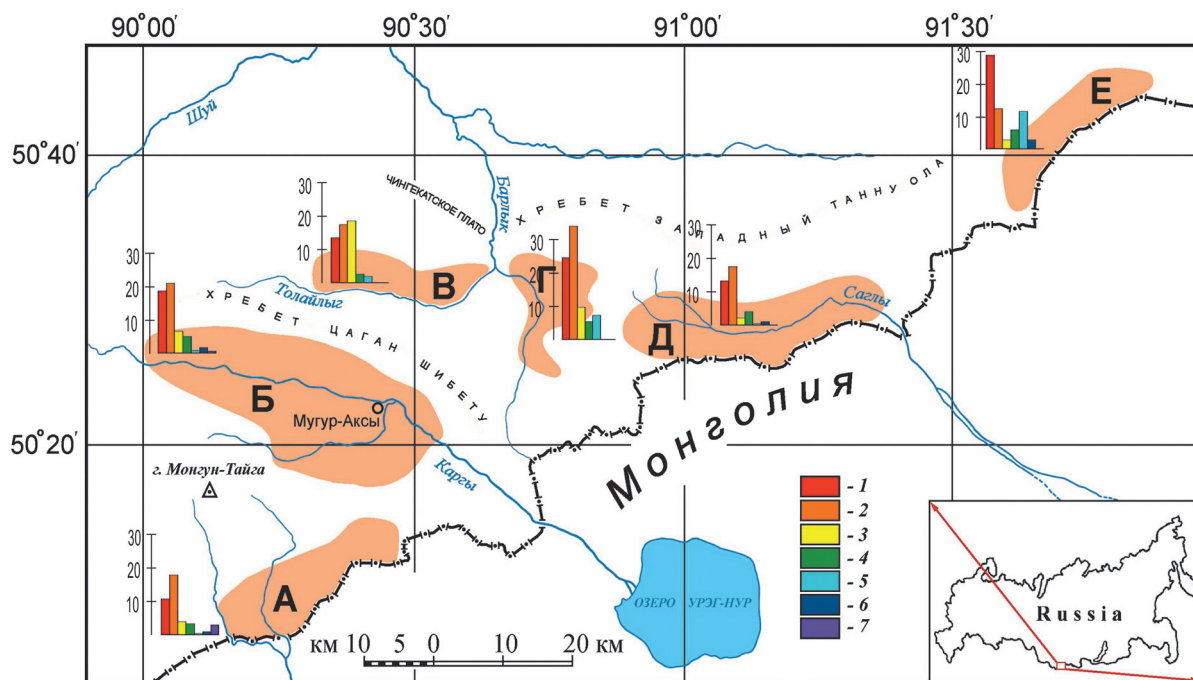


Рис. 2. Общий запас массовых видов блох в микробиотопе длиннохвостого суслика на территории отдельных популяций зверька (А – Кара-Бельдырской, Б – Монгун-Тайгинской, В – Толайлыгской, Г – Барлыкской, Д – Саглинской, Е – Боро-Шайской) в Тувинском природном очаге чумы (сумма индексов обилия по объектам сбора – в шерсти зверьков, во входах их нор и в гнездах):

1 – *Citellophilus tesquorum*, 2 – *Rhadinopsylla li*, 3 – *Neopsylla mana*, 4 – *Oropsylla alaskensis*, 5 – *Frontopsylla elatoides*, 6 – *Frontopsylla hetera*, 7 – *Amphipsylla primaris*

Так, штамм чумного микроба, изолированный на территории Хэнтейского природного очага Монголии, формировал «блоки» преджелудка у *C. tesquorum* из Забайкалья и Тувы, а зараженные насекомые осуществляли передачу возбудителя животным с генерализацией у них инфекционного процесса, что показывает возможность его дальнейшей трансмиссии [1].

В системе микробиологического мониторинга при изучении фено- и генотипических свойств свежевыделенных штаммов чумного микроба в Горном Алтае и Туве установлено, что большинство из них являются типичными для соответствующего очага, в пределах которого они изолированы. Штаммы чумного микроба основного подвида выделены в Тувинском очаге от длиннохвостых сусликов и их эктопаразитов, штаммы алтайского подвида – в основном от монгольских пищух и их блох.

Проведены исследования пространственной структурированности *Yersinia pestis* subsp. *altaica*, циркулирующего в Горно-Алтайском очаге. Установлено, что на каждом из трех участков очаговости за последние 20 лет сформировалась специфическая структура возбудителя чумы по питательным потребностям в триптофане. Результаты VNTR-генотипирования изолятов чумного микроба по повторяющейся последовательности (5'-СААА-3')<sub>n</sub> показали, что штаммы с каждого из трех участков очаговости формируют отдельные аллельные варианты, отличающиеся по этому показателю. Такие данные свидетельствуют о пространственной неоднородности *Y. pestis* subsp. *altaica* в очаге. На каждом участке очаговости распространен возбудитель, обладающий отличиями в частоте встречаемости ауксотрофов по триптофану и генотипическими особенностями по

количеству повторов тетра nukлеотида СААА [4].

Все изученные штаммы чумного микроба вне зависимости от питательной среды высокочувствительны к антибактериальным препаратам как I, так и II ряда, устойчивых штаммов не выявлено.

Выполненное MLVA-генотипирование штаммов *Y. pestis* из Тувинского и Горно-Алтайского природных очагов указывает на то, что применение мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) значительно превосходит однолокусный вариант, обладая наибольшим дискриминационным потенциалом для выявления внутривидового полиморфизма. Данный методический подход может использоваться как перспективное направление в генотипировании чумного микроба, позволяющее повысить точность и увеличить гносеологическую ценность результатов молекулярно-эпидемиологического мониторинга природных очагов чумы. Изучение дискриминационных возможностей метода мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) по 20 VNTR-локусам показало, что все протестированные локусы штаммов чумного микроба из сибирских природных очагов могут быть разделены на несколько категорий по степени пригодности для выявления различных уровней внутривидового полиморфизма. Первая (большая часть локусов) – непригодна для выявления внутривидового полиморфизма; вторая – ограниченно пригодна, поскольку выявляет лишь незначительные отличия, трудно поддающиеся учету; третья – пригодна для обнаружения внутривидового полиморфизма для штаммов алтайского и основного подвида; четвертая – пригодна для обнаружения внутривидового полиморфизма как у тувинских, так и горно-алтайских изолятов [5, 6].



На основании результатов мониторинга отдельных участков Тувинского природного очага чумы, где в 1981–1988 гг. реализованы широкомасштабные дезинсекционные, либо направленные дератизационные работы, сделано заключение, что проведение профилактических мероприятий с учетом особенностей популяционной структуры носителей и переносчиков могут давать длительный противоэпизоотический эффект с улучшением эпидемиологических прогнозов [12, 13, 14].

Исследована инсектицидная активность 42 соединений различных химических классов, синтезированных Иркутским институтом химии им. А.Е.Фаворского СО РАН. Выявлен ряд препаратов, перспективных для продолжения испытаний их инсектицидных свойств и дальнейшего поиска высокоэффективных веществ [15].

На основании комплексного изучения экосистем природных очагов чумы с применением интегрального подхода к исследованию структурно-функциональных элементов паразитарной системы и динамики эпизоотического процесса были получены новые результаты, способствующие углублению знаний об особенностях энзоотии чумы в Сибири.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базанова Л.П., Воронова Г.А., Косилко С.А. Взаимоотношения чумного микроба и блох из географически разобщенных популяций. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106):66–9.
2. Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Вержущий Д.Б., Воронова Г.А. Половые различия в трансмиссии возбудителя чумы блохами (*Siphonaptera*). *Мед. паразитол.* 2010; 4:49–53.
3. Балахонов С.В., Вержущий Д.Б., Корзун В.М., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Чипанин Е.В. Современное состояние природных очагов чумы Сибири. *Журн. инф. патол.* 2009; 16(3):16–20.
4. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Романова И.Ф. Результаты VNTR-анализа по locus (5'-CAAA-3')<sup>n</sup> штаммов *Yersinia pestis* из активных природных очагов чумы Сибири. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 3:14–7.
5. Вержущий Д.Б. Межпопуляционные связи у длиннохвостого суслика в Юго-Западной Туве. *Бюл. МОИП (Отд. биол.)*. 2006; 5(111):52–9.
6. Воронова Г.А., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Базанова Л.П. Взаимоотношения штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом и блох *Xenopsylla cheopis* (Roths. 1903). *Мед. паразитол.* 2011; 2:15–8.
7. Денисов А.В., Чипанин Е.В. Динамика проявлений эпизоотий чумы в Горно-Алтайском природном очаге. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):101–2.
8. Ешелкин И.И. Территориальные группировки монгольской пищухи в Юго-Восточном Алтае. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):108–9.
9. Зонов Г.Б., Вержущий Д.Б., Попов В.В., Ткаченко В.А. Разнокачественность популяции носителя как фактор энзоотии чумы (на примере Тувинского природного очага). *Байкальский зоол. журн.* 2010; 1(4):94–7.
10. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Михайлов Е.П., Денисов А.В. Динамика эпизоотической активности и численности населения монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106):13–8.
11. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Михайлов Е.П., Фомина Л.А., Сотникова Т.В., Денисов А.В. Расселение блохи *Ctenophyllus hirticrus* и распространение эпизоотий чумы в Горном Алтае. *Паразитология*. 2007; 41(3):206–17.
12. Немченко Л.С. Воздействие профилактических мероприятий на ядра популяции длиннохвостого суслика в Тувинском природном очаге чумы. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):156–7.
13. Никитин А.Я. Вклад Иркутского противочумного института в развитие стратегии, тактики, методов подавления численности членистоногих. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):158–9.
14. Никитин А.Я., Кардаш А.И. Возможность использования некоторых пиретроидов для профилактики чумы в природных очагах Сибири сусликового типа. *Мед. паразитол.* 2009; 4:42–4.

15. Никитин А.Я., Козлова Ю.А., Шашина Н.И., Германт О.М., Левковская Г.Г., Кондрашов Е.В., Рудякова Е.В. Оценка инсектицидной и акарицидной активности сульфонамидополхлорэтилированных гетаренов. *Дез. дело*. 2010; 3:26–32.
16. Попков А.Ф., Вержущий Д.Б., Корзун В.М., Иннокентьева Т.И., Чипанин Е.В., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Никитин А.Я., Окунев Л.П., Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Логачев В.И., Михайлов Е.П., Федоров С.В., Агапов В.А. Итоги популяционно-экологических исследований природной очаговости чумы в Сибири. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 2(94):33–6.

#### References

1. Bazanova L.P., Voronova G. A., Kosilko S.A. [Interrelations of plague microbe and fleas from geographically separated populations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4(106):66–9.
2. Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Verzhutsky D.B., Voronova G.A. [Gender difference in plague agent transmission by fleas (*Siphonaptera*)]. *Med. Parazitol.* 2010; 4:49–53.
3. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Chipanin E.V. [Current state of Siberian natural plague foci]. *Zh. Infekts. Patol.* 2009; 16(3): 16–20.
4. Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Romanova I.F. [VNTR-assay data on (5'-CAAA-3')<sup>n</sup> locus in *Yersinia pestis* strains isolated from active natural plague foci in Siberia]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 3:14–7.
5. Verzhutsky D.B. [Interpopulation relations of the long-tailed souslik inhabitant in the South-West Tuva]. *Byul MOIP. Otd. biol.* 2006; 5(111):52–9.
6. Voronova G.A., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Bazanova L.P. [Relations between plague microbe strains with different plasmid composition and fleas *Xenopsylla cheopis* (Roths. 1903)]. *Med. Parazitol.* 2011; 2:15–8.
7. Denisov A.V., Chipanin E.V. [Dynamics of plague epizootics manifestations in Gorno-Altai natural focus]. *Zh. Infekts. Patol.* 2009; 3(16):101–2.
8. Eshelkin I.I. [Territorial groupings of the Mongolian mouse-hare in South-East Altay]. *Zh. Infekts. Patol.* 2009; 3(16):108–9.
9. Zonov G.B., Verzhutsky D.B., Popov V.V., Tkachenko V.A. [Heterogeneity of carrier population as plague enzootics factor (on the model of Tuva natural focus)]. *Baik. Zool. Zh.* 2010; 1(4):94–7.
10. Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Mikhailov E.P., Denisov A.V. [Dynamics of epizootic activity and abundance of Mongolian pika in the Altai mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4(106):13–8.
11. Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Mikhailov E.P., Fomina L.A., Sotnikova T.V., Denisov A.V. [Dissemination of the flea *Ctenophyllus hirticrus* and distribution of plague epizootics in Gorny Altay]. *Parazitologiya*. 2007; 41(3):206–17.
12. Nemchenko L.S. [Impact of preventive measures on the long-tailed souslik population nuclei in the Tuva natural plague focus]. *Zh. Infekts. Patol.* 2009; 3(16):156–7.
13. Nikitin A.Ya. [Irkutsk Anti-Plague Institute contribution into the development of strategy, tactics and methodology of arthropods abundance suppression]. *Zh. Infekts. Patol.* 2009; 3(16):158–9.
14. Nikitin A.Ya., Kardash A.I. [Possibility of pyrethroid application for plague prophylaxis in the Siberian natural foci of the souslik type]. *Med. Parazitol.* 2009; 4:42–4.
15. Nikitin A.Ya., Kozlova Yu.A., Shashina N.I., Germant O.M., Levkovskaya G.G., Kondrashov E.V., Rudyakova E.V. [Evaluation of insecticide and acaricide activity of sulfo-namidopolychloretylated hetarenes]. *Dez. Delo*. 2010; 3:26–32.
16. Popkov A.F., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Innokent'eva T.I., Chipanin E.V., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Nikitin A.Ya., Okunev L.P., Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Logachev V.I., Mikhailov E.P., Feodorov S.V., Agapov V.A. [Summing-up the results of the populational and ecological investigations into plague natural focus in Siberia carried out in 2001–2005]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 2(94):33–6.

#### Authors:

Popkov A.F., Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Afanas'ev M.V., Bazanova L.P., Bel'kova S.A., Verzhutskaya Yu.A., Vershinin E.A., Voronova G.A., Kosilko S.A., Logachev A.I., Nemchenko L.S., Nikitin A.Ya., Okunev L.P., Tokmakova E.G., Shestopalov M.Yu., Kholin A.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru  
Mikhailov E.P. Altai Plague Control Station, 2, 1-vaya Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru  
Glushkov E.A. Tuva Plague Control Station, 13, Moskovskaya St. Kyzyl, 667010, Russian Federation. E-mail: pchs17@mail.ru  
Agapov V.A. Chita Plague Control Station, 1, Biologicheskaya St., Chita, 672041, Russian Federation. E-mail: pchs.chita@mail.ru

#### Об авторах:

Попков А.Ф., Балахонов С.В., Вержущий Д.Б., Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Афанасьев М.В., Базанова Л.П., Белькова С.А., Вержущая Ю.А., Вершинин Е.А., Воронова Г.А., Косилко С.А., Логачев А.И., Немченко Л.С., Никитин А.Я., Окунев Л.П., Токмакова Е.Г., Шестопалов М.Ю., Холин А.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru  
Михайлов Е.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. 1-я Заводская, 5. E-mail: chuma@mail.gorny.ru  
Глушков Э.А. Тувинская противочумная станция. Российская Федерация, 667010, Кызыл, ул. Московская, 13. E-mail: pchs17@mail.ru  
Агапов В.А. Читинская противочумная станция. Российская Федерация, 672041, Чита, ул. Биологическая, 1. E-mail: pchs.chita@mail.ru

Поступила 14.05.13.



А.М.Поршаков<sup>1</sup>, А.А.Кузнецов<sup>1</sup>, А.Н.Матросов<sup>1</sup>, В.П.Булычев<sup>2</sup>, В.В.Ларин<sup>2</sup>**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВОЛГО-УРАЛЬСКОГО ПЕСЧАНОГО ОЧАГА ЧУМЫ ПО КРАТНОСТИ ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ МЕТОДОМ КРУГОВОЙ ЭКСТРАПОЛЯЦИИ**<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Астраханская противочумная станция», Астрахань, Российская Федерация

Представлены результаты изучения пространственной структуры российской части Волго-Уральского песчаного природного очага чумы. С помощью метода круговой экстраполяции пунктов обнаружения чумного микроба получена карта участка с многолетними эпизоотическими проявлениями за весь период обследования очага с 1926 по 2012 год. Создание карт эпизоотических участков и их совмещение осуществлено в автоматическом режиме штатными инструментами из пакета компьютерного приложения ArcGIS-10. На карте показана дислокация ядер активности очага и зон кратковременной регистрации эпизоотического процесса, определены их количественные характеристики. Картографическая модель дифференциации очаговой территории по кратности эпизоотических проявлений предназначена для обоснованного планирования мероприятий эпидемиологического надзора и дальнейшего изучения проблем энзоотии чумы. Полученные данные могут быть использованы для эпидемиологического районирования территории по чуме.

*Ключевые слова:* природный очаг чумы, эпизоотический участок, эпизоотологический мониторинг.

A.M.Porshakov<sup>1</sup>, A.A.Kuznetsov<sup>1</sup>, A.N.Matrosov<sup>1</sup>, V.P.Bulychev<sup>2</sup>, V.V.Larin<sup>2</sup>**Volga-Ural Sandy Plague Focus Differentiation against Epizootic Manifestations by Means of Circular Extrapolation**<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan, Russian Federation

Displayed are the results of study of the Volga-Ural sandy plague focus spatial structure. Constructed has been the map of the area with long-lasting persistent epizootic manifestations, monitored throughout the whole period from 1926 to 2012, using method of circular extrapolation of plague microbe detection points. Epizootic area mapping and map adjustment have been carried out automatically with the help of ArcGIS-10 software. The map displays the dislocation of plague focus activity nuclei and zones of short-term epizootic process registration; identified have been their quantitative parameters. Cartographic model of plague-focal territory differentiation against epizootic manifestation index is designed for validated planning of epidemiological surveillance activities and further studies of plague enzootics issues. The data obtained can be used for epidemiological zoning of territories as regards plague.

*Key words:* natural plague focus, epizootic area, epizootiological monitoring.

Общая площадь Волго-Уральского песчаного природного очага чумы составляет 60320 кв. км, в том числе 8700 кв. км в границах российской территории. Динамика эпизоотической активности здесь характеризовалась сменой экстенсивных эпизоотий локальными их проявлениями, перемежающимися более или менее продолжительными межэпизоотическими периодами [3]. Последние находки возбудителя чумы в популяциях малых песчанок регистрировали на территории России в 2005 г.

С целью совершенствования инструментов, используемых для пространственного анализа многолетней эпизоотической активности природных очагов чумы, была проведена детальная дифференциация территории Волго-Уральского песчаного очага методом круговой экстраполяции. В качестве объективного показателя общей активности очага использована продолжительность (кратность) периодов выявления зараженных носителей и переносчиков возбудителя на отдельных участках. Пространственная дифференциация очага была проведена по карте распределения участков с различной продолжительностью эпизоотий чумы. Отработка

технологических деталей и первый опыт применения метода круговой экстраполяции реализованы на примере Прикаспийского песчаного очага чумы [1]. Территория Волго-Уральского песчаного очага ранее не подвергалась столь детальному территориальному анализу эпизоотической активности. В данной работе мы восполняем этот пробел.

**Материалы и методы**

Для анализа использованы данные Астраханской противочумной станции по эпизоотологическому обследованию Волго-Уральских песков в период 1926–2012 гг., на основании которых получено обобщенное изображение участка с многолетними эпизоотическими проявлениями в юго-западной части Волго-Уральского песчаного очага чумы. Итоговая конфигурация участка сформировалась при совмещении карт за отдельные годы, созданных методом круговой экстраполяции [1]. По ряду причин было решено анализировать лишь российскую часть очага, что обусловлено, прежде всего, отсутствием данных о параметрах эпизоотических проявлений

на сопредельной территории Казахстана за последние два десятилетия. Однако для определения объективных очертаний приграничных участков мы учли несколько точек, расположенных за пределами российско-казахстанской границы и выявленных до 70-х годов XX в., которые имеют явную эпизоотологическую связь с точками на российской территории. Фактическая удаленность других мест обнаружения возбудителя чумы в Казахстане (10 и более км), выявленных как в прошлые годы, так и в последнее время, демонстрирует наличие территориального разрыва в дислокации российских и казахстанских эпизоотических участков, учитывая принятый нами радиус эпизоотологической экстраполяции (5 км).

В данном исследовании мы применили некоторые технологические усовершенствования метода. Во-первых, картографический этап работы выполнен с использованием современных цифровых топографических карт масштаба 1:100000, размещенных на главном сервере ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и входящих в состав электронных паспортов природных очагов чумы Северного и Северо-Западного Прикаспия. Во-вторых, создание ежегодных карт эпизоотических участков и их совмещение осуществлено в автоматическом режиме штатными инструментами из пакета компьютерного приложения ArcGIS-10. Однако определение окончательной конфигурации фрагментов и кратности эпизоотических проявлений на них проведено оператором вручную.

## Результаты и обсуждение

При анализе общей структуры участка с многолетними эпизоотическими проявлениями (рис. 1) обращает на себя внимание наличие единственного изолированного фрагмента, где эпизоотия чумы регистрировалась только один раз в течение двух лет (1974–1975 гг., ур. Тугайхудук). Его отрыв от основного участка составил около 30 км. Общая структура участка характеризуется такими же особенностями, как и Волго-Кумское междуречье Прикаспийского песчаного очага [1]. Здесь также просматривается наличие концентрических элементов с более плотными центральными частями, что выражено менее ярко в связи с искусственной усеченностью анализируемой территории. Известно, что восточнее и северо-восточнее этого участка (в Казахстане) эпизоотии чумы регистрировались заметно чаще (ур. Карабатыр, Кошалак, Бекетай и др.). На основании предварительной оценки находящиеся там ядра очага характеризуются большей интенсивностью и устойчивостью эпизоотического процесса, поэтому именно их следует считать выполняющими роль истинных мест сохранения возбудителя.

В Астраханской области за весь анализируемый период (87 лет) эпизоотическими были отдельные 25 лет, следовательно, индекс эпизоотичности (ИЭ) этой части очага равен 0,29. На большей части территории возбудитель регистрировался от 1 до 3 разрозненных

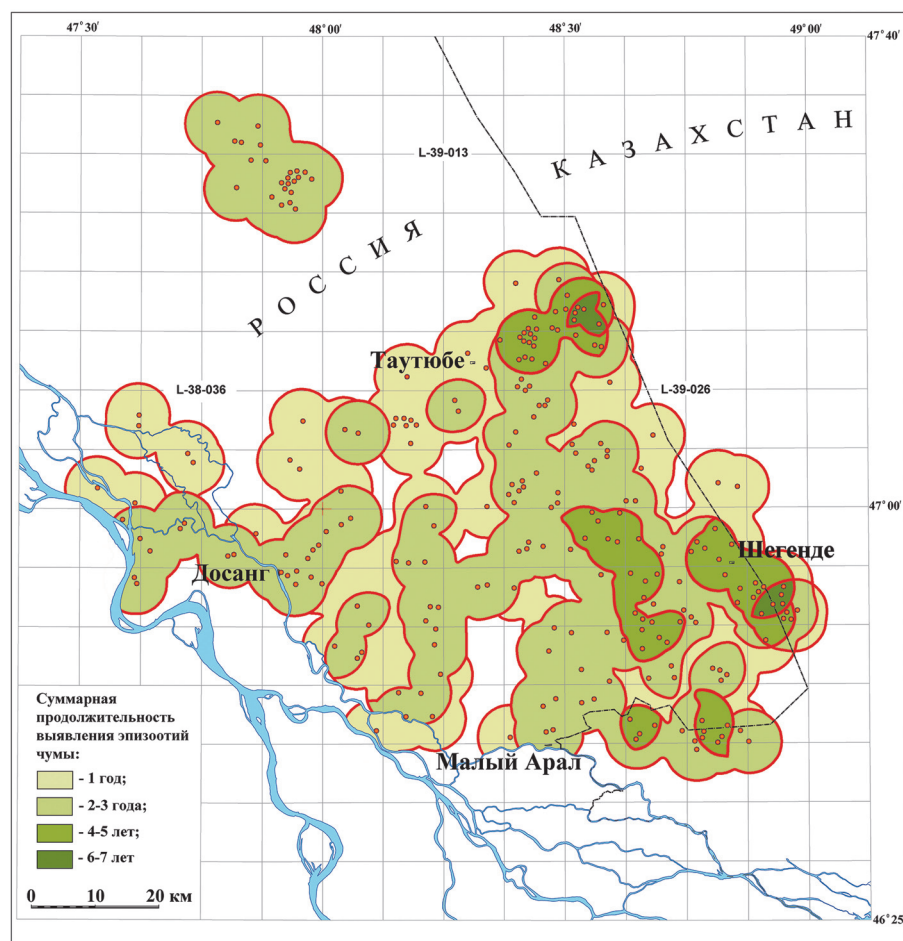


Рис. 1. Участок многолетних эпизоотических проявлений в Волго-Уральском песчаном очаге чумы (16) за 1926–2005 гг. в границах Российской Федерации и его дифференциация по суммарной продолжительности эпизоотий в поселениях носителей и переносчиков возбудителя

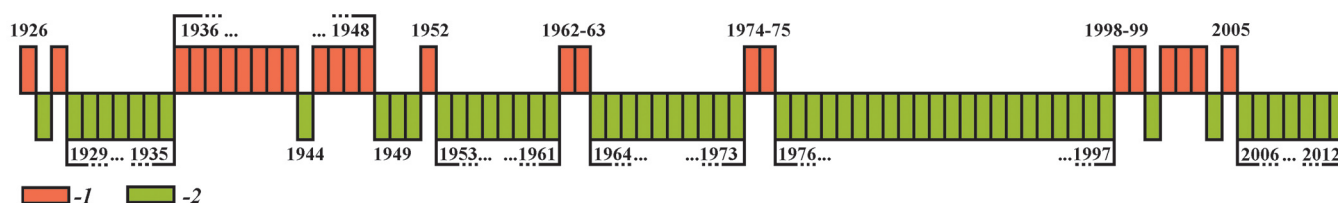


Рис. 2. Хронология выявления возбудителя чумы на юго-западе Волго-Уральского песчаного очага (Астраханская область):

1 – годы регистрации возбудителя чумы, 2 – межэпизоотические годы

или последовательных лет в разные периоды. Более частые (или более продолжительные) проявления (суммарно до 7 лет) отмечались в восточной части Астраханской области вдоль государственной границы в полосе шириной 20–30 км. На запад эпизоотический массив протянулся до Волго-Ахтубинской поймы, выйдя за пределы типичных ландшафтов песчаной пустыни.

Хронологический анализ активности всего Волго-Уральского песчаного очага чумы показывает наличие там чередующихся эпизоотических и межэпизоотических периодов различной длительности. При этом отдельные части очага характеризуются собственными режимами активности. Так, в юго-западной части, которая рассматривается в данном исследовании (рис. 2), был отмечен один продолжительный эпизоотический период с 1936 по 1948 год (13 лет). В более ранний период данные о наличии или отсутствии эпизоотий не могут считаться вполне достоверными, ввиду слабой интенсивности обследования этой части очага в то время.

Позднее эпизоотии чумы здесь обычно не длились более двух лет, а в промежутках между ними наблюдалось несколько продолжительных периодов покоя – от 7 до 22 лет. Зарегистрированные однодичные перерывы, по всей вероятности, таковыми не являлись, поскольку могли возникнуть как результат естественного пропуска зараженных животных при их малом количестве в природе. Кроме того, в других частях очага в эти годы эпизоотии протекали как обычно [2]. Согласно приведенным данным эпизоотическая активность юго-западного участка (ИЭ – 0,29) оказывается заметно ниже активности других частей и очага в целом, индекс эпизоотичности которого достигает 0,75.

Представляет интерес анализ показателей интенсивности проявлений чумы на территории более мелких фрагментов, образовавшихся при дифференциации эпизоотического участка. В качестве косвенного показателя интенсивности эпизоотии мы, как и в случае с Прикаспийским песчаным очагом, применили плотность положительных на чуму проб, которая «накапливается» при многократной регистрации на одной и той же территории. То есть оценка плотности положительных проб является объективной характеристикой как интенсивности, так и устойчивости эпизоотического процесса. Определение этого показателя не требует использования дополнительных параметров и может осуществляться картоме-

трическими способами.

Для вычленения фрагментов мы установили четыре градации длительности проявлений, которые хорошо просматриваются на рис. 1. Все фрагменты, входящие в одну градацию, образовывали условную зону. В пределах каждой такой зоны были подсчитаны все обнаруженные на ней эпизоотические точки и определена ее общая площадь. Результаты подсчета представлены в таблице.

Представленные здесь данные подтверждают визуальное преобладание зоны с 2–3-летними проявлениями чумы. Ее общая площадь (3130 кв. км) и количество мест регистрации возбудителя (145) превышают соответствующие показатели остальных зон, взятых вместе. Интегрированный показатель интенсивности и устойчивости эпизоотического процесса выражен плотностью эпизоотических точек на 100 кв. км (условно один сектор).

В пределах наиболее активных фрагментов участка (ядер), где возбудителя регистрировали 6–7 лет, плотность пунктов с чумой оказалась весьма высокой – в 5 раз выше средней плотности по участку. Однако их площадь составила менее 1 % от площади всего эпизоотического участка. В прогностических целях целесообразно рассматривать в качестве предполагаемых эпизоотических ядер две зоны: с 4–5- и 6–7-летними проявлениями. Их общая площадь составляет около 11 % участка, суммарное число точек с находками чумы – 31 %, средняя плотность положительных проб на 100 кв. км – 12,6.

Дислокация ядер, невзирая на определенную условность их границ, служит мощным наводящим признаком при поиске зараженных чумой животных. Мы считаем, что эффективность такой наводки возрастает в продолжительный межэпизоотический период и становится максимальной к моменту выхода природного очага или какой-либо его части из состояния покоя. Это обстоятельство позволяет рекомендовать активное использование результатов диффе-

| Длительность проявлений чумы, год | Общая площадь зоны |       | Кол-во эпизоотических точек |       |                         |
|-----------------------------------|--------------------|-------|-----------------------------|-------|-------------------------|
|                                   | кв. км             | %     | абс.                        | %     | плотность на 100 кв. км |
| 1                                 | 2030               | 35,1  | 30                          | 11,8  | 1,48                    |
| 2–3                               | 3130               | 54,1  | 145                         | 57,1  | 4,63                    |
| 4–5                               | 580                | 10,0  | 69                          | 27,2  | 11,9                    |
| 6–7                               | 48                 | 0,8   | 10                          | 3,9   | 20,8                    |
| Весь участок                      | 5788               | 100,0 | 254                         | 100,0 | 4,39                    |



ренциации при планировании эпизоотологического мониторинга в межэпизоотический период.

Таким образом, анализ продолжительности (кратности) эпизоотий чумы на небольших участках местности позволил выявить территории, в различной степени поддерживающие эпизоотический процесс среди носителей и переносчиков возбудителя. Картографическая интерпретация результатов анализа, представленная в статье, является удобной основой для эпидемиологического районирования и при планировании эпизоотологического обследования Волго-Уральского песчаного очага чумы. Результаты выполненной нами эпизоотологической дифференциации будут включены в электронный паспорт очага как в описательную часть, так и в виде специального картографического слоя.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Синцов В.К., Осипов В.П., Санджиев В.Б.-Х. Дифференциация Прикаспийского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):15–9.
2. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Удовиков А.И., Григорьева Г.В. Эпизоотическая активность и эпизоотологическое районирование природных очагов чумы Российской Федерации. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане.* Алматы, 2001; 3:178–81.

3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина, 2004. 192 с.

#### References

1. Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Sintsov V.K., Osipov V.P., Sandzhiev V.B.-Kh., Sludsky A.A. [Differentiation of the Pre-Caspian sandy plague foci on the basis of the frequency of epizootic manifestations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):15–9.
2. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Udovikov A.I., Grigor'eva G.V. [Epizootic activity and epizootiological zoning of natural plague foci in the Russian Federation]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane.* Almaty, 2001; 3:178–81.
3. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors [Natural Plague Foci of Caucasus, Precaspian Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

#### Authors:

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

Bulychev V.P., Larin V.V. Astrakhan Plague Control Station. 3, Kubanskaya St., Astrakhan, 414000, Russian Federation. E-mail: antichum@astranet.ru

#### Об авторах:

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

Булычев В.П., Ларин В.В. Астраханская противочумная станция. Российская Федерация, 414000, Астрахань, ул. Кубанская, 3. E-mail: antichum@astranet.ru

Поступила 13.06.13.

М.А.Тарасов<sup>1</sup>, В.А.Янович<sup>2</sup>, П.В.Копылов<sup>3</sup>, Л.И.Иванов<sup>4</sup>, Н.В.Попов<sup>1</sup>, В.П.Топорков<sup>1</sup>, В.В.Кутырев<sup>1</sup>

## ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ОЧАГОВ ЗООНОЗОВ В УСЛОВИЯХ СТИХИЙНОГО БЕДСТВИЯ (НАВОДНЕНИЕ)

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Еврейской автономной области, Биробиджан, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Еврейской автономной области», Биробиджан, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция», Хабаровск, Российская Федерация

Обобщены материалы эпизоотологического обследования территории Еврейской автономной области, подвергшейся катастрофическому наводнению в августе–сентябре 2013 г. Проведены учеты численности мелких млекопитающих — носителей опасных зоонозных болезней (ГЛПС, туляремии, лептоспирозов и др.), проверена эффективность дератизации, предложен ряд новых эколого-эпизоотологических показателей, характеризующих распределение грызунов в природных и антропогенных биотопах в связи с наводнением.

**Ключевые слова:** очаги зоонозов, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, эпизоотическая активность, эпизоотологическая ситуация, эпизоотологическое обследование, наводнения, чрезвычайная ситуация.

M.A.Tarasov<sup>1</sup>, V.A.Yanovich<sup>2</sup>, P.V.Kopylov<sup>3</sup>, L.I.Ivanov<sup>4</sup>, N.V.Popov<sup>1</sup>, V.P.Toporkov<sup>1</sup>, V.V.Kutyrev<sup>1</sup>

## Epizootiological Surveillance of Zoonotic Disease Foci in case of Emergency Situation (Flood)

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Administration of Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare in the Jewish Autonomous Region, Birobidzhan, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Jewish Autonomous Region, Birobidzhan, Russian Federation; <sup>4</sup>Khabarovsk Plague Control Station, Khabarovsk, Russian Federation

Summarized are the data on epizootiological surveillance of the territories in Jewish autonomous region which were exposed to catastrophic flood in August-September, 2013. Estimated has been the abundance of small mammals – carriers of dangerous zoonotic diseases (HFRS, tularemia, leptospirosis, etc.). Validated has been effectiveness of deratization. Put forward is a range of novel ecological-epizootiological indicators characterizing rodent distribution in natural and anthropogenic biotopes with reference to the emergency situation.

**Key words:** zoonotic disease foci, hemorrhagic fever with renal syndrome, epizootic activity, epizootiological situation, epizootiological surveillance, catastrophic floods, emergency.

Для выяснения эпидемиологической обстановки по геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС), а также по другим опасным зоонозным инфекциям (туляремии, лептоспирозы и др.) обследовали территорию Еврейской автономной области (ЕАО), подвергшейся катастрофическому наводнению в августе–сентябре 2013 г. (выпала годовая норма осадков) как основы для проведения противоэпидемических мероприятий на участках высокого риска заражения. Другой важной задачей было оказание консультативно-методической и практической помощи службам санитарно-эпидемиологического надзора ЕАО в условиях масштабного стихийного бедствия.

На 01.01.2010 г. численность населения ЕАО составляла 185039 чел. С начала катастрофического наводнения (8–9.08.2013 г.) в Еврейской автономной области в 6 муниципальных образованиях всего подверглось подтоплению 28 населенных пунктов из 121 (23,1 %), 1541 жилой дом с населением 6006 чел., в том числе 1326 детей, 6924 приусадебных участка, 33066,5 га сельскохозяйственных земель, 17 социально значимых объектов (3 – культуры, 3 – образования, 11 учреждений здравоохранения), 1 скотомогильник, 5 кладбищ. По состоянию на 29.09.2013 г.

оставались подтопленными в 2 муниципальных образованиях 3 населенных пункта (17 жилых домов с населением 175 чел., из которых 32 ребенка, 152 приусадебных участка). В зоне подтопления находились 6800 га сельскохозяйственных земель. Подтоплен 1 скотомогильник вблизи с. Ленинское (Ленинский муниципальный район).

### Стратегия и тактика эпизоотологического обследования

Перед тем, как приступить к эпизоотологическому обследованию зоны наводнения и прилегающих районов, были выбраны, прежде всего, по эпидемиологическим показателям, населенные пункты с максимальной заболеваемостью ГЛПС и другими природно-очаговыми болезнями за последние 10 лет. На основе ГИС-технологий получены карты области и административных районов, разработан алгоритм действий, который предусматривал: составление календарного плана эпизоотологического обследования; установление жесткого временного графика ежедневных выездов; ежедневную запись погодных условий (температура воздуха утром, днем и вечером, атмосферное давление, влажность воздуха, осадки, скорость и направление ветра), выяснение режима

наводнения (динамика уровня воды в р. Амур, при-токах и на затопленных территориях), выявление объектов повышенного риска заражения населения (магазины, кафе, рынки, животноводческие фермы, зернотоки, хлебозаводы, пекарни, овощехранилища, лесхоз, пасеки, турбазы, лагеря отдыха и др.) опасными зоонозными инфекционными болезнями. Выясняли численность населения в поселках, количество домов, в том числе частных с приусадебными участками. В районах подтопленных населенных пунктов узнавали дату начала наводнения и спада воды, дату и высоту максимального уровня подъема воды, площадь затопления, количество затопленных домов, пострадавших людей, в том числе детей.

В зонах и на объектах риска описывали обследуемый объект – грызунопроницаемость, площадь, адрес, обрабатывался от грызунов или нет (выясняли количество обработанных и необработанных строений), уточняли дату последней обработки. В каждом населенном пункте выставляли не менее 100 плашек Геро, описывали прилегающие к населенному пункту и объекту обследования биотопы, проводили опрос владельцев объектов – есть ли грызуны или следы их жизнедеятельности (экскременты, погрызы, норы, запах), наблюдались ли миграции грызунов при подходе воды днем и ночью.

#### **Обследование открытых биотопов**

Используя крупномасштабные карты (1:100000), выбирали наиболее предпочитаемые грызунами местообитания (широколиственные леса с густым подлеском и высоким травостоем с обилием леспедецы даурской – *Lespedeza davurica*, луга и залежи с высоким плотным разнотравьем, бурьянники, берега водоемов, разнообразные агроценозы, прежде всего поля с соей, кукурузой, зерновыми культурами, бахчи и др.). Выставляли не менее 100 ловушек на расстоянии 1–2 км от населенного пункта. Обязательно находили участок, где зафиксирована граница максимального затопления. Для определения количества вытесненных водой грызунов выставляли линию из 50 плашек Геро через 5 м одна от другой параллельно границе затопления в 50 м от нее (линия А). Вторую линию из 50 орудий лова (Б) ставили в 300 м фронтально к линии А. Учет проводили в течение суток. Вычитая показатель численности грызунов на 100 ловушко-суток на линии Б от аналогичного на линии А, получали процент вытесненных водой мелких млекопитающих. Для дополнительного контроля в ряде случаев ставили еще 50 ловушек в биотопе такого же типа в 500 м от линии максимального затопления. Если показатель численности мелких млекопитающих на этой линии был меньше, чем на линии Б, констатировали факт вытеснения мелких млекопитающих водой на незатопленные территории.

В выбранных для обследования населенных пунктах составляли карту (схему) населенного пункта и выявляли объекты повышенного риска заражения населения опасными зоонозными инфекционными болезнями.

#### **Методы вычисления основных эколого-эпизоотологических показателей в зоне затопления и прилегающих районах**

Нами вычислялись следующие эколого-эпизоотологические показатели:

- интенсивный показатель заселенности грызунами объектов и зон риска заражения людей ГЛПС и другими зоонозными инфекциями в населенных пунктах ( $N$ ) определяли по формуле:  $N = n/S$ , где  $n$  – количество грызунов во всех обследованных объектах в населенном пункте;  $S$  – площадь всех обследованных объектов, в которых обнаружены грызуны. Градации показателя  $N$ : 1,0 и более – объекты плотно заселены грызунами (перенаселены); 0,9–0,5 – объекты умеренно заселены; менее 0,5 – минимально заселены.

- показатель интенсивности вселения (ПИВ) «диких» грызунов из природных биотопов и агроценозов в постройки человека (интенсивность миграций):  $ПВ = D/M \times 100 \%$ , где  $D$  – количество объектов с дикими грызунами;  $M$  – общее количество обследованных объектов.

- экстенсивный показатель степени заселения грызунами объектов в населенном пункте (ЭПЗ):  $ЭПЗ = H/M \times 100 \%$ , где  $H$  – количество объектов, заселенных грызунами;  $M$  – количество всех обследованных объектов.

Эффективность дератизационных мероприятий в населенных пунктах с наибольшим риском заражения людей ГЛПС и другими зоонозными болезнями ( $\mathcal{E}_{Ab}$ ) вычисляли по формуле Аббота<sup>1</sup>:

$\mathcal{E}_{Ab} = 100 \times [(n_1 - n_2) : n_1] \%$ , где  $\mathcal{E}_{Ab}$  – эффективность дератизации в %;  $n_1$  – количество грызунов на 100 ловушко-суток на необработанных территориях (объектах);  $n_2$  – тоже на обработанных территориях (объектах).

Показатель численности мелких млекопитающих (в %) определяли традиционно на 100 ловушко-суток.

#### **Результаты эпизоотологического обследования и оценка эффективности дератизационных мероприятий**

Работа проводилась с 14.09.2013 по 04.10.2013 г. В этот период была проведена оценка объемов, динамики выполнения и эффективности дезинфекционных и дератизационных мероприятий, выполненных службами МЧС РФ, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в ЕАО» Роспотребнадзора и ФГУП «Профилактика» в ЕАО, а также учеты численности мелких млекопитающих.

Эпизоотологическое обследование было начато нами 17.09.2013 г. и закончено 27.09.2013 г. Мелкие млекопитающие для исследования на ГЛПС и другие зоонозы были доставлены в ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора. Для анализа также использованы результаты эпизоотологического обследования и лабораторного ана-

<sup>1</sup>Рыльников В.А., редактор. Управление численностью проблемных биологических видов: Учебное пособие. Т. 3. Дератизация. М.: Институт пестменеджмента; 2011. 220 с.



лиза материала, собранного специалистами ФКУЗ «Иркутский НИПЧИ» Роспотребнадзора и ФКУЗ «Хабаровская ПЧС» Роспотребнадзора – в августе – первой декаде сентября 2013 г. было накоплено 1640 ловушко-суток, отловлено 673 экземпляра мелких млекопитающих 14 видов. Показатель численности составил 41,0 %. Доминирующим видом оказалась полевая мышь – *Apodemus agrarius* (индекс доминирования (ИД) – 64,2 %).

**Смидовичский район.** Накоплено 490 ловушко-суток, добыто 215 экз. мелких млекопитающих 9 видов (43,9 % попадания в орудия лова, что на 7,2 % выше среднееголетнего уровня). Доминировала полевая мышь (ИД – 42,8 %), численность которой составила 29,6 %, что на 10,8 % выше среднееголетнего показателя для этого периода года.

Антиген возбудителя ГЛПС обнаружен в 2 из 110 экз. грызунов (1,8 %), РНК хантавируса – в 2 из 61 экз. грызунов (3,3 %), антитела – в 5 из 149 экз. (3,4 %). ДНК лептоспир выявлена в 10 из 35 экз. (28,6 %). ПЦР-анализ показал два положительных результата из 98 на туляремию (2,0 %), в 5 из 164 экз. выявлены антитела к возбудителю туляремии (3,0 %). Исследовано 20 проб воды из открытых водоемов, в одной пробе обнаружены фрагменты ДНК тулярийного микроба (5,0 %).

**Биробиджанский район.** Отработано 375 ловушко-суток, добыто 185 грызунов 5 видов (49,3 % попадания, что на 20,4 % выше среднееголетнего уровня). Доминировала полевая мышь (ИД – 80,5 %), показатель численности – 39,7 %, что на 17,0 % выше среднееголетнего уровня. Выявлены антитела к возбудителю ГЛПС в 11 из 77 экз. (14,3 %). ДНК лептоспир выявлена в 19 из 24 экз. (79,2 %). В 7 из 81 экз. выявлены антитела к возбудителю туляремии (8,6 %).

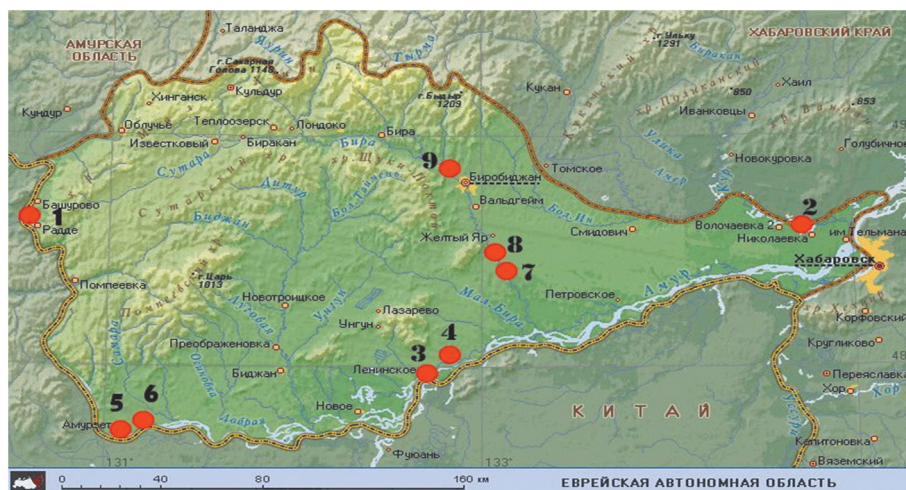
**Ленинский район.** Накоплено 400 ловушко-суток, добыто 248 грызунов 7 видов (61,8 % попадания, что на 42,6 % выше среднееголетнего показателя). Доминировала полевая мышь (ИД – 77,3 %) при численности 47,8 %, что выше среднееголетнего показателя на 33,3 %. РНК возбудителя ГЛПС обнаружена в 2 из 30 экз. грызунов (6,7 %), антитела – в 10 из 86 экз. (11,6 %). ДНК лептоспир выявлена в 4

из 24 экз. (29,2 %). В 4 из 89 экз. грызунов выявлены антитела к возбудителю туляремии (4,5 %).

**Облученский район.** Отработано 375 ловушко-суток, добыто 25 грызунов 6 видов (6,7 % попадания). Доминировала восточноазиатская лесная мышь – *A. peninsulae* (ИД – 32,0 %). РНК возбудителя ГЛПС обнаружена в 3 из 24 экз. грызунов (12,5 %), антитела – в 1 из 22 экз. (4,5 %). ДНК лептоспир выявлены в 2 из 24 экз. (8,3 %). В 1 из 25 экз. выявлены антитела к возбудителю туляремии (4,0 %).

Таким образом, при обследовании 4 районов ЕАО в августе–первой декаде сентября установлено, что в период наводнения в природных биотопах показатели численности мелких млекопитающих были высокими и очень высокими, что в сочетании с абсолютным доминированием полевой мыши – основного носителя хантавирусов, лептоспир, а также высоковосприимчивого и высокочувствительного к возбудителю туляремии грызуна – могло создать условия для развития эпизоотий и реальную угрозу эпидемиологических осложнений по этим инфекциям. Вместе с тем быстрый подъем воды с высокой скоростью затопления обширных территорий, особенно равнинных, с понижениями рельефа привел к массовой элиминации популяций мелких млекопитающих. В период с 17.09.13 по 27.09.2013 г. нами были обследованы все 5 районов ЕАО (рисунок): Облученский, пос. Пашково; Смидовичский, пос. Николаевка; Октябрьский, пос. Амурзет и окрестности, с. Пузино; Ленинский, пос. Ленинское и окрестности, с. Нижнеленинское; Биробиджанский, с. Дубовое и окрестности, с. Казанка; окрестности г. Биробиджан (район лесхоза). Обследование проводилось в соответствии с эпидемиологическими показателями по ГЛПС и другим зоонозам за 2004–2013 гг., а также за 1984 г. (было наводнение с подъемом воды до 6 метров над нулем графика, заболел ГЛПС 101 человек, 5 – умерли).

**Облученский район ЕАО, пос. Пашково** (за 2004–2012 гг. заболело ГЛПС 3 чел.). Поселок был полностью затоплен. Обследованы дома (объекты, зоны и контингенты риска) и пойменный лес в поселке. Общая площадь эпизоотологического обследования –



Районы эпизоотологического обследования территории ЕАО. 1–9 – точки и даты проведения учетов численности мелких млекопитающих:

1 – с. Пашково, 17–18.09.2013 г.; 2 – пос. Николаевка, 19–20.09.2013 г.; 3 – пос. Ленинское, 21–22.09.2013 г.; 4 – с. Нижнеленинское, 21–22.09.2013 г.; 5 – пос. Амурзет, 23–24.09.2013 г.; 6 – с. Пузино, 23–24.09.2013 г.; 7 – с. Дубовое, 25–26.09.2013 г.; 8 – с. Казанка, 25–26.09.2013 г.; 9 – окрестности г. Биробиджан, 26–27.09.2013 г.

350000 м<sup>2</sup>. Отработано 100 ловушко-суток в пос. Пашково, грызунов не оказалось как в дератизированных, так и в необработанных строениях, а также в открытом биотопе (пойменный лес). Обследовано на эффективность дератизации 1400 м<sup>2</sup>. Эффективность дератизации составила 100 %. В 1 км к северу от пос. Пашково на незатопленной территории отработано 100 ловушко-суток в дубраве на склоне сопки, добыта 1 полевая мышь (1 %).

*Смидовичский район, пос. Николаевка* (с 2004 по 2012 год заболело ГЛПС 3 чел.). Поселок был затоплен на 1/3. Обследовано 15 строений. Общая площадь эпизоотологического обследования – 2250000 м<sup>2</sup>. Отработано 100 ловушко-суток в пос. Николаевка. Добыто 4 экз. (3 домовые мыши (*Mus musculus*) и 1 джунгарский хомячок (*Phodopus sungorus*), вероятно, содержался у местных жителей в домашних условиях). Процент попадания – 4,0. Обследовано на эффективность дератизации 2594 м<sup>2</sup>. Эффективность дератизации не выяснена, дератизация была не закончена. На поле с соей в 1,5 км к юго-западу от пос. Николаевка отработано 100 ловушко-суток, добыто 24 полевые мыши. Процент попадания – 24,0.

*Ленинский район пос. Ленинское* (с 2004 по 2012 год заболело ГЛПС 6 чел.). Был затоплен на 1/3. Обследовано 8 строений. Общая площадь эпизоотологического обследования – 2250000 м<sup>2</sup>. Отработано 100 ловушко-суток. Добыто в необработанных строениях 10 мелких млекопитающих (домовых мышей – 5, полевых мышей – 4, серая крыса (*Rattus norvegicus*) – 1). Процент попадания – 10,0. Обследовано на эффективность дератизации 5300 м<sup>2</sup>. Эффективность дератизации – 100 %.

В открытых биотопах отработано 86 ловушко-суток, добыто 19 экз. мелких млекопитающих (серая крыса – 1, восточноазиатская мышь – 6, красная полевка (*Clethrionomys (Myodes) rutilus*) – 5, красно-серая полевка (*C.(M.) rufocanus*) – 4, барабинский хомячок (*Cricetulus barabensis*) – 2, средняя бурозубка (*Sorex caecutiens*) – 1). Процент попадания – 22,1. Интенсивность вселения «диких» грызунов из природных биотопов и агроценозов в постройки человека (интенсивность миграций) составила 12,5 % (21–22.09.2013 г.).

*Октябрьский район, пос. Амурзет* (с 2004 по 2013 год заболело ГЛПС 12 чел.). Был затоплен на 2/3 по окраинам. Обследовано 11 строений, 2 открытых биотопа в окрестностях пос. Амурзет. Общая площадь эпизоотологического обследования – 2250000 м<sup>2</sup>. В поселке отработано 100 ловушко-суток. Добыто 22 экз. мелких млекопитающих (домовых мышей – 6, полевых мышей – 12, красно-серых полевков – 1, серых крыс – 1, вид без определения – 1, большая полевка (*Microtus fortis*) – 1). Процент попадания – 22,0. Эффективность дератизации проверена на 6225 м<sup>2</sup> и составила 74,2 %.

В открытых биотопах отработано 100 ловушко-суток, добыто 48 экз. мелких млекопитающих (полевых мышей – 36, домовых мышей – 1, красно-серых

полевков – 3, серых крыс – 3, красная полевка – 1, восточноазиатская мышь – 4). Процент попадания – 48,0. Показатель интенсивности миграции грызунов в постройки (началась в ночь на 24.09.2013 г.) составил 27,3 %.

В 2004–2013 гг. заболевания ГЛПС на территории ЕАО регистрировали ежегодно. Вся территория области энзоотична по этой инфекции, так как повсеместно обитают основной (полевая мышь) и второстепенные виды носителей хантавирусов, среди которых постоянно выявляют инфицированных особей. Из 146 добытых нами и исследованных мелких млекопитающих, инфицированных хантавирусами, оказалось 12 (8,2 %), в том числе из 80 полевых мышей – 7 (8,8 %).

Доля населенных пунктов с высокой заболеваемостью ГЛПС в 3,9 раза превышает долю населенных пунктов с низкой заболеваемостью. Проведены учеты численности грызунов на территории 6 населенных пунктов, в прилегающих к ним природных, антропогенных биотопах и агроценозах (всего отработано 1100 ловушко-суток – 412 в населенных пунктах, 688 – в природных биотопах и агроценозах, в открытых биотопах было выставлено 16 ловушко-линий. В населенных пунктах обследовано 49 объектов (частные дома с подворьями, зернотоки, хлебокомбинаты, небольшие магазины, кафе и т.п.), общей площадью 16084 м<sup>2</sup>, в природных биотопах и агроценозах – 8 типов биотопов общей площадью 267475 м<sup>2</sup>. Добыто 216 мелких млекопитающих (средний процент попадания составил 19,6), в том числе в населенных пунктах – 46 экз. (11,2 %), в открытых биотопах – 170 экз. (24,7 %). В населенных пунктах отловлено 7 видов грызунов: полевых мышей – 23 экз. (ИД – 50,0 %), домовых мышей – 15 экз. (ИД – 32,6 %), серых крыс – 4 экз. (ИД – 8,7 %), прочих видов – 4 экз. (ИД – 8,7 %).

В природных биотопах добыто 9 видов мелких млекопитающих: полевых мышей – 107 экз. (ИД – 62,9 %), серых крыс – 31 экз. (ИД – 18,2 %), восточноазиатских мышей – 12 (ИД – 7,1 %), домовых мышей – 1 экз. (ИД – 0,6 %), красных полевков – 7 экз. (ИД – 4,1 %), красно-серых полевков – 6 экз. (ИД – 3,5 %), больших полевков – 2 экз. (ИД – 1,2 %), барабинских хомячков – 2 экз. (ИД – 1,2 %), средних бурозубок 2 экз. (ИД – 1,2 %).

Таким образом, по сравнению с данными за август–первую декаду сентября, к октябрю показатели численности мелких млекопитающих уменьшились, однако неизменным осталось доминирование полевой мыши – 64,2 % в августе–первой декаде сентября и 62,9 % – в третьей декаде сентября. При таких значениях ИД основного носителя хантавируса эпидемиологическая обстановка по ГЛПС к декабрю 2013 г. может стать напряженной, если инфицированность полевой мыши хантавирусом составит 12 % и выше, а их проникновение в населенные пункты и другие объекты осенью будет неограниченным в случае отсутствия барьерной дератизации.



Интенсивный показатель заселенности грызунами объектов и зон риска заражения людей ГЛПС и другими зоонозными инфекциями в населенных пунктах (*N*) составил в пос. Пашково Облученского района – 0; в пос. Ленинское Ленинского района – 0,003; в пос. Амурзет Октябрьского района – 0,006; в с. Дубовое Биробиджанского района – 0,003; в пос. Николаевка Сидовичского района – 0,008. Низкая заселенность объектов грызунами свидетельствует об отсутствии в период обследования интенсивных миграций грызунов из природных биотопов и агроценозов в населенные пункты. Опрос местных жителей показал, что массовых перемещений грызунов в период наводнения не наблюдалось ни днем, ни ночью.

Показатели интенсивности вселения «диких» грызунов из природных биотопов и агроценозов в постройки человека (интенсивность миграций) оказались следующими: пос. Пашково – 0 %; пос. Николаевка – 0 %; пос. Ленинское – 12,5 %; пос. Амурзет – 27,3 %; с. Дубовое – 0 %. Экстенсивные показатели степени заселения грызунами объектов в населенном пункте составили: пос. Пашково – 0 %; пос. Николаевка – 25 %, пос. Ленинское – 25 %; пос. Амурзет – 30 %; с. Дубовое – 14,3 %.

Мониторинг скотомогильников проводится ветеринарной службой. Результаты исследований проб на наличие сибирязвенной бациллы, проведенных Иркутским НИПЧИ на базе ФКУЗ «Хабаровская ПЧС» Роспотребнадзора, отрицательные.

Таким образом, в результате проведенного эпизоотологического обследования установлены 3 фактора, 2 природных и 1 антропогенный, определивших низкую численность грызунов в затопленных населенных пунктах: катастрофическое наводнение, с большой скоростью затопившее огромную территорию, особенно на равнине и понижениях рельефа, с элиминацией популяций мелких млекопитающих; отсутствие кормовой базы у грызунов в зоне затопления; интенсивная сплошная поселковая дератизация в освободившихся от затопления населенных пунктах. В настоящее время заражения людей ГЛПС наиболее вероятны в природных условиях (группы риска – рыбаки, охотники, работники лесного хозяйства, лесозаготовители, туристы и отдыхающие). Масштабного выдавливания мелких млекопитающих водой на незатопленные территории не отмечено, большинство популяций во время наводнения в связи с высокой скоростью горизонтального затопления погибло. Для обеспечения эпидемиологического благополучия необходим постоянный контроль численности грызунов и по показаниям повторение сплошной поселковой и барьерной дератизации.

Наибольшая численность носителей хантавирусов и других зоонозов зарегистрирована в широколиственных лесах (дубравах) с обилием в подлеске леспедецы даурской, высокотравных лугах и залежах, в агроценозах (соевые поля, огороды и др.). Сохраняется угроза эпидемических осложнений по туляремии с водным путем заражения. Обосновано

наличие антропоургических (агроценозы, огороды), природно-антропоургических (широколиственные леса – агроценозы) и природных (дубравы с хорошо развитым подлеском и плотными зарослями леспедецы даурской, высокотравные луга и залежи) мозаичных эндемичных очагов ГЛПС в зоне подтопления на территории ЕАО и на незатапливаемых территориях. Наиболее опасная эпидемиологическая ситуация возникает при тесном прилегании дубрав, агроценозов, высокотравных залежей к населенным пунктам.

В ближайшие полгода важнейший фактор риска заражения людей ГЛПС – мелкие млекопитающие, прежде всего, полевая мышь. Воздушно-пылевой путь передачи инфекции блокирован переувлажненностью как природных, так и антропогенных биотопов, но может реализоваться в период уборки сельскохозяйственных культур, прежде всего сои. Необходима система непрерывного мониторинга очагов ГЛПС с постоянной дератизацией в проблемных зонах риска заражения (агроценозы, склады продовольствия, зернотоки, хлебокомбинаты, пекарни, рынки, кафе, магазины и т.п.) с непрерывным функционированием точек долговременного отравления грызунов (ТДО). Крайне важно, кроме сплошной поселковой и барьерной дератизации, активно продолжать информационно-разъяснительную работу по радио и телевидению.

**Прогноз.** В ближайшее время наибольшая вероятность заражения людей ГЛПС будет связана с уборкой сои и других сельскохозяйственных культур. Группы риска – сельскохозяйственные рабочие, а тип заражения сельскохозяйственный. К контингентам риска следует отнести также рыбаков, охотников, других рекреантов, работников лесного хозяйства. Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют миграции носителей хантавирусов в населенные пункты и другие объекты.

#### Authors:

Tarasov M.A., Popov N.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Yanovich V.A. Administration of Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare in the Jewish Autonomous Region. 17, Sholom-Aleyhema St., Birobidzhan, 679016, Russian Federation. E-mail: zpp@79.rospotrebnadzor.ru

Kopylov P.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Jewish Autonomous Region. 17, Sholom-Aleyhema St., Birobidzhan, 679016, Russian Federation. E-mail: gigeid@mail.ru

Ivanov L.I. Khabarovsk Plague Control Station. 7, Sanitarny Lane. Khabarovsk, 680031, Russian Federation. E-mail: chum@chum.khv

#### Об авторах:

Тарасов М.А., Попов Н.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Янович В.А. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Еврейской автономной области, Российская Федерация, 679016, Биробиджан, ул. Шолом-Алейхема, 17. E-mail: zpp@79.rospotrebnadzor.ru

Копылов П.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Еврейской автономной области. Российская Федерация, 679016, Биробиджан, ул. Шолом-Алейхема, 17. E-mail: gigeid@mail.ru

Иванов Л.И. Хабаровская противочумная станция. Российская Федерация, 680031, Хабаровск, пер. Санитарный, 7. E-mail: chum@chum.khv

Поступила 25.11.13.



С.К.Удовиченко, А.В.Топорков, В.А.Сафронов, И.Г.Карнаухов, Н.В.Попов, В.П.Топорков, В.В.Кутырев

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ ПОДГОТОВКЕ И ПРОВЕДЕНИИ УНИВЕРСИАДЫ-2013 В КАЗАНИ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РИСКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ

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

В статье представлена методика комплексной оценки эпидемиологического риска (территория риска, время риска, контингенты риска, факторы риска) природно-очаговых инфекционных болезней, представляющих собой угрозу для санитарно-эпидемиологического благополучия населения при подготовке и проведении Универсиады-2013. Дана характеристика универсиады в Казани как массового спортивного мероприятия с характерным комплексом сопутствующих угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения. Проанализирована эпидемиологическая конъюнктура в регионе по актуальным инфекционным болезням, при этом природно-очаговые инфекционные болезни охарактеризованы с позиций эпидемиологического риска. На основании проведенной комплексной оценки с применением ГИС-технологий выполнена дифференциация территорий по степени потенциальной эпидемической опасности и предложен методический подход к неспецифической профилактике природно-очаговых инфекционных болезней. Изложены основы разработанного подхода, показано, что адекватный выбор ведущей внутренней угрозы и определение территорий риска, характера, объемов и сроков проведения профилактических мероприятий позволил обеспечить сохранение благополучной эпидемиологической обстановки во время Универсиады-2013.

**Ключевые слова:** природно-очаговые инфекционные болезни, комплексная оценка эпидемиологического риска, уровень потенциальной эпидемической опасности, профилактические мероприятия.

S.K.Udovichenko, A.V.Toporkov, V.A.Safronov, I.G.Karnaukhov, N.V.Popov, V.P.Toporkov, V.V.Kutyrev

## Improvement of the Preventive Measures for Managing Universiade-2013 Held in Kazan, Based on Comprehensive Evaluation of Epidemiological Risks as Regards Natural-Focal Infectious Diseases

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

Presented is the methodology for comprehensive evaluation of epidemiological risks (spatial and temporal characteristics, risk factors and cohorts) associated with natural-focal infectious diseases that pose a threat to sanitary-epidemiological welfare of the population within the frames of Universiade-2013. The event has been characterized from the viewpoint of mass gathering taking into consideration the complex of related threats to sanitary-epidemiological welfare of the population. Analyzed has been regional epidemiological situation on the currently important infections, whereas natural-focal infections have been assessed in reference to epidemiological risk. Based on the comprehensive evaluation with GIS software application differentiated have been the territories against the level of potential epidemiological hazard, put forward has been methodological approach to non-specific prophylaxis of natural-focal infectious diseases. Discussed have been the fundamentals of the approach, herewith it has been demonstrated that justified selection of internal threat and identification of spatial risk factors, as well as nature, scope and timing of the preventive measures ensure provision of favorable epidemiological situation as seen in the case of Universiade-2013.

**Key words:** natural-focal infectious diseases, comprehensive assessment of epidemiological risk, epidemiological hazard level, preventive measures.

С 6 по 17 июля 2013 г. в Казани проходила XXVII Всемирная летняя Универсиада – первое крупное международное спортивное мероприятие в истории современной России. Приоритетным направлением в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения во время Универсиады-2013 явилось проведение профилактических мероприятий. Выбор мер и средств предупреждения осложнений эпидемиологической обстановки осуществлялся, исходя из заблаговременной оценки эпидемиологических рисков и определения уровня потенциальной эпидемической опасности универсиады в Казани в отношении внешних и внутренних угроз для санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Цель данной работы – проведение комплексной оценки эпидемиологического риска по отношению

к природно-очаговым инфекционным болезням для повышения эффективности системы профилактических мероприятий при подготовке и проведении Универсиады-2013 в Казани.

### Материалы и методы

Для анализа использованы данные официальной статистики Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан и Центра гигиены и эпидемиологии по Республике Татарстан, персонифицированные сведения из первичных учетных форм (форма 058/у и форма № 060/у) за 5-летний период по зарегистрированным больным геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС). При обработке данных и проведении пространственного

анализа применялась географическая информационная система (ГИС) ArcGIS 10.1 в составе ArcMap, ArcCatalog и модуля расширения ArcGIS Spatial Analyst. Аналитическая платформа Deductor 5.3 использовалась для статистической обработки и интеллектуальных методов анализа и моделирования.

### Результаты и обсуждение

Территория Республики Татарстан является эндемичной по ряду природно-очаговых инфекционных болезней, представляющих собой внутренние угрозы для санитарно-эпидемиологического благополучия участников и гостей Универсиады-2013: геморрагической лихорадке с почечным синдромом, клещевому энцефалиту, клещевому боррелиозу, лихорадке Западного Нила, лептоспирозу и др. Для определения ведущих внутренних угроз нами был проведен ретроспективный анализ эпидемиологической обстановки в Республике Татарстан по природно-очаговым инфекционным болезням за 2007–2012 гг., который показал, что за указанный период зарегистрировано 4192 случая ГЛПС, 327 – клещевого боррелиоза, 23 – бруцеллеза, 17 – клещевого вирусного энцефалита, 7 – ЛЗН, 2 – лептоспироза [4]. Как следует из представленных данных, ведущее место в структуре заболеваемости природно-очаговыми инфекционными болезнями занимает ГЛПС (91 %).

### ГЛПС

*Территория риска.* На сегодняшний день случаи заболевания ГЛПС регистрируются практически по всей территории Республики Татарстан. Свободными от ГЛПС являются 5 районов из 43: Верхнеуслонский, Кайбицкий, Мензелинский, Апастовский и Дрожжановский. Наиболее активные природные очаги ГЛПС расположены в Альметьевском, Лениногорском, Бавлинском, Нижнекамском, Заинском, Бугульминском, Тукаевском и Чисто-

польском районах. Территории высокого риска заражения ГЛПС расположены и в месте проведения Универсиады-2013 – Казани (зеленая зона, туристские маршруты, природные биотопы, примыкающие к спортивным объектам и объектам проживания участников и гостей). Пространственный анализ случаев ГЛПС на территории региона выявил неоднородное распределение интенсивности заболеваемости (рис. 1).

*Время риска.* Официальная регистрация случаев заболевания ГЛПС в Татарстане проводится с 1959 г. Абсолютное число заболевших ГЛПС в Республике Татарстан с 1980 по 2012 год составляет 21471. Показатель заболеваемости на 100 тыс. населения колебался от 3,7 в 1981 г. (минимальное значение) до 64,4 в 1997 г. (максимальное), составляя в среднем 17,4, что в 3,8 раза выше, чем в целом по России (4,6), и аналогично показателю заболеваемости в ПФО (17,2). Эпидемические проявления ГЛПС носят волнообразный характер: подъемы уровня заболеваемости отмечаются каждые три–четыре года. В последние годы отмечается тенденция к росту заболеваемости.

Заболеваемость ГЛПС регистрируется в течение всего года. При анализе многолетней динамики отмечается два типа сезонности: весенне-летняя и осенне-зимняя. Подъем заболеваемости начинается в мае, наибольшее количество случаев регистрируется в июле и ноябре в целом по Республике Татарстан, при этом в Казани максимальное число больных отмечается в августе. При анализе распределения случаев заболевания по месяцам (с 2006 по 2011 год) установлено, что для 2006, 2009 и 2010 гг. характерен преимущественно весенне-летний тип сезонности с пиком в июне–июле, а для 2007, 2008 и 2011 гг. – осенне-зимний тип с пиком в октябре–ноябре. Социально-демографические показатели (средний возраст больных, соотношение мужчин и женщин) для лет с осенне-зимней сезонностью не отличались от аналогичных для лет с весенне-летним типом.

Наличие двух пиков динамики заболеваемости, по всей видимости, связано с большим контактом

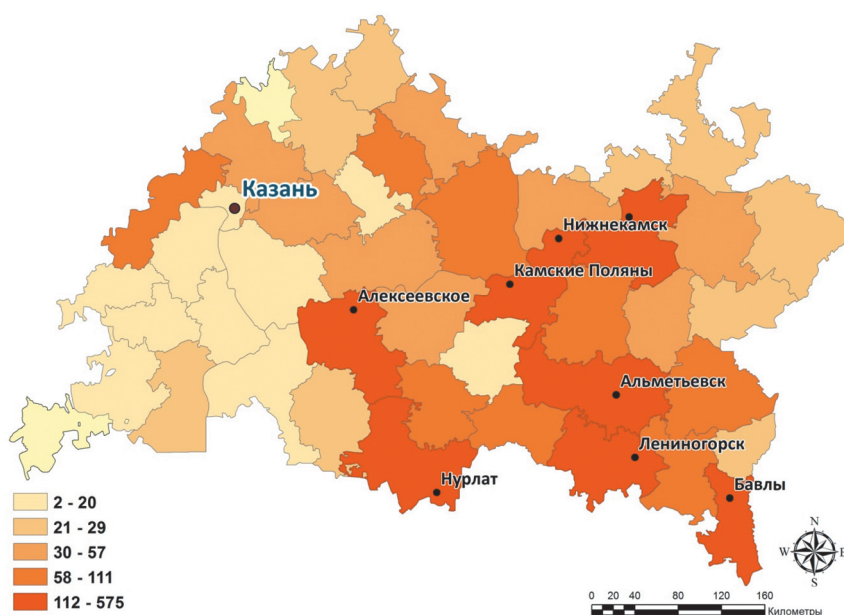


Рис. 1. Распределение случаев заболевания ГЛПС на территории Республики Татарстан с 2006 по 2012 год

населения с источником инфекции вследствие случайных посещений леса в летнее время и с миграцией грызунов в жилище человека поздней осенью. Выяснение причин смены типа сезонности требует дальнейшего исследования.

**Факторы риска.** Как известно, заражение человека осуществляется посредством контакта с носителями ГЛПС – мелкими грызунами (в природных очагах – рыжая полевка, малая лесная мышь, желтогорлая мышь, в природно-антропоургических – рыжая полевка, желтогорлая мышь, лесная мышь, домовая мышь, в антропоургических – домовая мышь), с их выделениями (моча, фекалии, слюна), объектами окружающей среды, контаминированными выделениями грызунов, а также при вдыхании воздуха и частиц пыли, содержащих хантавирусы. Возможен фекально-оральный механизм заражения [2].

В условиях проведения массовых мероприятий наибольшее значение имеют антропоургические очаги, при этом спортивные объекты зачастую располагаются в непосредственной близости от лесопарковых зон, а в ряде случаев вне городской черты на границе лесных массивов. Кроме того, увеличение посещения туристских маршрутов, сопровождающее массовое мероприятие, повышает риск заражения ГЛПС лесного типа.

**Контингентом риска** является местное население, проживающее на эндемичных территориях (в частных домах, расположенных вблизи лесопарковой зоны города, на его окраине или в сельской местности) и контактирующее с факторами риска (посещение леса, уборка на садовых и дачных участках). Во время проведения Универсиады-2013 риску заражения подвержены и международные путешественники, посещающие зоны рекреации, места туристских маршрутов и спортивные объекты.

Анализ данных по заболеваемости различных половозрастных групп населения Республики Татарстан показал, что случаи заболевания ГЛПС регистрировались в возрасте от 3 до 78 лет, средний возраст больных составил 36,5 лет. Наименее подвержены риску заражения ГЛПС дети в возрасте до 14 лет (1,3 %), а также возрастная группа 60 лет и старше (3,8 %). Чаще болеет активное, трудоспособное население: на возрастную группу 20–29 лет приходится 26,1 %, на 30–39 лет – 24,6 % и 40–49 лет – 25,1 %. Больные в возрасте 50–59 лет составляли 12,5 %. Заболеваемость среди мужчин составляет 86,1 %, среди женщин – 13,9 %.

Таким образом, среди местного населения наиболее подвержены риску заражения ГЛПС мужчины в возрасте от 20 до 50 лет, что связано как с их профессиональной деятельностью, так и более частым пребыванием на природе с промысловой и хозяйственной целями. Следует отметить, что возрастная структура гостей и участников Универсиады-2013 полностью укладывается в указанный возрастной диапазон, что подчеркивает опасность вовлечения данного контингента риска в эпидемический процесс ГЛПС.

Характеризуя ГЛПС в Республике Татарстан, на основе комплексного анализа можно констати-

ровать, что данная инфекционная болезнь является одной из наиболее вероятных причин осложнения эпидемиологической обстановки при проведении Универсиады-2013 что требует адресного усиления дератизационных мероприятий на обозначенных территориях риска.

## ЛЗН

В 2011 г. на территории Республики Татарстан впервые зарегистрированы случаи заболевания ЛЗН, что требует рассмотрения данной инфекционной болезни с позиций эпидемиологического риска.

**Территория риска.** Формирование местных очагов было обусловлено рядом предпосылок: многоводность региона (наличие анофелогенных озер, бассейнов больших и многочисленных малых рек, создание четырех крупных водохранилищ); обитание на территории полициклических видов комаров, подъем численности которых особенно заметен в акваториях равнинных водохранилищ; увеличение среднесуточных температур воздуха; наличие путей миграции и мест гнездования колониальных околотовных видов птиц, обеспечивающих занос вируса с африканского континента.

Обращает на себя внимание тот факт, что ряд спортивных объектов располагается вблизи анофелогенных водоемов. В частности Дворец водных видов спорта, вмещающий 3500 зрителей, находится на берегу озера Кабан, прибрежная зона которого является местом выплода комаров.

**Время риска.** В Республике Татарстан отмечается спорадическая заболеваемость лихорадкой Западного Нила. За период с 2011 по 2012 год выявлено 7 случаев заболевания. Все случаи зарегистрированы в Казани. Показатель заболеваемости составил 0,08 на 100 тыс. населения, что ниже аналогичного по Российской Федерации (0,32) и ПФО (0,1). В регионе все случаи заболевания зарегистрированы в июле–августе.

Таким образом, сезонность ЛЗН в Республике Татарстан совпадает со временем проведения универсиады и типична для проявлений ЛЗН в других регионах Российской Федерации.

**Факторы риска.** Природным резервуаром ЛЗН являются птицы водного, околотовного (чайки, цапли, утки и др.) и синантропного (грачи, вороны и др.) комплексов. Заражение человека осуществляется вследствие контакта с комарами рода *Culex*, отдельными представителями рода *Aedes*. Оптимальными температурами окружающей среды для размножения и накопления возбудителя в переносчиках является диапазон 20–25 °С. Развитие популяции носителей в целом при высоких температурах (выше 27 °С) может заканчиваться за 10 дней, затягиваясь до 45 дней при 15 °С [1]. За последние 3 года метеонаблюдений по Казани отмечается тенденция повышения средней температуры летом, что создает благоприятные условия для включения местных популяций комаров в циркуляцию вируса.



*Контингенты риска* – местное население, проживающее на эндемичных территориях и международные путешественники, которые вовлекаются в контакт с переносчиками.

### Клещевой боррелиоз

В Республике Татарстан регистрируются две зоологические формы клещевых инфекций: клещевой вирусный энцефалит и клещевой боррелиоз.

*Территория риска.* Эндемичными по клещевому боррелиозу являются 17 районов Республики Татарстан, в том числе и Казань [3].

*Время риска.* За период с 1992 (с момента начала регистрации инфекции) по 2012 год выявлено 1362 случая заболевания. Наибольшее число зарегистрировано в 1996 г. (124), наименьшее – в 1992 г. (4). Показатель заболеваемости составил 1,75 на 100 тыс. населения, что в 2,8 раза ниже, чем в Российской Федерации (4,9) и 3,4 раза ниже, чем в ПФО (5,9). Отмечается тенденция к снижению заболеваемости клещевым боррелиозом: в 2010 г. зарегистрировано 63 случая, показатель заболеваемости составил 1,65 на 100 тыс. населения, в 2011 г. – 52 случая, показатель – 1,35, в 2012 г. – 41 случай, показатель – 1,05 (снижение заболеваемости по сравнению с 2011 г. на 22,2 %). Сезонная динамика заболеваемости клещевым боррелиозом в Казани представляет собой двухвершинную кривую с подъемами в июле и октябре. На летние и осенние месяцы приходится 76 % случаев заболеваний.

*Факторы риска.* Заражение человека осуществляется вследствие контакта с клещами *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus* и *Dermacentor reticulatus*. Дополнительным фактором риска осложнения эпидемиологической ситуации является посещение туристских маршрутов, располагающихся на эндемичных территориях.

*Контингенты риска.* Местное население и международные путешественники, контактирующие с факторами риска.

### Клещевой вирусный энцефалит

*Территория риска.* Эндемичными по клещевому вирусному энцефалиту являются 26 районов республики, в том числе и Казань.

*Время риска.* За период с 1980 по 2012 год зарегистрировано 840 случаев клещевого вирусного энцефалита. Случаи заболевания в регионе выявлялись ежегодно, кроме 2006 г. Среднегодовой показатель заболеваемости за указанный период времени среди населения республики составил 0,71 на 100 тыс. населения, что в 4,5 раза ниже показателя по Российской Федерации (3,2 на 100 тыс. населения) и ПФО. Случаи заболевания клещевым вирусным энцефалитом в Казани регистрируются с июня по октябрь, максимальное их число приходится на август, что обусловлено высокой миграционной активностью переносчиков. В последние годы отмечена

отчетливая тенденция к снижению заболеваемости, регистрируются единичные, в основном завозные случаи.

*Факторы риска.* Заражение человека осуществляется вследствие контакта с клещами *I. persulcatus*, *I. ricinus* и *D. reticulatus*.

*Контингенты риска.* Местное население, проживающее на эндемичных территориях, и международные путешественники, контактирующие с факторами риска.

Что касается других природно-очаговых инфекционных болезней, то некоторые из них не регистрируются в Республике Татарстан в течение последних лет: случаи бешенства у людей (с 2005 г.), туляремия (с 1995 г.), псевдотуберкулез (с 2007 г.), лихорадка Ку (с 1983 г.). Отмечается отчетливая тенденция к снижению заболеваемости лептоспирозом с регистрацией единичных случаев (последний случай заболевания выявлен в 2010 г.).

Таким образом, приведена оценка рисков осложнения эпидемиологической обстановки по эндемичным для Республики Татарстан инфекционным болезням – ГЛПС, клещевому боррелиозу, клещевому вирусному энцефалиту, ЛЗН. Основным критерием оценки был принят показатель заболеваемости в сезон проведения Универсиады-2013 и совпадение территории риска с местом проведения массового мероприятия.

В качестве дополнительных критериев оценки выступали: влияние абиотических факторов внешней среды (температура, влажность, осадки), численность переносчиков и теплокровных носителей, а также размножение в них возбудителей инфекционных болезней (таблица). Кроме того, учитывалось соответствие социально-демографических профилей гостей Универсиады-2013 и местных больных природно-очаговыми болезнями.

Установлено, что по указанным критериям ведущей внутренней угрозой для санитарно-эпидемиологического благополучия населения при проведении Универсиады-2013 является ГЛПС, что обусловлено совпадением времени максимального риска заражения ГЛПС и времени проведения универсиады, наличием территорий высокого риска заражения ГЛПС в местах проведения Универсиады-2013 – Казань и др.

В период проведения Универсиады-2013 сохранялась вероятность возникновения единичных случаев заболевания ЛЗН при условии оптимальных для накопления и размножения возбудителя в переносчиках температур окружающей среды. Также были возможны спорадические случаи заболевания клещевыми инфекциями, прежде всего клещевым боррелиозом.

С учетом характера ведущей выявленной угрозы (ГЛПС), и ее тесной связи с ареалом обитания мышевидных грызунов, нами проведена дифференциация территорий по уровню эпидемиологического риска. С этой целью выполнено эпидемиологическое районирование по четырем степеням выраженности риска

| Экспертная оценка эпидемиологического риска осложнения эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекционным болезням в Республике Татарстан |        |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----|-----|----|---|----|-----|------|----|---|----|-----|
| Название инфекционной болезни                                                                                                                          | Месяцы |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |
|                                                                                                                                                        | I      | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
| ГЛПС                                                                                                                                                   |        |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |
| Клещевой энцефалит                                                                                                                                     |        |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |
| Клещевой боррелиоз                                                                                                                                     |        |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |
| ЛЗН                                                                                                                                                    |        |    |     |    |   |    |     |      |    |   |    |     |

Примечание.  – высокий риск,  – средний риск,  – низкий риск.

вовлечения в эпидемический процесс ГЛПС (высокая, средняя, низкая и очень низкая). Пространственный анализ учитывал как ландшафтную принадлежность территории, так и наличие мест отдыха, близость к жилым и спортивным объектам Универсиады-2013 (рис. 2).

К первой группе территорий, характеризующихся высокой потенциальной эпидемической опасностью, отнесены все ландшафтные варианты эпидемически активных сочетанных очагов антропоургического типа и лесные равнинные сочетанные природно-антропоургические очаги, расположенные в зонах рекреации и в периферийной части Казани. К группе очаговых территорий со средней потенциальной эпидемической опасностью отнесены различные ландшафтные варианты сочетанных очагов природно-антропоургического типа, которые сформировались на стыке антропогенного и лесного ландшафтов, в ближайших окрестностях Казани в поймах рек. В группу очаговых территорий, характеризующихся низким уровнем потенциальной эпидемической опасности, включены различные ландшафтные варианты сочетанных лесных природных очагов, сформировавшихся на стыке равнинного ландшафта по границе пойменных лесов. К группе очаговых территорий, характеризующихся очень низкой степенью потенциальной эпидемической опасности, отнесены ландшафтные варианты сочетанных лесных очагов природного типа, приуроченных к стыкам лесных и

лесостепных ландшафтов.

На основе полученных данных, посредством дифференциации территорий по степени эпидемической опасности были выбраны участки, подлежащие заблаговременной оценке эпизоотологического состояния и эпидемического потенциала.

В первую очередь эпизоотологическое обследование было сосредоточено на территориях, характеризующихся высокой степенью потенциальной эпидемической опасности (зеленая зона Казани, природные биотопы, прилегающие к объектам проведения мероприятий Универсиады-2013, а также территории популярных туристских маршрутов, которые могли быть местом отдыха и концентрации гостей и участников, равно как и других временных контингентов населения).

Полученные результаты экстраполировались на всю территорию, где имело место общность структурной и пространственной функциональной организации паразитарной системы природных и природно-антропоургических очагов опасных инфекционных болезней различной природы.

Результаты полевых и лабораторных исследований, выполненных в заранее намеченных точках, подтвердили, что в период проведения Универсиады-2013 наиболее высокую эпидемическую опасность будут представлять мелкие млекопитающие – носители ГЛПС, обитающие в лесопарковых насаждениях Казани, расположенных в непосредственной бли-

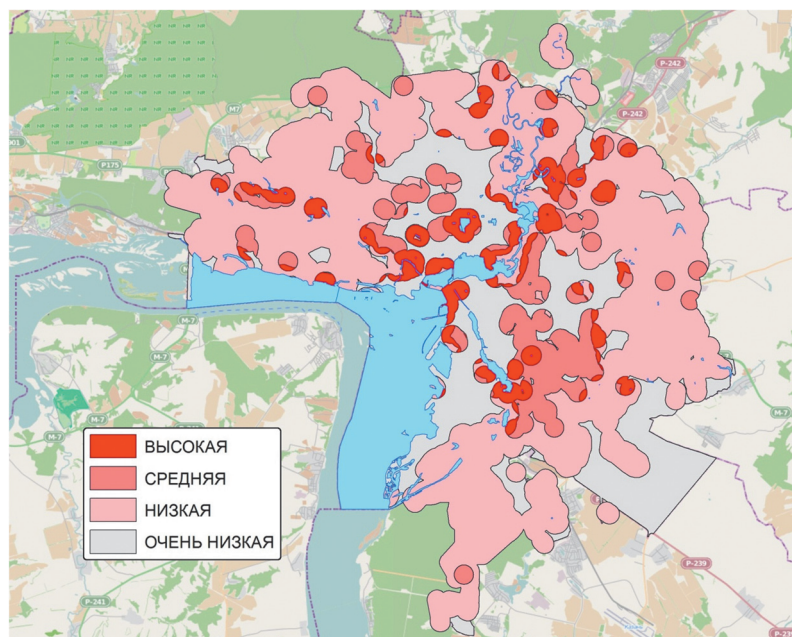


Рис. 2. Дифференциация территории проведения Универсиады-2013 по уровню потенциальной эпидемической опасности

зости от жилых домов и популярных мест отдыха горожан. Общая средняя численность грызунов варьировала в пределах средних многолетних значений или несколько выше, составляя 15–25 % попадания в орудия лова. Вирусом ГЛПС было инфицировано 8 % мелких млекопитающих.

Выявление высокой численности грызунов на таких территориях послужило показанием для целенаправленного проведения истребительных мероприятий. На всех потенциально опасных в эпидемиологическом отношении участках в июне 2013 г. были выполнены комплексные профилактические мероприятия (дератизация, дезинсекция и дезинфекция).

Неспецифическая профилактика опасных зоонозных инфекционных болезней в условиях проведения Универсиады-2013 отличалась от обычных штатных ситуаций прежде всего привлечением большего количества специалистов и материальных средств, а также необходимостью проведения этой работы в максимально сжатые сроки. Проведение профилактических мероприятий регламентировалось методическими рекомендациями МР 3.5.0071-13 «Организация и проведение дезинфекционных мероприятий на различных объектах в период подготовки и проведения массовых мероприятий».

Объемы профилактических обработок территорий с учетом использования их как мест проживания участников и гостей, расположения туристских маршрутов и мест проведения массовых культурных мероприятий были скорректированы в соответствии с результатами эпизоотологического обследования.

На всей территории зоны проведения массовых мероприятий была проведена выборочная, очаговая (по эпидемиологическим показаниям) и барьерная дератизация. Для уничтожения грызунов применяли зерновые, контейнерные (капсулированные) приманки, гранулированные, парафинированные приманки на основе антикоагулянтов 1 и 2 поколений. Использовали также физические средства – клейкие ловушки, давилки «Геро», отпугивающие устройства типа охранно-защитных дератизационных систем. Итоговая площадь дератизации составила 902,3 га, из них 68 % пришлось на Казань. Противоклещевые обработки проводились на площади 635,6 га, в том числе по Казани – 50 %, противокмаринные обработки – 582,3 га (70 % по Казани).

В структуре профилактических мероприятий в природных очагах опасных инфекционных болезней, расположенных в зоне проведения массовых мероприятий, значимое место отводило проведению санитарно-гигиенических, санитарно-технических, агро- и лесотехнических мероприятий, направленных на уничтожение и создание неблагоприятных условий жизни для грызунов и кровососущих членистоногих.

Контроль эффективности проводимых мероприятий осуществлялся непосредственно во время Универсиады-2013 (июль) путем осмотра контрольных точек и проведения эпизоотологического мониторинга. Для определения качества дератизационных мероприятий в контрольных точках было расстав-

лено 800 ловушек. При этом общая эффективность дератизации составила 97 %, что соответствовало запланированному уровню и обеспечило высокий противоэпидемический эффект.

Следует отметить, что на фоне адресного и упреждающего характера профилактических мероприятий случаев заражения опасными природно-очаговыми инфекционными болезнями среди участников и гостей Универсиады-2013 не зарегистрировано.

Таким образом, ведущей внутренней угрозой прошедшей Универсиады-2013 в Казани, согласно предложенной методике, являлась ГЛПС, а упреждающий характер и сосредоточение большого объема профилактических мероприятий нацеленных на ведущую внутреннюю угрозу, показал высокую эффективность, что подтверждается отсутствием заболеваемости среди участников и гостей Универсиады-2013. Предложенная и апробированная методика комплексной оценки эпидемиологического риска по отношению к природно-очаговым инфекционным болезням, представляющим собой внутренние угрозы для санитарно-эпидемиологического благополучия населения при подготовке и проведении Универсиады-2013 в Казани, может быть использована при разработке комплекса профилактических мероприятий, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения при проведении XXII Олимпийских игр и XI Паралимпийских зимних игр в 2014 г. в Сочи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заречная С.Н. Избранные лекции по медицинской энтомологии. Учебное пособие. М.; 2010. 168 с.
2. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К., Коротина Н.А. Актуальные проблемы современного этапа изучения ГЛПС в России. *Дез. дело.* 2007; 4:26–33.
3. Трифонов В.А., Бойко В.А., Потапов В.С., Фассахов Р.С., Кутыркин А.В. Основные эпидемиологические закономерности заболеваемости некоторыми природно-очаговыми инфекциями в Республике Татарстан. *Дез. дело.* 2009; 3:39–42.
4. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Сафронов В.А., Кедрова О.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:26–32.

#### References

1. Zarechnaya S.N. [Selected Lecture Materials on Medical Entomology. Training aids]. M.: 2010. 168 p.
2. Tkachenko E.A., Bernshtein A.D., Dzagurova T.K., Korotina N.A. [Pressing issues of HFRS in Russia in the modern period]. *Dez. Delo.* 2007; 4:26–33.
3. Trifonov V.A., Boyko V.A., Potapov V.S., Fassakhov R.S., Kutyarkin A.V. [Core epidemiological regularities as regards morbidity rate for some natural-focal infections in the Republic of Tatarstan]. *Dez. Delo.* 2009; 3:39–42.
4. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Safronov V.A., Kedrova O.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. [Evaluation of external and internal threats to sanitary-epidemiological welfare of the population in the context of mass sporting events]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2: 26–32.

#### Authors:

Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Safronov V.A., Karnaukhov I.G., Popov N.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Удовиченко С.К., Топорков А.В., Сафронов В.А., Карнаухов И.Г., Попов Н.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 25.10.13.



УДК 616.932(471.61)

Л.В.Григоренко, В.Д.Кругликов, А.Б.Мазрухо, И.В.Архангельская, Д.А.Зубкова, Н.Б.Непомнящая, И.С.Шестиалтынова

# **ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ НЕ O1/НЕ O139, ВЫДЕЛЕННЫЕ В ХОДЕ МОНИТОРИНГА ВОДОЕМОВ И СТОКОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ С 2009 ПО 2011 ГОД**

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

Изучены биологические свойства холерных вибрионов не O1/не O139, циркулирующих в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год. Подавляющее большинство изолятов были типичны по фенотипу. Из 280 штаммов у 90 выделенных штаммов (21 %) выявлена атипичность по агглютинабельности в реакции слайд-агглютинации на стекле и в развернутой РА с холерными диагностическими сыворотками. Даны рекомендации по дифференциации *V. cholerae* non O1/ non O139 от *V. cholerae* O1 и O139. Установлены доминирующие серогруппы (O16, O53, O76 и O67), которые за указанный период не менялись. Определена вариабельность генотипов штаммов и низкая вероятность проявления вирулентности. Показана нецелесообразность проведения сплошного гено- и серологического типирования водных штаммов.

**Ключевые слова:** холерные вибрионы не O1/не O139, фенотип, агглютинабельность, атипичность, серогруппы, генотип.

L.V.Grigorenko, V.D.Kruglikov, A.B.Mazrukho, I.V.Arkhangel'skaya, D.A.Zubkova, N.B.Nepomnyashchaya, I.S.Shestialtynova

## **Cholera Vibrios non-O1/non-O139 Isolated in the Process of Epidemiological Monitoring over Rostov-on-Don Water Basins and Drain Sewage System within the Period of 2009–2011**

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

Studied have been biological properties of cholera vibrios non-O1/non-O139 circulating in the Rostov-on-Don surface waters and drain sewage system within the period of 2009–2011. Overwhelming majority of the isolates have been classified as typical ones in terms of their phenotype. However 90 strains (21 %) out of total 280 have been identified as atypical ones against agglutinability in the slide-agglutination and full-scale agglutination reaction to diagnostic cholera sera. Put forward are recommendations on performance of the differentiation between *V. cholerae* non-O1/non-O139 and *V. cholerae* O1/O139. Specified are predominant serogroups of the strains which turned to be unchanged within the stated period (O16, O53, O76, and O67). Revealed is the strain genotype variability and low probability of virulence manifestations. Demonstrated is the futility of the blind gene- and serological typing of aquatic strains.

**Key words:** cholera vibrios non-O1/nonO139, phenotype, agglutinability, typicality, serogroup, genotype.

Со времени установления того, что *Vibrio cholerae* O139 серогруппы («Бенгал») являются новым вариантом возбудителя холеры, внимание многих исследователей усилилось к изучению холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп [5].

Известно, что представители этой группы микроорганизмов могут стать причиной острых кишечных инфекций, не имеющих тенденции к эпидемическому распространению. В процессе проведения мониторинга за холерой на территории Российской Федерации холерные вибрионы не O1/не O139 серогруппы в подавляющем большинстве обнаруживаются в водных объектах окружающей среды, а также имеют место случаи выделения штаммов от больных, носителей и контактных лиц. В период 2003–2008 гг. нами осуществлялось предметное изучение штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139, которые выделялись из водных объектов Ростова-на-Дону [4].

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение биологических свойств холерных вибрионов не O1/не O139, циркулирующих в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год.

Объектами исследования являлись штаммы холерных вибрионов не O1/не O139, обнаруженных с 2009 по 2011 год в пробах воды из стационарных точек, закрепленных за Ростовским-на-Дону противочумным институтом.

Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07. Дифференциацию водных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139 проводили с помощью моноклональных антител в реакции слайд-агглютинации [2] и иммунохроматографического теста для выявления холерных вибрионов O1, представленного Государственным научным цен-

тром прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболонск). Серологическую принадлежность устанавливали с помощью реакции слайд-агглютинации, с использованием набора сывороток диагностических холерных не O1/не O139 серогрупп моноспецифических кроличьих сухих против типовых штаммов 80 серогрупп, разработанных в РостНИПЧИ [1].

Штаммы *V. cholerae* non O1/non O139 были исследованы в ПЦР с использованием специфических праймеров для детекции 24 нуклеотидных последовательностей генов, связанных с патогенностью *V. cholerae* [6].

В ходе мониторинга за наличием холерных вибрионов в поверхностных водоемах и хозяйственно-бытовых стоках Ростова-на-Дону в период 2009–2011 гг. было выделено 280 штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп.

Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп свидетельствовал о некотором количественном увеличении изолированных штаммов в 2009 г. (91 штамм) и о снижении их числа в 2011 г. (63 штамма). При сравнении с данными, полученными в 2003–2008 гг., выявилась тенденция уменьшения количества выделяемых водных штаммов *V. cholerae* non O1/non O139. Наибольшее количество штаммов в изучаемый период было обнаружено в пробах из рек Дон и Темерник, в июле и августе месяцев, что соответствовало сезонности выделения этих микроорганизмов в предшествующие пять лет [4].

Большинство из изолированных штаммов обладали типичными для рода *Vibrio* и вида *V. cholerae* морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами. Вместе с тем среди изученных было обнаружено 90 (21 %) штаммов, атипичных по признаку агглютинабельности.

У 161 (57,5 %) штамма была установлена принадлежность к определенной серологической группе. При сравнительном анализе полученных результатов серологической идентификации с данными 2003–2008 гг. были отмечены незначительные изменения в составе доминирующих серогрупп вибрионов, циркулирующих в воде поверхностных водоемов в Ростова-на-Дону, и если в вышеуказанный период среди штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 преобладали представители O53, O67, O75, O76 серогрупп, то среди штаммов, выделенных в период с 2009 по 2011 год, повторялись штаммы O53, O67, O76 серогрупп, а также встречались вибрионы O2, O8, O16, O65 серогрупп. Остальные серогруппы были представлены единичными штаммами. Следовательно, за изучаемый период не отмечено резкой смены серологического пейзажа, по сравнению с предшествующим временем.

Все штаммы были атоксигенными (в ПЦР не содержали генов *ctxA* и *tcpA*). Расширенную генотипическую характеристику определяли у 120 водных штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* не O1/не O139, отобранных методом репрезентативной вы-

борки. У всех изученных штаммов отсутствовали гены профагов CTX, pre-CTX и RS1, острова патогенности VPI, гены термостабильного и шигаподобного токсина, гемолизина *V. parahaemolyticus*, но выявлены гены *hapA*, *cef*, *toxR*. У исследуемых штаммов были также обнаружены в различных сочетаниях гены, ассоциированные с другими факторами патогенности: *rtx*, гены VPI-2, *mshA*. Вместе с тем штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп отличались от таковых O1 серогруппы меньшими наборами перечисленных генов, что свидетельствовало в пользу более низкой, но возможной вероятности проявления ими вирулентности. В то же время ни один из штаммов не O1/не O139 не имел генотипа, совпадающего с таковым одного из представителей O1 серогруппы [4]. Несмотря на малое количество генов, детерминирующих дополнительные факторы патогенности холерных вибрионов, штаммы *V. cholerae* не O1/не O139, с нашей точки зрения, могут рассматриваться как резервуар генов патогенности холерных вибрионов. В этой связи, в случае возникновения спорадического заболевания или вспышки, вызванных этими микроорганизмами, целесообразно проводить серо- и генотипическое типирование штаммов, выделенных возбудителей, а также штаммов из объектов окружающей среды в очагах. Кроме того, необходимо отметить, что штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенные нами из водных объектов и относящиеся к одной серологической группе, имели разные генотипы.

В ходе нашего исследования было выделено 90 атипичных по агглютинабельности штаммов, и их свойства были изучены в динамике. В 2010 г. среди 81 выделенного штамма холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп были отмечены 40 штаммов (49,4 %), дававших положительный результат в реакции слайд-агглютинации на стекле с диагностической O1 холерной сывороткой, свечение в МФА на 1–2 креста, а у 12 штаммов из них была выявлена агглютинабельность и в развернутой реакции агглютинации с O1 холерной и типоспецифическими сыворотками в различных титрах. Было отмечено, что из одной и той же точки (и даже из одной и той же пробы) были выделены холерные вибрионы, принадлежащие к различным серогруппам. Данные штаммы были идентифицированы как *V. cholerae* не O1/не O139 как в реакции слайд-агглютинации с моноклональными антителами, так и при использовании иммунохроматографического теста, а также с помощью серотипирования и в ПЦР на O1 антиген. В ходе мониторинга в 2011 г. были изучены 50 (79,4 %) штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 из общего числа выделенных в этом году штаммов (63 штамма), у которых был отмечен положительный результат в реакции слайд-агглютинации на стекле. В результате исследования у 15 штаммов из 50 агглютинабельность была выявлена и в развернутой реакции агглютинации с O1 холерной и типоспеци-

фическими сыворотками в различных титрах. Все культуры давали свечение на два креста при обработке люминесцирующими O1 холерными антителами холерных вибрионов.

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости своевременной дифференциации данных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139, несмотря на утрату этими штаммами агглютинабельности при последующих пассажах. При этом возможно использование следующих методов: реакция слайд-агглютинации с моноклональными антителами к *V. cholerae* O1 на основе гибридов E9 и F8G12 [2], определение принадлежности к определенным серогруппам у атипичных штаммов, а также реакция МФА и ПЦР. В этой связи становится очевидной необходимость внедрения в схему лабораторной диагностики холеры новых методов для надежной дифференциации холерных вибрионов O1, O139 от не O1/не O139 серогрупп, что диктуется быстротой, удобством постановки реакций и визуального учета результатов.

Мы считаем, что работа в данном направлении требует своего продолжения, т.к. выявленный факт наличия изменчивости по признаку агглютинабельности у водных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 не исключает возможности диагностических ошибок в работе лабораторий практического здравоохранения территориального уровня, которые проводят исследования до этапа слайд-агглютинации с холерными диагностическими сыворотками. Такие ошибки могут повлечь за собой необходимость последующего проведения идентификации выделенных культур бактериологическими лабораториями регионального уровня с соответствующими затратами сил и средств. Так, использование МФА для баклабораторий территориального уровня нашло уже свое отражение в МУК 4.2.2870-11.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили определить доминирующие серогруппы холерных вибрионов не O1/не O139, выявить незначительные изменения в их составе, установить низкую вероятность проявления вирулентности данных штаммов, показали вариабельность их генотипов, подтвердили отсутствие связи последних с принадлежностью к определенным серогруппам. а также продемонстрировали нецелесообразность проведения сплошного гено- и серологического типирования водных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных при мониторинге.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Ишина Е.В., Воронежская Л.Г. Оценка метода серологической идентификации *Vibrio cholerae* не O1. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001; 4:75-8.
2. Алексеева Л.П., Кругликов В.Д., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Евдокимова В.В., Авдеева Е.П., Фатеева О.Ф., Яговкин М.Э. Идентификация холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с помощью моноклональных антител в реакции слайд-агглютинации. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2010; 11: 53-6.
3. Ерошенко Г.А., Кутырев В.В., Фадеева А.В., Шавина Н.Ю., Степанов А.В. Распространение генов системы секреции III типа у холерных вибрионов различных серогрупп. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 4: 23-7.
4. Кругликов В.Д., Ломов Ю.М., Авдеева Е.П., Монахова Е.В., Ежова М.И., Архангельская И.В., Шестиалтынова И.С., Дедова Э.Г., Шалу О.А., Ускова Н.Н., Григоренко Л.В. Серологическое типирование и генотипическая характеристика холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных из воды поверхностных водоемов и стоков Ростова-на-Дону в 2003-2008 гг. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 21:3-8.
5. Онищенко Г.Г., Ганин В.С., Голубинский Е.П. Вибрионы не O1 серологической группы и их значение в патологии человека. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2001. 384 с.
6. Monakhova E.V. Phenotypic and molecular characteristics of epidemic and non-epidemic *Vibrio cholerae* strains isolated in Russia and certain countries of Commonwealth of Independent States (CIS). In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and molecular aspects on cholera.* Springer Science+Business Media; 2010. P. 51-78.

## References

1. Avdeeva E.P., Mazrukho B.L., Ishina E.V., Voronezhskaya L.G. [Evaluation of the methodology for serological *Vibrio cholerae* non-O1 identification]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001; 4:75-8.
2. Alekseeva L.P., Kruglikov V.D., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Evdokimova V.V., Avdeeva E.P., Fateeva O.F., Yagovkin M.E. [Cholera vibrio O1/O139 identification by means of slide agglutination using monoclonal antibodies]. *Klinich. Lab. Diagnost.* 2010; 11:53-6.
3. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V., Fadeeva A.V., Shavina N.Yu., Stepanov A.V. [Distribution of the secretion systems (type III) genes in cholera vibrios of various serogroups]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 4:23-7.
4. Kruglikov V.D., Lomov Yu.M., Avdeeva E.P., Monakhova E.V., Ezhova M.I., Arkhangel'skaya I.V., Shestialtyanova I.S., Dedova E.G., Shalu O.A., Uskova N.N., Grigorenko L.V. [Serological typing and genotype characteristics of cholera vibrios non-O1/non-O139 serogroups, isolated from the Rostov-on-Don surface and sewage waters in 2003-2008]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 21:3-8.
5. Onishchenko G.G., Ganin V.S., Golubinsky E.P. [Vibrios of Non-O1 Serological Group and Their Significance in Human Pathology]. М.; 2001. 384 p.
6. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Mikhas' N.K. [Studies of genome polymorphism among ctxAB<sup>+</sup> cholera vibrio strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2004; 1:23-9.

## Authors:

Grigorenko L.V., Kruglikov V.D., Mazrukho A.B., Arkhangel'skaya I.V., Zubkova D.A., Nepomnyashchaya N.B., Shestialtyanova I.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaaanet.ru

## Об авторах:

Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, Российская Федерация. E-mail: plague@aaaanet.ru

Поступила 28.10.13.



Ю.М.Евченко<sup>1</sup>, Д.В.Ефременко<sup>1</sup>, И.В.Кузнецова<sup>1</sup>, В.М.Мезенцев<sup>1</sup>, Л.И.Белявцева<sup>1</sup>, М.Е.Платонов<sup>2</sup>,  
В.В.Евсеева<sup>2</sup>, С.В.Дентовская<sup>2</sup>, А.П.Анисимов<sup>2</sup>, А.Н.Куличенко<sup>1</sup>

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация

Изучены методом MLVA по 25 VNTR-локусам штаммы *Yersinia pestis*, изолированные в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы с 1971 по 2012 год. Анализ приуроченности кластеров дендрограммы к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов проводили с использованием программы Arc GIS 10.1. Установлена взаимосвязь MLVA25-типов *Y. pestis* с участками и временем выделения штаммов в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы, потребностью в пролине. Кластеры, группы и подгруппы штаммов приурочены к определенным территориям: группы – к ландшафтно-эпизоотологическим районам, подгруппы – к поселениям горных сусликов. Периодически группы штаммов распространяются в другие ландшафтно-эпизоотологические районы очага. Генетические варианты штаммов возбудителя чумы в пределах поселений горных сусликов меняются с течением времени, что является косвенным свидетельством действия механизма микроэволюции.

**Ключевые слова:** Центральном-Кавказский природный очаг чумы, *Yersinia pestis*, генотипирование, генетические варианты.

Yu.M.Evchenko<sup>1</sup>, D.V.Efremenko<sup>1</sup>, I.V.Kuznetsova<sup>1</sup>, V.M.Mezentsev<sup>1</sup>, L.I.Belyavtseva<sup>1</sup>, M.E.Platonov<sup>2</sup>,  
V.V.Evseeva<sup>2</sup>, S.V.Dentovskaya<sup>2</sup>, A.P.Anisimov<sup>2</sup>, A.N.Kulichenko<sup>1</sup>

## Studies of Genetic Diversity of *Yersinia pestis* Strains Isolated in Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

<sup>1</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>2</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Studied have been *Yersinia pestis* strains isolated in Central-Caucasian high-mountain natural plague focus within the period of 1971–2012 using MLVA typing on 25 VNTR-loci. Analysis of dendrogram cluster association with certain areas, objects, and periods of the strain isolation has been carried out by means of Arc GIS 10.1 software. Established has been the connection between 25 MLVA *Y. pestis* types and spatial and temporal characteristics of strains isolation in the Central-Caucasian high-mountain natural plague focus, and proline requirement too. Clusters, groups and subgroups of the strains are confined to particular territories as it follows: groups are attributed to landscape-epizootiological regions, subgroups – to mountain souslik settlements. Occasionally groups of the strains disseminate onto the other landscape-epizootiological regions of the focus. Genetic variations of plague agent strains within the limits of mountain souslik settlements evolve over time which can be viewed as indirect evidence of microevolution mechanism effect.

**Key words:** Central-Caucasian high-mountain natural plague focus, *Yersinia pestis*, genotyping, genetic variations.

Центральном-Кавказский высокогорный природный очаг чумы отличается гетерогенностью циркулирующих в нем штаммов по потребности в факторах роста, вирулентности, генетическим и некоторым другим свойствам. С учетом указанных особенностей очаг условно делят на восточную и западную части с границей по р. Малка. Отмечена приуроченность аукоотрофных по пролину штаммов чумного микроба к западной части очага [5]. Функционирование природного очага в многолетнем аспекте характеризуется наличием трех периодов эпизоотической активности, обусловленных мощным воздействием на паразитарную систему очага факторов природного и антропогенного порядка [4].

В настоящее время для изучения геномного полиморфизма штаммов возбудителя чумы широкое применение получил многолокусный анализ вариативных тандемных повторов (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis – MLVA 25).

Данный метод позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов, согласующуюся с классическими методиками, определять их принадлежность к географическому региону, природному очагу, а также формировать отдельные группы внутри очага [3, 7, 8, 9].

Целью данной работы было изучение методом MLVA25 генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центральном-Кавказского высокогорного природного очага чумы, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем, объектом выделения, аукоотрофностью по пролину и периодом активности.

### Материалы и методы

В работе были использованы 64 штамма *Y. pestis*, изолированные в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы с 1971 по 2012 год.

MLVA проводили по 25 VNTR-локусам *Y. pestis*, как описано ранее [7]. На основании полученных данных методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA) с помощью компьютерных программ START 2 и Bionumerics 5.1 были построены дендрограммы штаммов возбудителя чумы. Анализ приуроченности кластеров к определенным территориям, объектам и срокам изоляции штаммов проводили с использованием программы Arc GIS 10.1. Места выделения штаммов *Y. pestis* были геокодированы с географической привязкой до уровня сектора первичного района. В атрибутивные таблицы добавлены поля результатов генотипирования и отношения штаммов к долину. Создан слой полигонов ландшафтно-эпизоотологического районирования территории очага. Оценка значимости различия частот наблюдений проводилась по критерию Фишера [6].

### Результаты и обсуждение

Исследованные штаммы возбудителя чумы были подразделены на 44 MLVA25-типа. В результате была построена дендрограмма, отображающая сте-

пень филогенетического родства штаммов (рис. 1). Результаты распределения штаммов по различным кластерам при группировке их с помощью компьютерных программ START 2 и Bionumerics 5.1 оказались идентичными.

На дендрограмме выделяются два крупных кластера *A* и *B*. Кластер *A* сформирован штаммами *Y. pestis*, выделенными в восточной части очага в долине реки Баксан. Исключение составляют два штамма С-369 и С-339, которые изолированы в западной части природного очага – Верхне-Кубанском и Кубано-Малкинском ландшафтно-эпизоотологических районах (ЛЭР).

Кластер *B* образован двумя ветвями. Первая ветвь *BI* состоит из двух групп. Группа *BI<sub>1</sub>* представлена двумя изолятами из восточной части очага. Группа *BI<sub>2</sub>* состоит из штаммов, выделенных в западной части очага в Верхне-Кубанском ЛЭР: в ур. Еникол, Уллу-Хурзук, Битюк-Тюбе, Джубакалыккол.

Вторая ветвь *BII* представлена 35 штаммами. Штамм С-658, выделенный недалеко от аула Хасаут в 1988 г., на дендрограмме располагается отдельно. Остальные штаммы образуют две группы – *BII<sub>1</sub>* и *BII<sub>2</sub>*. Группа *BII<sub>1</sub>* сформирована 18 штаммами, изо-

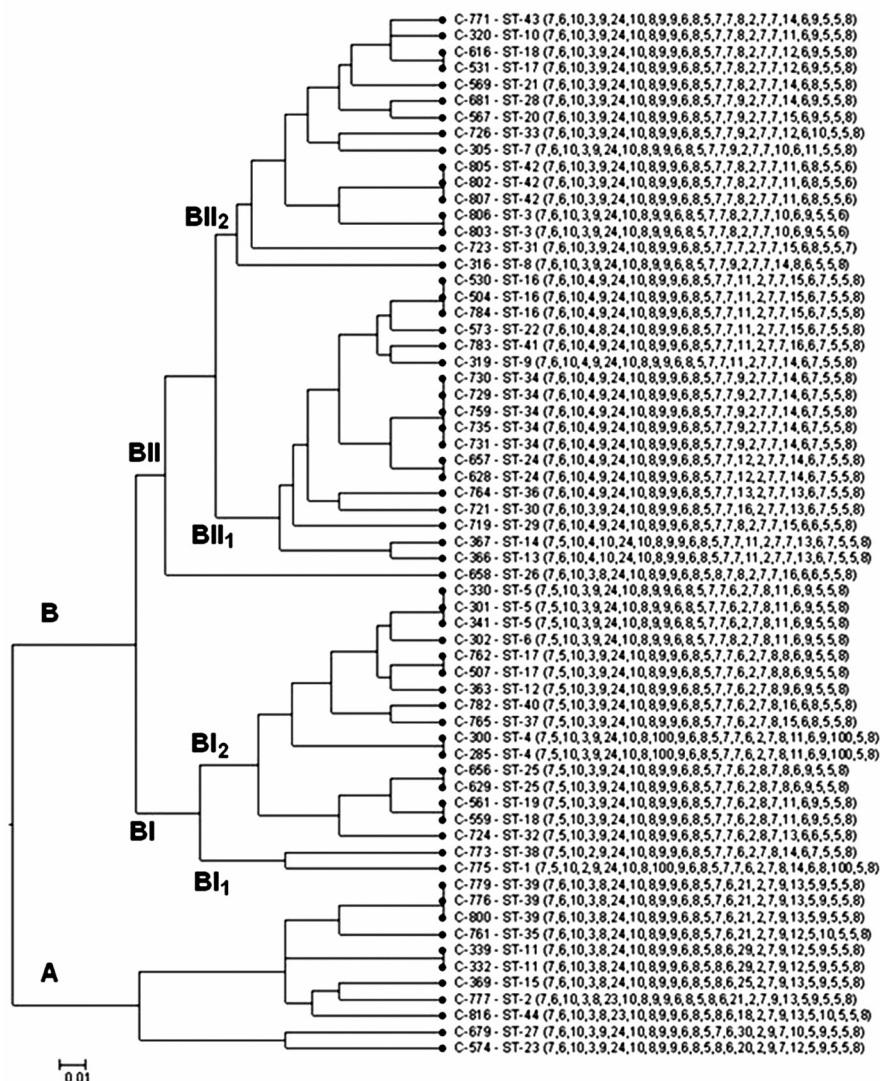


Рис. 1. Дендрограмма MLVA25-типов штаммов *Y. pestis*, выделенных в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы

лированными в Кубано-Малкинском ЛЭР. Группа  $BII_2$  состоит из 16 штаммов, выделенных в границах между собою Кубано-Малкинском и Малко-Баксанском ЛЭР.

Приведенная кластеризация свидетельствует о приуроченности сформированных на дендрограмме групп MLVA25-типов к определенным территориям природного очага, что согласуется с делением изолированных групп поселений горного суслика – основного носителя чумы в данном очаге.

Каждая группа делится на подгруппы, соответственно конечным ветвям древа. Характерным признаком штаммов, относящихся к одному MLVA25-типу, является их расположение в дендрограмме по вертикали от заключительного «узла». Для установления связи подгрупп с местами, временем и объектами выделения использовали достаточно объемные выборки штаммов, изолированных в одних и тех же урочищах. В кластере  $A$  для решения данной задачи были выбраны изоляты ур. Перк. Штаммы С-800, С-776, С-779, относящиеся к одному MLVA25-типу, выделены в 2001 и 2004 гг. от блох *Cit. tesquorum*, добытых из входов нор и очеса горных сусликов. Два других штамма – С-777 и С-816, выделенные в 2001 и 2007 гг. от горного суслика и блох *Cit. tesquorum*, относились к другой подгруппе.

В группе  $BI_1$  штаммы, выделенные в ур. Еникол, относятся к трем разным подгруппам. Штаммы с одинаковым MLVA25-типом – С-559, С-561, выделены в 1983 г., тогда как штаммы С-341 и С-724 изолированы в 1976 и 1996 гг. соответственно. В этой же группе находятся семь штаммов из ур. Битюк-Тюбе, которые вошли в состав трех подгрупп. Так, первые штаммы (С-285, С-300), выделенные в природном очаге, относятся к одному MLVA25-типу. Они изолированы в октябре 1971 г. от блох *Cit. tesquorum* из очеса трупа горного суслика и в апреле 1972 г. от трупа горного суслика. Штаммы С-301, С-302, С-330, выделенные от блох *Cit. tesquorum* из очеса трупа горного суслика, самого трупа в мае 1972 г. и от блох *Cit. tesquorum* из очеса горного суслика в 1975 г., соответственно, вошли в состав другой подгруппы. Штаммы С-765 и С-782, выделенные от блох *Cit. tesquorum* и горного суслика в 1998 и 2001 гг., соответственно, сформировали третью подгруппу.

В группе  $BII_1$  самая представительная часть – семь штаммов из ур. Ипподром, относится к четырем разным подгруппам: 1 – С-729, С-730, С-731, С-735; 2 – С-764; 3 – С-783 и 4 – С-784. Штаммы 1-й подгруппы выделены от блох *Cit. tesquorum* и *F. semura* в течение июня–августа 1998 г. Штаммы 2–4-й подгрупп выделены в 1998 и 2001 гг. от блох *Cit. tesquorum* и *Ct. golovi*.

Из приведенных наблюдений следует, что штаммы, выделяемые из одного и того же урочища с временным промежутком в несколько лет, как правило, на дендрограмме образуют различные подгруппы, тогда как штаммы с одинаковыми адресами и временем выделения обычно имеют одинаковый MLVA25-

тип. При этом объекты выделения и видовая принадлежность переносчиков не имеют значения при формировании ветвей дендрограммы.

Далее нашей задачей было установление связи групп MLVA25-типов с дифференциацией штаммов по зависимости от пролина в разные периоды активности очага. Из таблицы видно, что для штаммов типа  $A$  характерны только  $Pro^+$  варианты возбудителя чумы. Для других групп соотношение прототрофов и аустрофов неодинаково на разных этапах активности очага. В первый период (1971–1981 гг.) во всех генетических группах преобладали  $Pro^+$  штаммы, однако с каждым последующим периодом (1982–2000 и 2001–2012 гг.) их доля снижалась. Различие в соотношении  $Pro^+$  и  $Pro^-$  штаммов в разные периоды активности очага имеет статистическую значимость (первого со вторым –  $\phi_1 = 3,446$ ; первого с третьим –  $\phi_2 = 3,591$ ).

Следует отметить, что  $Pro^+$  штаммы наиболее часто выделялись в восточной части очага (62,5 %), а  $Pro^-$  штаммы – в западной (65 %). При этом  $Pro^+$  штаммы выделены в западной части в течение первого периода активности очага, тогда как  $Pro^-$  штаммы в восточной части – во втором и третьем периодах. Это свидетельствует, на наш взгляд, о развитии в первый период экстенсивных эпизоотий, обусловленных  $Pro^+$  штаммами, а во второй и третий –  $Pro^-$  штаммами *Y. pestis*.

На рис. 2 показано, что штаммы группы  $A$  во все периоды активности очага присутствовали в долине р. Баксан, в секторах 23801442 и 23801531, а в первом периоде проникали также в Верхне-Кубанский и Кубано-Малкинский ЛЭР. Штаммы группы  $BI_1$  (С-775, С-773) были изолированы из Баксано-Чегемского ЛЭР в последний период активности очага. В Верхне-Кубанском ЛЭР распространены штаммы группы  $BI_2$  – они присутствовали здесь во все периоды активности очага, а во втором периоде распространялись и в Кубано-Малкинский ЛЭР. Кубано-Малкинский ЛЭР являлся местом постоянной циркуляции двух групп MLVA25-типов –  $BII_1$  и  $BII_2$ . Штаммы второй группы выделялись и в других ЛЭР, но в каждый период активности очага наблюдалось определенное направление их распростране-

Генетические группы и соотношение  $Pro^+$  и  $Pro^-$  штаммов *Y. pestis* в разные периоды активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы

| Группы MLVA25-типов | 1971–2012 |         | 1971–1981 |         | 1982–2000 |         | 2001–2012 |         |
|---------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
|                     | $Pro^+$   | $Pro^-$ | $Pro^+$   | $Pro^-$ | $Pro^+$   | $Pro^-$ | $Pro^+$   | $Pro^-$ |
| $A$                 | 11        | 0       | 3         | 0       | 3         | 0       | 5         | 0       |
| $BI_1$              | 0         | 2       | 0         | 0       | 0         | 0       | 0         | 2       |
| $BI_2$              | 5         | 11      | 4         | 2       | 1         | 7       | 0         | 2       |
| $BII_1$             | 7         | 12      | 4         | 0       | 3         | 10      | 0         | 2       |
| $BI_2$              | 6         | 10      | 3         | 1       | 3         | 3       | 0         | 6       |
| Итого               | 29        | 35      | 14        | 3       | 10        | 20      | 5         | 12      |

Примечания:  $Pro^+$  – штаммы *Y. pestis* не зависящие от пролина;  $Pro^-$  – штаммы *Y. pestis* зависящие от пролина.



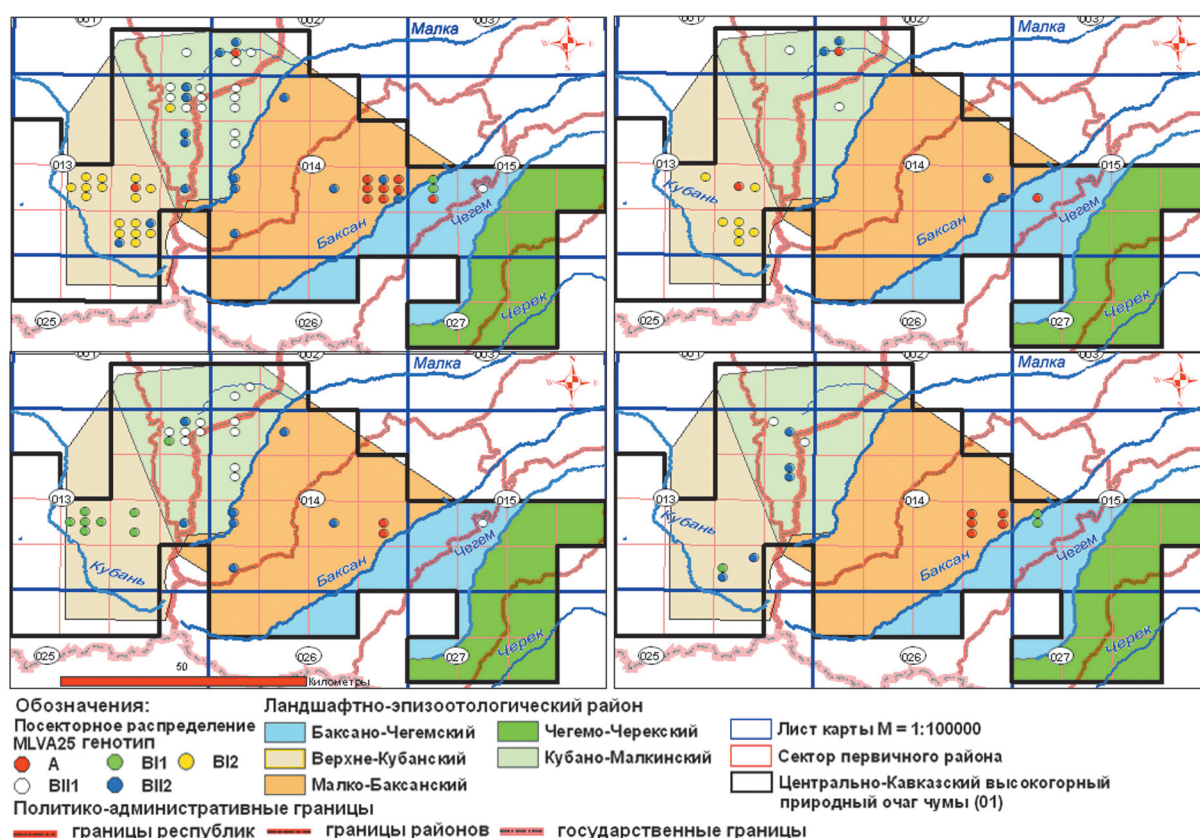


Рис. 2. Распространение групп MLVA25-типов на территориях ЛЭР в разные периоды активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы

ния. Штаммы группы *BII*<sub>1</sub> лишь однократно, во втором периоде, были выделены из Баксано-Чегемского ЛЭР.

Таким образом, в результате анализа филогенетического дерева, построенного на основании результатов генотипирования 64 штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы, сформированы группы MLVA25-типов разных уровней дискриминации.

Группы и подгруппы штаммов приурочены к определенным территориям: группы – к ландшафтно-эпизоотологическим районам природного очага, подгруппы – к поселениям горных сусликов. Штаммы группы *A* постоянно циркулируют в восточной части очага, западная часть является местом постоянной циркуляции других групп: в Верхне-Кубанском ландшафтно-эпизоотологическом районе распространены штаммы группы *BI*<sub>2</sub>, в Кубано-Малкинском – *BII*<sub>1</sub> и *BII*<sub>2</sub>. Вероятно, это является отражением истории расселения носителей чумы – малых сусликов в горах Кавказа. Природный очаг в горах Центрального Кавказа сформировался когда из Предкавказских степей сюда проникли малые суслики. Предположительно это случилось не ранее 4 тыс. лет назад [2]. Первоначально они проникли в горные степи нынешней восточной части очага – в продольные долины горных рек (Чегем, Баксан и др.), затем эти зверьки начали продвигаться на запад в субальпийские и альпийские луга. В горной степи долины р. Баксан до настоящего времени сохранилась пара-

зитарная система, присущая равнинным природным очагам чумы сусликового типа. Выше в горах структура паразитарной системы существенно изменилась [1], обусловив появление специфических для этих мест генотипов возбудителя чумы – групп кластера *B*.

Периодически группы штаммов распространяются в соседние ландшафтно-эпизоотологические районы. Способность вызывать экстенсивные эпизоотии наиболее выражена у штаммов групп *A* и *BII*<sub>2</sub> и зависит от периодов активности очага – в первый период преимущество имела группа *A*, во второй и третий – группа *BII*<sub>2</sub>.

Для штаммов типа *A* характерны только *Pro*<sup>+</sup> варианты возбудителя чумы. Для других групп соотношение *Pro*<sup>+</sup> и *Pro*<sup>-</sup> штаммов неодинаково на разных этапах активности очага. В первый период (1971–1981 гг.) во всех генетических группах преобладали *Pro*<sup>+</sup> штаммы, однако с каждым последующим периодом (1982–2000 и 2001–2012 гг.) их доля снижалась.

Подгруппы формируются штаммами возбудителя чумы на уровне урочищ (поселений горных сусликов) или групп урочищ, расположенных поблизости друг от друга. Генетические варианты штаммов возбудителя чумы в пределах поселений горных сусликов меняются с течением времени, что является косвенным свидетельством действия механизма микроэволюции. Говоря о возможностях MLVA25, необходимо отметить, что благодаря своей высокой дискриминирующей способности он существенно

расширяет возможности решения задач эпидемиологической направленности, в том числе при определении источника инфекции в природном очаге чумы.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евченко Ю.М. Сезонность эпизоотий на разных участках Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2008; 2(Ч. II):615–6.
2. Ермаков О.А., Титов С.В., Савинский А.Б., Сури В.Л., Зборовский С.С., Ляпунова Е.А., Брандлер О.В., Формозов Н.А. Молекулярно-генетические и палеоэкологические аргументы в пользу конспецифичности малого (*Spermophilus pygmaeus*) и горного (*S. musicus*) сусликов. *Зоол. журн.* 2006; 85 (12):1474–10.
3. Кузнецова И.В., Ефременко Д.В. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis*, изолированных из Восточно-Кавказского высокогорного природного очага чумы в 2010 г. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2013; 8(1):98–99.
4. Куличенко А.Н., Евченко Ю.М., Мозлов Г.А., Григорьев М.П., Ляпустина Л.В., Чурикова Н.В. Эпизоотическая активность Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 4(110):23–5.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: ОАО Изд-во Медицина; 2004. 192 с.
6. Сидоренко Е.В. Методы математической обработки в психологии. СПб: Речь; 2007. 220 с.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009; 4(6):6000.
8. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* Vole Strains Isolated from Natural Foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–4.
9. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):30624.

## References

1. Evchenko Yu.M. [Seasonal fluctuations of epizooties in different territories of Central-Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Vestnik*

*Ros. Voenno-Med. Akad.* 2008; 2(Pt. II):615–6.

2. Ermakov O.A., Titov S.V., Savinetsky A.B., Surin V.L., Zborovsky S.S., Lyapunova E.A., Brandler O.V., Formozov N.A. [Molecular-genetic and paleo-economical provisions for con-specificity of little (*Spermophilus pygmaeus*) and mountain souslik]. *Zool. Zh.* 2006; 85(12):1474–10.
3. Kuznetsova I.V., Efremenko D.V. [Genotyping of *Yersinia pestis* strains isolated in East-Caucasian high-mountain natural plague focus in 2010]. *Med. Vestnik Sever. Kavkaza*. 2013; 8(1):98–99.
4. Kulichenko A.N., Evchenko Yu.M., Mozlov G.A., Grigor'ev M.P., Lyapustina L.V., Churikova N.V. [Epizootic activity of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 4(110):23–5.
5. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Pre-Caspian Region, Central Asia and Siberia]. M.: OAO "Meditsina", 2004. 192 p.
6. Sidorenko E.V. [Mathematical Processing in Psychology]. St. Petersburg: Rech'; 2007. 220 p.
7. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y., Guo Z., Pourcel C., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Yang R., Vergnaud G. Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PLoS One*. 2009; 4(6):6000.
8. Platonov M.E., Evseeva V.V., Svetoch T.E., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. Phylogeography of *Yersinia pestis* Vole Strains Isolated from Natural Foci of the Caucasus and South Caucasus. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(3):108–4.
9. Riehm J.M., Vergnaud G., Kiefer D., Damdindorj T., Dashdavaa O., Khurelsukh T., Zöller L., Wölfel R., Le Flèche P., Scholz H.C. *Yersinia pestis* lineages in Mongolia. *PLoS One*. 2012; 7(2):30624.

## Authors:

Evchenko Yu.M., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Mezentssev V.M., Belyavtseva L.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

## Об авторах:

Евченко Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезенцев В.М., Белявцева Л.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 13.06.13.

М.И.Ежова, В.Д.Кругликов, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов, И.С.Шестиалтынова, И.П.Олейников,  
Н.Б.Непомнящая, О.А.Подойницына

## ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ О1 СЕРОГРУППЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ В ХОДЕ МОНИТОРИНГА В 2008–2012 гг.

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

Выявлены особенности биологических свойств и происхождения штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы, выделенных в процессе мониторинга из водных объектов Ростова-на-Дону с 2008 по 2012 год. Из 767 проб воды выделен и изучен 41 атоксигенный штамм *V. cholerae* О1. Показана стойкая тенденция увеличения количества выделяемых из водных объектов атоксигенных штаммов *V. cholerae* О1. При ПЦР-генотипировании с использованием специфических праймеров для детекции 45 нуклеотидных последовательностей, связанных с патогенностью *V. cholerae* у исследуемых штаммов выявлены гены дополнительных факторов патогенности. При VNTR-типировании с использованием авторских локуспецифических праймеров штаммы были распределены по 19 VNTR-генотипам, объединенным в 6 кластеров. Выявлены штаммы с одинаковыми генотипами из разных точек как в течение года, так и на протяжении нескольких лет. Штаммы, по всей видимости, имели завозной характер и обладали способностью к переживанию в водных объектах окружающей среды в течение определенного времени.

**Ключевые слова:** холерные вибрионы, мониторинг, VNTR-типирование, генотип, ПЦР, дополнительные факторы патогенности.

M.I.Ezhova, V.D.Kruglikov, A.S.Vodop'yanov, S.O.Vodop'yanov, I.S.Shestialtynova, I.P.Oleynikov,  
N.B.Nepomnyashchaya, O.A.Podoinitsyna

## O1 Serogroup Cholera Vibrios Isolated from the Rostov-on-Don Water Bodies in the Course of Surveillance in 2008–2012

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

Identified are the peculiarities of biological properties and origin of cholera vibrio O1 serogroup strains isolated from the Rostov-on-Don water bodies in the course of surveillance in 2008–2012. 41 atoxigenic *V. cholerae* O1 strains have been isolated from 767 water samples and investigated. Stable tendency of isolation of increased numbers of atoxigenic *V. cholerae* O1 strains over time has been demonstrated. In addition, in the strains under study detected have been the genes of additional pathogenicity factors, by PCR genotyping using specific primers for 45 nucleotide sequences associated with *V. cholerae* pathogenicity. The strains have also been classified according to 19 VNTR-genotypes grouped into 6 clusters based on VNTR-typing using exclusive copyright locus-specific primers. Discovered have been the strains with similar genotypes though isolated at different points both throughout the year and over the period of several years. These ones have probably been imported. They are characterized by a capacity to persist in ambient water bodies for a certain period of time.

**Key words:** cholera vibrios, monitoring, VNTR-typing, genotype, PCR, additional pathogenicity factors.

Эпидемиологическая обстановка и прогноз по холере в мире остаются неблагоприятными [9]. Завоз холеры на территорию Ростова-на-Дону вполне реален, и существует опасность распространения этого заболевания. А вероятность наличия в водной среде популяции токсигенных форм холерных вибрионов не исключает того, что водные объекты окружающей среды при определенных условиях могут быть резервуаром инфекции и представлять эпидемическую опасность.

В этой связи данные микробиологических исследований, получаемые в процессе динамичного мониторинга наличия холерных вибрионов в поверхностных водоемах и сточных водах, продолжают оставаться неотъемлемой составляющей лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации.

Постоянный мониторинг холеры и проведение эпидрасследования вспышек с идентификацией ис-

точника инфекции невозможны без использования современных методов типирования возбудителей. Так, например, помимо основных факторов патогенности, существует ряд генетических детерминант дополнительных токсинов, количество и уровень экспрессии которых могут различаться от штамма к штамму. Для этого целесообразно использовать набор праймеров для детекции не только основных, но и дополнительных факторов патогенности [7]. А прием VNTR-типирования позволяет получать наиболее полную информацию о происхождении штаммов и о степени генетического родства между ними [6]. Исходя из этого, особое значение приобретает установление индивидуальных генотипов штаммов *V. cholerae* О1, выделенных из водных объектов окружающей среды в течение многолетнего периода на определенной административной территории.

Таким образом, цель настоящего исследования – охарактеризовать на современном уровне особенно-



сти биологических свойств и происхождения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, выделенных из водных объектов Ростова-на-Дону с 2008 по 2012 год.

### Материалы и методы

Анализ нашей работы основывался на результатах исследований воды поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых стоков Ростова-на-Дону по 12 стационарным точкам отбора. Точки с 1-й по 8-ю были закреплены за Ростовским-на-Дону научно-исследовательским противочумным институтом: 1-я – р. Дон, правый берег у Державинского спуска; 2-я – р. Темерник, устье впадения в р. Дон; 3-я – сточные воды, городские очистные сооружения, приемная камера КНС № 4; 4-я – р. Дон, у железнодорожно-автомобильного моста «Западный обход»; 5-я – пр. Мертвый Донец, левый берег, 500 м ниже автомобильного моста (на Кумжинскую рощу); 6-я – р. Темерник, ботанический сад, у моста; 7-я – р. Дон, правый берег, 200 м ниже впадения р. Темерник (у железнодорожного моста); 8-я – р. Дон, правый берег, Кировский спуск, напротив здания экипажа № 2 РМК им. Г.Я.Седова. Точки с 9-й по 12-ю были закреплены за Северо-Кавказский ПЧС: 9-я – р. Темерник, правый берег около вагонного депо СКЖД; 10-я – р. Темерник, левый берег около вагонного депо СКЖД; 11-я – р. Темерник, у моста Текучева; 12-я – р. Дон, у железнодорожного моста. Причем точки с 9-й по 12-ю были добавлены в 2011 г.

Мониторинговое исследование, выделение, идентификация и изучение биологических свойств культур *V. cholerae* eltor проводились в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов [3, 9]. Фаговары тестировали с помощью набора Дрожжевкиной-Арутюнова.

ПЦР-диагностика включала: видовую идентификацию (*hapA*, *toxR*), дифференциацию сероваров (*wbe*, *wbf*), определение эпидемической опасности штаммов *V. cholerae* O1 (*ctxA*, *ctxB<sup>elt</sup>*, *ctxB<sup>class</sup>*, *tcpA<sup>elt</sup>*, *tcpA<sup>class</sup>*, *tcpA<sup>env</sup>*, *tcpA<sup>calc</sup>*). Помимо этого, определяли наличие генов СТХ-элемента и прилегающих к нему областей (*cep*, *orfU*, *zot*, *ace*, *rstR<sup>elt</sup>*, *rstR<sup>class</sup>*, *rstA*, *rstB*, *rstC*), сайта специфической интеграции СТХφ (*attRS*), генов островов патогенности VPI и VPI-2 (*toxT*, *int*, *nanH*, *vce*) и RTX-кластера (*rtxA*, *rtxC*, *ACD-rtxA*), генов, относящихся к системам секреции третьего (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*) и шестого (*vasK*, *vasA*, *vasF*, *vgrG3*) типов, а также ряд генов – факторов патогенности и персистенции (*slt1*, *stn/sto*, *tdh*, *trh*, *hcp*, *ACD-vgrG1*, *mshA*, *tolQRA*, *cef*) [7]. VNTR-типирование проводили с использованием авторских специфических праймеров к VNTR-локусам холерного вибриона *VcA* (TGCTGT)<sub>n</sub>, *VcB* (ACAAGA)<sub>n</sub>, *VcC* (AACAGA)<sub>n</sub>, *VcD* (GACCCCTA)<sub>n</sub>, и *VcG* (GATAATCCA)<sub>n</sub> [1].

Результаты обрабатывали с помощью стандарт-

ного программного обеспечения. Размеры аллелей рассчитывали с использованием авторской программы GEL 1.0. и программы Quantity One 4.40, «Bio-Rad». В качестве маркеров молекулярных размеров использовали ДНК-маркеры FastRuler™ SM1113 в диапазоне от 100 до 5000 нуклеотидных пар, производства Fermentas. Кластерный и территориально-пространственный анализ штаммов осуществляли построением дендрограммы с учетом полиморфизма аллельного состояния исследованных VNTR-локусов и с использованием разработанной нами геоинформационной системы «Штаммы *Vibrio cholerae*» [2], а также открытого программного обеспечения. Кластерный анализ, построение дендограммы и расчет генетических расстояний проводили по методу UPGMA (невзвешенного попарного среднего).

### Результаты и обсуждения

Всего исследовано 767 проб воды, выделен 41 атоксигенный штамм *V. cholerae* O1. Все штаммы были изолированы только из проб воды поверхностных водоемов. Из р. Темерник выделено 25 штаммов, из р. Дон – 14 и из протоки р. Мертвый Донец – 2.

Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы за изучаемый период свидетельствовал о количественном увеличении изолированных штаммов в 2010 и 2011 гг. и о снижении их числа в 2012 г. Вместе с тем при сравнении с данными, полученными за предшествующие пятилетние периоды [5], выявлялась стойкая тенденция увеличения количества выделяемых штаммов *V. cholerae* O1 из водных объектов окружающей среды на территории Ростова-на-Дону. Так, ретроспективный анализ показал, что за период проведения мониторинга (2008–2012 гг.) было выделено на 10 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы больше, чем за предшествующее десятилетие.

Проведенный нами сравнительный анализ результатов мониторинга холеры в Ростове-на-Дону за последние 15 лет дал основание предполагать, что и в дальнейшем возможно обнаружение в водных экосистемах города токсигенных штаммов холерного вибриона завозного происхождения. Так, на фоне эпидемического благополучия по холере на изучаемой территории с 1992 по 2012 год выделялись единичные эпидемически опасные культуры (2000, 2001, 2003 гг.), а также *ctx<sup>-</sup>tcp<sup>+</sup>* штаммы (2001, 2002, 2007 гг.) [4, 5]. Вышесказанное, в свою очередь, указывает на необходимость настороженности в отношении этой инфекции и подчеркивает актуальность проведения мониторинговых исследований холеры.

Все изолированные в изучаемый период штаммы *V. cholerae* O1 были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам и относились к биовару эльтор. Принадлежность к серовару Гикошима была установлена у одного штамма, к Огава – у 29, к Инаба – у 11. Все выделенные штаммы являлись гемолизполо-

жительными и атоксигенными (не содержали генов *ctxA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>+</sup>).

В ходе проведенной идентификации удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 36,6 % исследованных культур *V. cholerae* O1. Остальные штаммы холерных вибрионов O1 не типировались. Было установлено, что на изучаемой территории встречались штаммы *V. cholerae* O1 11, 16, 15-го и 13-го фаготипов.

Среди всех штаммов, выделенных в течение изучаемого периода в ПЦР, не выявлено штаммов, содержащих сочетания генов *ctxA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>+</sup>, или *ctxA*<sup>-</sup> и *tcpA*<sup>+</sup>. У всех штаммов выявлены гены *hapA*, *vasA*, *vasK*, *vasF*, *hcrp*, *cef*, *toxR*, *tolQRA*, *mshA* и отсутствовали гены *ctxAB*, *cep*, *orfU*, *zot*, *ace*, *rstA*, *rstB*, *rstR*, *rstC*, *tcpA*, *toxT*, *sltA*, *stn*, *tdh*, *trh*.

Положительные результаты ПЦР, а именно проведение детекции одного или более видоспецифичных генов (*hapA*, *toxR*), подтвердили данные фенотипической идентификации и позволили с уверенностью отнести все исследуемые штаммы к виду *V. cholerae*.

Об эпидзначимости штаммов *V. cholerae* судили по наличию генов холерного токсина *ctxAB* и структурной единицы токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* в составе острова патогенности VPI. Поскольку ген *tcpA* отличается высокой степенью изменчивости, мы дополнительно определяли наличие еще одного гена VPI – *toxT*.

Полученные результаты показали, что ни один из штаммов не содержал названных генов, т.е. они являлись эпидемически безопасными. Однако в геномах исследуемых штаммов в различных сочетаниях были выявлены генетические детерминанты таких потенциальных факторов вирулентности, как цитотоксический кластер RTX; второй остров патогенности VPI-2 с геном нейраминидазы; маннозочувствительные пилы адгезии (*mshA*); гемагглютинин/протеаза (HA/P); цитотонический фактор Cef; система секреции третьего типа (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*), а также система секреции шестого типа (*vasA*, *vasK*, *vasF*) [10, 11, 12]. Поэтому нельзя исключать, что штаммы, циркулирующие в открытых водоемах, в определенных условиях могут послужить причиной заболеваний у отдельных ослабленных людей.

Вопрос о реальной способности штаммов, выделенных из внешней среды, экспрессировать выявленные гены и вызывать заболевания требует дальнейших исследований с использованием биологических моделей *in vivo* и *in vitro*.

Изучение распределения VNTR-аллелей у 41 атоксигенного штамма холерных вибрионов O1 позволило установить факт циркуляции на территории Ростова-на-Дону в период с 2008 по 2012 год 19 VNTR-генотипов *V. cholerae* O1. Подобное генотипическое разнообразие изолированных штаммов свидетельствовало как об изменениях в популяции холерного вибриона, что обеспечивало его экологическую адаптацию в естественных условиях, так и

о возможности циркуляции на территории Ростова-на-Дону различных генотипов. Вероятно, штаммы с разными VNTR-генотипами имеют способность к выживанию в данных конкретных экологических условиях на изучаемой территории.

Было установлено, что VNTR-генотипы были распределены по шести кластерам, обозначенным литерами A-F, при этом основную массу штаммов составили представители трех мажорных кластеров A, B и D (кластер A состоял из 14 штаммов, кластер B – из 15, кластер D из – 7). Три минорных кластера C, E и F были представлены пятью штаммами: кластеры C и E содержали по одному штамму, а кластер F – три штамма. Отмечено, что в разные годы выделялись штаммы с одинаковым генотипом. Так, например, генотип B1 встречался у штаммов, выделенных из водных объектов Ростова-на-Дону в 2009 и 2011 гг. Вместе с тем генотипы A1 и D1 встречались у штаммов, изолированных только в 2008 и 2009 гг., в то время как другие генотипы не повторялись за изучаемый промежуток времени.

Также необходимо отметить, что в 2008, 2010, 2011 и 2012 гг. встречались идентичные по генотипам штаммы *V. cholerae* O1, которые были выделены из разных точек в течение одного эпидемического сезона, что, по всей видимости, свидетельствовало об их селективном распространении в данный период времени. Например, в 2008 г. штаммы с генотипом F1 встречались в точках № 1, 4 и 7, или с генотипом A3 в точках № 1, 5, 6, 7.

Таким образом, в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону в течение 2008–2012 гг. была установлена циркуляция с количественным нарастанием атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, которые, по всей видимости, имели завозной характер, обладали способностью к переживанию в водных объектах окружающей среды в течение определенного времени и в своем геноме содержали гены дополнительных факторов патогенности. Наряду с этим, разнообразие штаммов по VNTR-генотипам свидетельствовало о циклических изменениях в популяции штаммов холерных вибрионов O1, циркулирующих на территории Ростова-на-Дону.

Использование современных методов изучения водных штаммов холерных вибрионов позволило выявить индивидуальные особенности их генома и обеспечило возможность слежения за динамикой циркуляции указанных штаммов в водных экосистемах. С нашей точки зрения, перспективные исследования по накоплению сравнительных данных позволят получить достоверное представление о продолжительности переживания атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы в данных экологических условиях на конкретной территории.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов, А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.

2. Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов С.О., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Шалу О.А., Олейников И.П. Свидетельство о государственной регистрации 2012620979 базы данных «Штаммы *Vibrio cholerae*», RU. Зарегистрировано в Реестре баз данных 21 сентября 2012 г.
3. Лабораторная диагностика холеры. МУК 4.2.2218-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007.
4. Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Ежова М.И., Шестиалтынова И.С., Шалу О.А., Непомнящая Н.Б., Архангельская И.В. Мониторинг вибриофлоры водных объектов окружающей среды в системе эпиднадзора за холерой. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2010; 5:24–8.
5. Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Ежова М.И., Шалу О.А., Агафонова В.В., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В. Фенотипическая и молекулярно-биологическая характеристика штаммов холерных вибрионов эль-тор, выделенных из водных объектов окружающей среды Ростова-на-Дону в 2003–2008 гг. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 1:24–8.
6. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Гончаров Е.К., Дуванова О.В., Шишияну М.В. Вариабельные tandemные нуклеотидные повторы (VNTR-анализ) у *V. cholerae* O139, выделенных от людей и из воды поверхностных водоемов России. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2004; 1:29–34.
7. Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Божко Н.В. ПЦР-детекция генов системы секреции III типа (TTSS) и других факторов патогенности/персистенции у холерных вибрионов разных серогрупп. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2010; 6:20–5.
8. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XX в. Прогноз на глобальном уровне. *Пробл. особо опасных. инф.* 2012; 1(111):62–5.
9. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания. МУК 4.2.2870-11. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.
10. 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.
11. Sheahan K.-L., Cordero C.L., Satchell K.J. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(26):9798–803.
12. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2:11–7.
2. Ezhova M.I., Kruglikov V.D., Vodop'yanov S.O., Monakhova E.V., Nepomnyashchaya N.B., Shalu O.A., Oleynikov I.P. [Certificate of the State Registration of data base "*Vibrio cholerae* strains", 2012620979, RU].
3. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological Recommendations]. MR 4.2.2218-07. M.: Rosпотребнадзор Federal Center for Hygiene and Epidemiology; 2007. 87 p.
4. Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., Avdeeva E.P., Ezhova M.I., Shestial'tynova I.S., Shalu O.A., Nepomnyashchaya N.B., Arkhangel'skaya I.V. [Monitoring over the ambient water bodies within the frames of epidemiological surveillance program as regards cholera]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2010; 5:24–8.
5. Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., Avdeeva E.P., Ezhova M.I., Shalu O.A., Agafonova V.V., Mazrukho A.B., Arkhangel'skaya I.V. [Phenotypic and molecular-biological characteristics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated from ambient Rostov-on-Don water bodies in 2003–2008]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 1:24–8.
6. Mishan'kin M.B., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M., Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Goncharov E.K., Duvanova O.V., Shishiyanu N.V. [Variable nucleotide tandem repeats (VNTR-assay) in *V. cholerae* O139 isolated from humans and surface waters in the territory of Russia] *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2004; 1:29–34.
7. Monakhova E.V., Smolikova L.M., Bozhko N.V. [PCR detection of TTSS genes (Third Type Secretion System) and other pathogenicity/persistence factors in cholera vibrios of various serogroups]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2010; 6:20–5.
8. 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*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111): 62–65.
9. [Operational practices and organizational procedures for the laboratory diagnostics of cholera in specialized facilities on the local, regional and national scale: Methodological recommendations]. MR 4.2.2870-11. M.: Rosпотребнадзор Federal Center for Hygiene and Epidemiology; 2011. 76 p.
10. 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.
11. Sheahan K.-L., Cordero C.L., Satchell K.J. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(26):9798–803.
12. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2:11–7.

## References

1. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats elicited in the course of computerized analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya.* 2001; 6:85–8.

## Authors:

Ezhova M.I., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Shestial'tynova I.S., Oleynikov I.P., Nepomnyashchaya N.B., Podoynitsyna O.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru

## Об авторах:

Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шестиалтынова И.С., Олейников И.П., Непомнящая Н.Б., Подойницына О.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru

Поступила 28.02.13.



Е.В.Монахова

**СТРАТЕГИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ И ПУТИ ЕЕ РЕАЛИЗАЦИИ (ОБЗОР)***ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

В обзоре рассматриваются основные пути реализации холерными вибрионами стратегии вирулентности за счет приобретения и экспрессии генов различных токсических субстанций, а также молекулярные механизмы их взаимодействия с организмом хозяина, обмена генетической информацией, накопления и утраты детерминант факторов, неидентичных структурно, но сходных функционально. На основе анализа литературных и собственных данных предложена концепция о взаимозаменяемости факторов патогенности, которая позволяет штаммам, лишенным генов холерного токсина, восстанавливать и поддерживать патогенетический потенциал возбудителей острых диарейных заболеваний.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, токсины, эффекторы, системы секреции, факторы колонизации, бактериофаги.

E.V.Monakhova

**Cholera Vibrio Virulence Strategy and Ways of its Realization (Scientific Review)***Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

The basic ways of *Vibrio cholerae* virulence strategy realization through acquisition and expression of genes of various toxic substances are discussed. Considered are molecular mechanisms responsible for interaction between host organism and cholera vibrios, as well as for genetic information exchange, for accumulation and loss of determinants of factors, which are non-identical structurally but functionally similar. Based on the analysis of literature data and personal observations put forward is a conception of pathogenicity factor intersubstitutability allowing for restoration and maintenance of pathogenetic potential of severe diarrheal disease agents among the strains deprived of cholera toxin genes.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, toxins, effectors, secretion systems, colonization factors, bacteriophages.

Холерные вибрионы биовара эльтор отличаются повышенной изменчивостью по сравнению со своими классическими предшественниками, очевидно, обусловленной крайней пластичностью их генома. На протяжении седьмой пандемии холеры отмечено формирование новых клонов с различными, часто уникальными сочетаниями генов, связанных с проявлением вирулентности. При этом наряду с появлением возбудителей холеры, обладающих более мощным эпидемическим потенциалом [9, 19], наблюдается возникновение высоковирулентных штаммов, лишенных генов холерного токсина (СТ), но экспрессирующих гены дополнительных факторов патогенности. Такие штаммы встречаются среди представителей как O1, так и неO1/неO139 серогрупп [5, 20, 28, 41]. На сегодняшний день у холерных вибрионов выявлен целый ряд токсических субстанций, и полидетерминантный характер патогенности вида *Vibrio cholerae* уже не вызывает сомнений. В настоящем обзоре рассматриваются основные способы поддержания возбудителем патогенетического потенциала за счет приобретения и экспрессии тех или иных генов, а также способы его взаимодействия с организмом хозяина.

**Факторы патогенности холерных вибрионов и их взаимозаменяемость.** Сравнительный анализ механизмов действия различных токсических субстанций показал, что вирулентность *V. cholerae* может определяться продукцией целого ряда фак-

торов, которые неидентичны структурно, но сходны функционально, т.е. используют несколько путей для достижения одного и того же результата – развития острого диарейного синдрома. Эти взаимозаменяемые факторы можно разделить на следующие основные группы.

**Токсины, повышающие уровни циклических нуклеозидмонофосфатов.** Как известно, основным фактором патогенности СТ представляет собой классический пример АВ-токсина, состоящий из одной А- и пяти В-субъединиц с молекулярными массами (ММ) 29,4 и 14 кДа соответственно. В-субъединицы адсорбируются на специфическом рецепторе – моноганглиозиде GM<sub>1</sub>, образуя канал, через который процессорированная А-субъединица (А1, ММ 25 кДа) поступает в цитоплазму клетки хозяина и осуществляет АДФ-рибозилирование α-субъединицы специфического белка Gs, которое приводит к ингибированию свойственной ему ГТФазной активности. В результате происходит конститутивная активация аденилатциклазы (АС), локализованной в базолатеральной мембране энтероцита. Повышение уровня цАМФ является ключевым звеном в развитии типичной клинической картины холеры [42]. Однако вполне вероятно, что СТ не единственный активатор АС, которым обладают холерные вибрионы. Другим «претендентом» на эту роль является описанный группой индийских авторов [48] novel toxin, или токсин WO7 (по названию клинического нехолеро-

генного штамма *V. cholerae* O1, из которого он был выделен). Он также обладает субъединичной структурой, но его субъединицы отличаются от таковых СТ как по ММ (58 и 40 кДа), так и по N-концевым последовательностям. WO7 вызывает удлинение клеток СНО и накопление жидкости в изолированных петлях кишечника кролика, превосходя СТ по активности в 10 раз. Это сопровождается повышением уровней цАМФ и протеинкиназы А (РКА) [12, 48]. Наибольший интерес представляет способность WO7 связываться с  $GM_1$ , т.е. последний, вероятно, может служить ему рецептором. Точный механизм действия WO7 не установлен, как и способ проникновения в клетку хозяина. Авторы предполагают, что он взаимодействует с мембранным гликопротеином (МР) и каким-то образом (возможно, через G-белки) активирует фосфолипазу  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ), которая гидролизует фосфатидил-инозит-дифосфат (PIP<sub>2</sub>) с образованием инозитолтрифосфата (IP<sub>3</sub>) и диацилглицерина (DAG). IP<sub>3</sub> мобилизует  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных запасов, а DAG активирует протеинкиназу С (PKC), которая наряду с фосфорилированием белков осуществляет индукцию АС [12].

Кроме цАМФ, нарушение секреции в кишечнике может обуславливать и цГМФ. Альтернативным способом вызывать быстрое развитие тяжелой диареи является способность некоторых штаммов к продукции другого, термостабильного, токсина (ST) – активатора корпускулярной гуанилатциклазы (GC-C). ST представляет собой короткий пептид из 17 аминокислотных остатков с ММ 1,8 кДа, образующийся в результате процессинга первичного продукта гена *stn/sto*. Он высоко гомологичен термостабильному токсину *E. coli* (Sta), поэтому детально изученный механизм действия последнего, по всей видимости, может рассматриваться как идентичный таковому ST *V. cholerae* [22]. ST служит лигандом, соединяющимся с внеклеточным рецепторным доменом трансмембранного гликопротеина GC-C, который «пронизывает» апикальную мембрану энтероцита щеточной каймы. Это событие приводит к конформационным изменениям молекулы GC-C, следствием которых является активация ее внутриклеточного каталитического домена, и уровень цГМФ в клетке резко повышается. В результате происходит активация цГМФ-зависимой протеинкиназы (PKG), фосфорилирующей белки.

Упрощенная схема нарушения водно-электролитного баланса в кишечнике тремя описанными токсинами представлена на рис. 1, из которого видно, как совершенно различные по структуре и начальным этапам биологического действия факторы в конечном итоге вызывают один и тот же эффект. Изложенное делает очевидным тот факт, что холерные вибрионы постепенно приобретают способность к продукции токсинов, представляющих собой более или менее адекватную замену СТ. В отличие от генов СТ (*ctxAB*), широко распространенных среди клинических штаммов *V. cholerae*, наличие гена

*stn/sto* и способность к его экспрессии характерна в основном для нехолерогенных вибрионов O1 и неO1/неO139 серогрупп, однако в литературе встречаются сообщения о штаммах, одновременно содержащих гены *stn/sto* и *ctxAB* [41, 44]. Довольно редкая встречаемость генов *stn/sto* может свидетельствовать о сравнительно недавнем их приобретении. Это предположение вытекает из факта, что ген фланкирован 123-нуклеотидными прямыми повторами VCR, которые входят в состав локализованного на малой хромосоме мегаинтегрона, ответственного за «захват» чужеродных генов. WO7 представляет особый случай. Несмотря на то, что с момента описания этого токсина прошло более 10 лет, на сегодняшний день он обнаружен всего у одного штамма, и распространение его среди представителей *V. cholerae* неизвестно. Его генетические детерминанты до сих пор не идентифицированы, и определенные авторами 15N-концевые последовательности обеих субъединиц не имеют гомологов среди белков, представленных в базах GenBank, за исключением единственного найденного нами существенного совпадения для N-конца 58 кДа-субъединицы с белком наружной мембраны OmpU *V. cholerae* (P97085). Однако OmpU имеет намного меньшую ММ (34,65 кДа), относится к классу поринов, связан с клеткой, известен как фактор колонизации/персистенции [16], и для него не описаны свойства, характерные для WO7, кроме способности агглютинировать эритроциты кролика, но эта гемагглютинация, в отличие от обусловленной WO7, ингибируется моносахарами. Во всех работах, посвященных этому токсину, по-прежнему упоминается только один штамм-продуцент *V. cholerae* WO7, и говорится о том, что он был выделен от больного с тяжелым холероподобным заболеванием во время

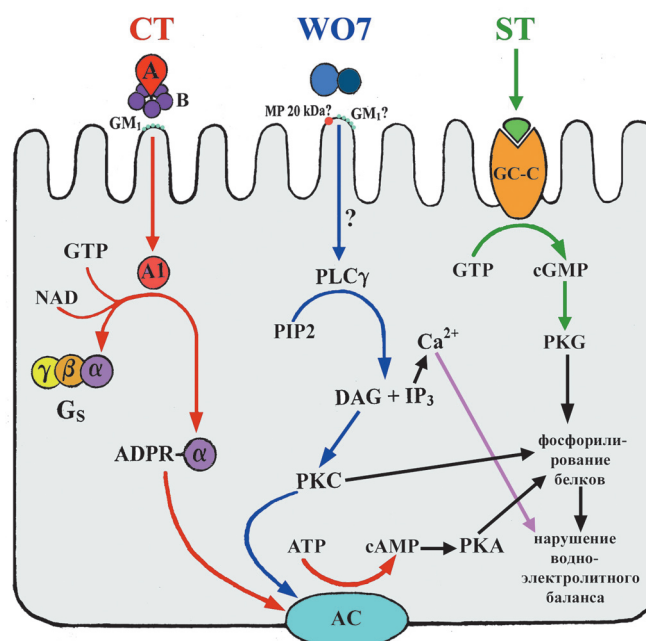


Рис. 1. Пути повышения уровней циклических нуклеозидмонофосфатов тремя различными по структуре токсинами холерных вибрионов (пояснения в тексте)

крупной вспышки холеры в Южной Индии, но носила ли эта вспышка клональный характер, не указано. Поэтому на данном этапе ответить на вопрос о том, является ли WO7 действительно уникальным и совсем недавним, не успевшим распространиться «приобретением» холерных вибрионов, не представляется возможным. И все же, по мнению авторов, WO7, несмотря на явное отличие от СТ, является его функциональным гомологом и одним из ключевых факторов в нарушении электролитного баланса и развития холероподобной симптоматики [12].

**Порообразующие токсины.** Картина, аналогичная описанной для активаторов АС и GC-C, наблюдается и среди токсинов-порообразователей. Самым известным и наиболее хорошо изученным из них является растворимый гемолизин/цитотоксин HlyA, ген которого видоспецифичен и экспрессируется, как правило, нехолерогенными штаммами вибрионов эльтор и многими штаммами неO1/неO139 серогрупп независимо от холерогенности. Образованные им поры в мембране представляют собой гомопентамеры [48], субъединицы которых могут быть представлены как первичным продуктом гена *hlyA* (pro-HlyA) с ММ 79 кДа, так и зрелым белком (ММ 65 кДа). Последний образуется в результате процессинга первого под действием гемагглютинина/протеазы (НА/Р) холерных вибрионов, трипсина и ряда других протеаз, что сопровождается резким повышением гемолитической и цитолитической активности [3, 47].

Низкомолекулярный (11,4 кДа) белок Ace (accessory cholera enterotoxin), ген которого входит в состав профагов СТХ и pre-СТХ [3, 13], сам по себе обладает свойствами ион-проницаемой поры [7]. Способность интегрировать в клеточную мембрану за счет наличия двух трансмембранных доменов объясняет его токсичность для клеток кишечника, выражающуюся в нарушении их ионного баланса.

Наконец, лишь у отдельных штаммов встречается ген термостабильного прямого гемолизина (TDH), ключевого фактора патогенности *V. parahaemolyticus* [5, 35]. Это белок с ММ 23 кДа, при порообразовании формирующий гомотетрамеры за счет дисульфидных связей. Поры имеют довольно крупные размеры, что, вероятно, объясняет низкий уровень ионной избирательности и позволяет воде и ионам проходить сквозь мембрану с наименьшим сопротивлением [50]. Ген и способность к продукции TDH-родственного гемолизина (TRH), обладающего такой же структурой и биологической активностью, пока была выявлена всего у одного штамма *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы [33].

Несмотря на структурные различия, все эти токсины способны повышать проницаемость мембраны, а в высоких дозах вызывают гибель клеток кишечника.

**Модуляторы актина.** Жизнеспособность эукариотических клеток во многом зависит от состояния их актинового цитоскелета. Для выполнения им множества функций (поддержание полярности и

подвижности клеток, цитокинез и эндоцитоз) необходимо сохранение динамического равновесия между G-актином (мономером) и F-актином (полимером). У холерных вибрионов имеется целый набор токсических субстанций, разными путями сдвигающих это равновесие в ту или другую сторону. Среди модуляторов актина отчетливо выделяются две подгруппы, различающиеся по характеру воздействия на клетки и ткани макроорганизма. К первой относятся токсины, разрушающие компоненты межклеточных контактов, что приводит к повышению в основном межклеточной проницаемости. Один из них, Zot (zonula occludens toxin), кодируемый геном в составе профагов СТХ и pre-СТХ, представляет собой белок с ММ 12 кДа, образующийся в результате процессинга исходного продукта гена *zot* (45 кДа) под действием специфических протеаз, синтезируемых холерными вибрионами (второй продукт этого процессинга с ММ 33 кДа не является токсином, а участвует в фаговом морфогенезе) [7]. В настоящее время 12 кДа форму Zot принято обозначать как ΔG [32]. Проникая в клетку и активируя фосфолипазу C, Zot запускает каскад событий, приводящих к полимеризации G-актина в F-актин (рис. 2, а). В результате происходит ослабление плотных контактов (tj, tight junctions), и поверхность клеток, доступная для адсорбции других белков, резко увеличивается [22]. Само по себе это явление не представляет особой опасности и, более того, в настоящее время интенсивно изучается с точки зрения использования ΔG, а вернее, его активного домена АТ1002, в качестве адъюванта для перорального применения лекарственных препаратов, которые обычно не всасываются в кишечнике (например, инсулина). Однако в присутствии других токсинов *V. cholerae* процесс принимает патологический характер, и при заражении экспериментальных животных на ультратонких срезах мы можем наблюдать отделение клеток кишечника друг от друга, от базальной мембраны и даже их слущивание (рис. 2, б) [2].

Другой модулятор актина, гемагглютинин/протеаза (НА/Р), белок с ММ 69,3 кДа (в зрелой форме 32 кДа), имеет иной механизм действия (рис. 2, в). Она расщепляет трансмембранный белок окклюдина на два фрагмента [49], в результате связанный с ним белок ZO1 теряет связь с цитоплазматической мембраной. Однако это не приводит к разрушению tj. Вместо этого как в культуре клеток кишечника, так и в кишечнике *in vivo* наблюдается расширение межклеточных промежутков ниже zonula occludens, вероятно, в области адгезивных контактов, а апикальные части клеток остаются соединенными (рис. 2 г, д). Возможно, это связано с сохранением внеклеточных доменов окклюдина [8] либо с другим компонентом плотных контактов – белками клаудинами, действие НА/Р на которые еще не изучалось. Жидкость накапливается большей частью в стенках кишечника, и развивается интерстициальный отек [1]. Следует отметить, что NMDCY (non-membrane-damaging



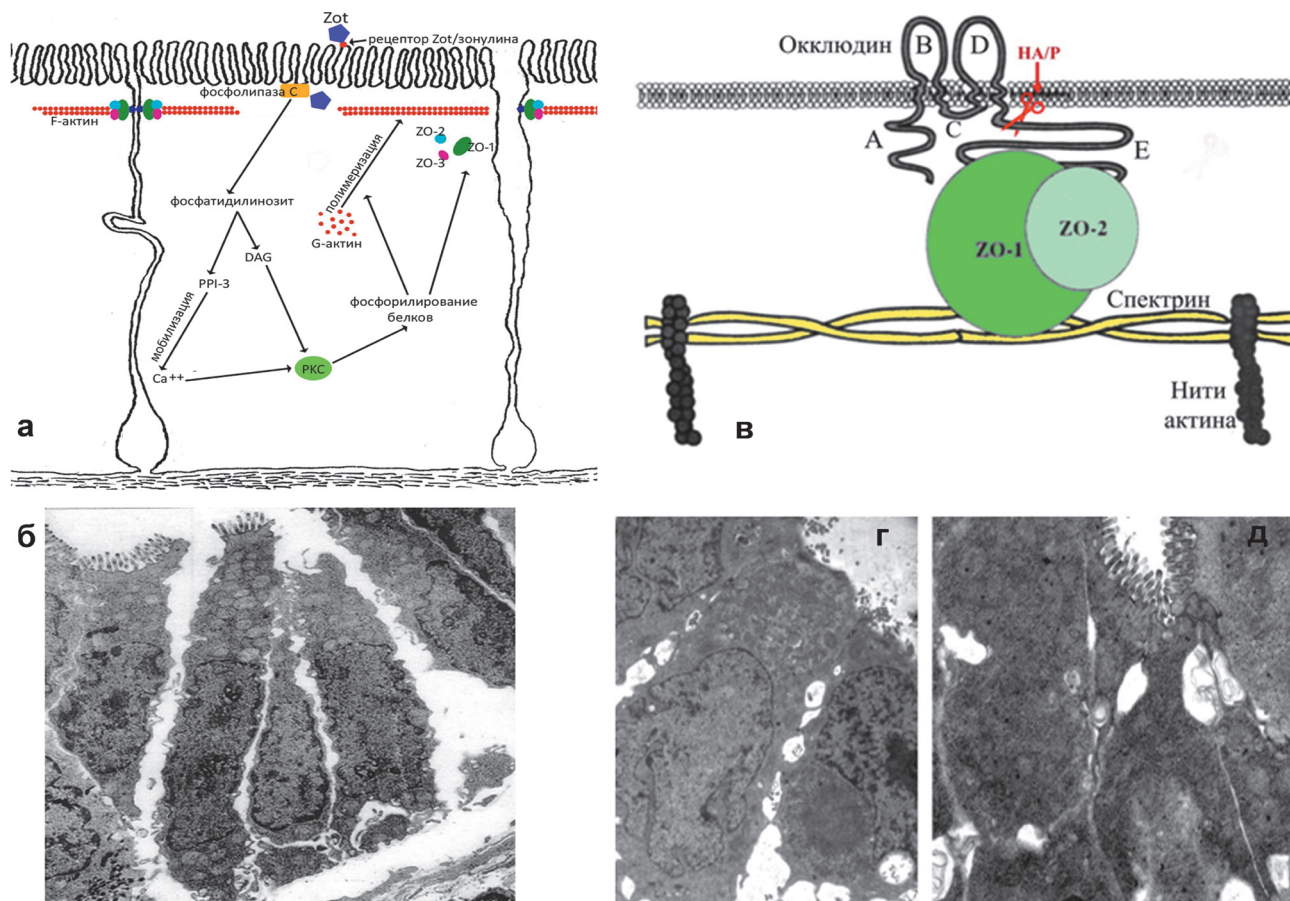


Рис. 2. Увеличение межклеточной проницаемости под действием токсинов холерных вибрионов – модуляторов актина:

а – механизм разрушения тж под действием Zot (схема); б – деструкция тж и расхождение эпителиоцитов в кишечнике кролика-сосунка, зараженного штаммом холерного вибриона, содержащего гены Zot и других токсинов,  $\times 2000$  [2]; в – механизм действия HA/P (схема); г–д – образование лакун между смежными эпителиоцитами при сохранении тж соответственно в культуре клеток CaCo-2 ( $\times 4200$ ) и в кишечнике мышей-сосунков ( $\times 5000$ ) под действием HA/P [1, 8]

cytotoxin), ранее описанный как самостоятельный токсин [39], впоследствии оказался идентичным HA/P [3], и эти названия следует рассматривать как синонимы.

Вторая подгруппа актиномодуляторов включает факторы, воздействующие на сами эукариотические клетки. Вызываемые ими нарушения зачастую влекут за собой гибель клеток, в том числе макрофагов, что способствует беспрепятственному размножению вибрионов и колонизации кишечника (рис. 3). К ним относится, в частности, эффектор системы секреции третьего типа (T3SS) VopF либо его аналог VopN. После транслокации в клетку хозяина через комплекс иглы T3SS они вызывают нуклеацию актина – начальную стадию его полимеризации, и равновесие резко сдвигается в сторону F-актина [46]. Еще два фактора – MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin) [23] и эффектор системы секреции шестого типа (T6SS) VgrG1 [38], напротив, препятствуют полимеризации. Они кодируются совершенно разными генами, в составе разных кластеров, и используют разные системы секреции: MARTX транспортируется во внеклеточное пространство через атипичную систему 1-го типа, а затем прони-

кает в клетку [23], тогда как VgrG1 транслоцируется через комплекс иглы T6SS, причем только после эндоцитоза вибрионов клеткой хозяина [29]. Вместе с тем они обладают структурно, функционально, а возможно, и филогенетически родственными актин-связывающими доменами (ACD) [23, 38]. Эти домены ковалентно связывают мономеры G-актина в конформации, несовместимой с полимеризацией, что вызывает необратимое нарушение актинового цитоскелета. Действие MARTX дополнительно усугубляется еще и тем, что он препятствует нормальной полимеризации G-актина в F-актин за счет активности другого домена – RID (Rho GTPase inactivation domain), который может оказывать токсический эффект и независимо от ACD [11].

**Ингибиторы синтеза белка.** Еще одним способом токсического действия является ингибирование синтеза белка в клетках хозяина. К таким ингибиторам относится шигаподобный токсин Slt1. Это типичный АВ-токсин, А-субъединица которого действует как N-гликозидаза, отщепляющая один остаток аденина от 28S-рРНК эукариотической рибосомы [42]. Он встречается у энтерогеморрагических штаммов кишечной палочки, а возможность присут-

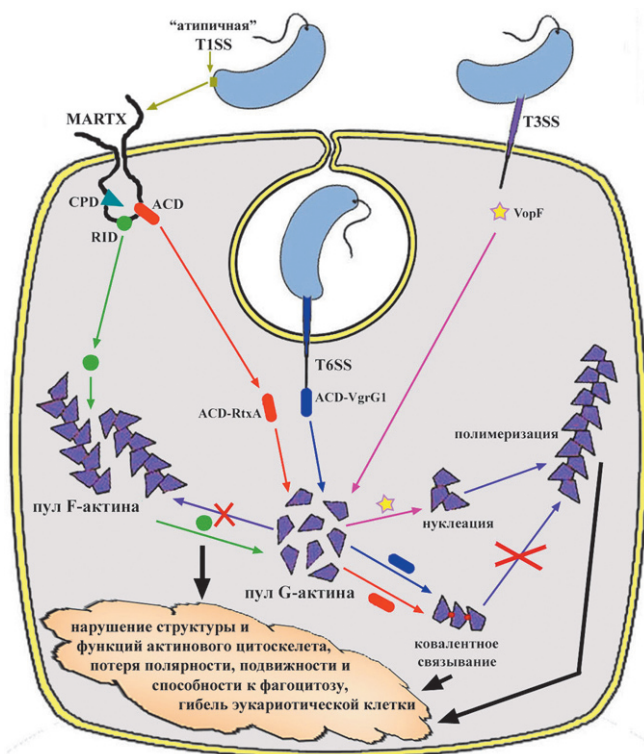


Рис. 3. Механизмы действия токсинов холерных вибрионов – модуляторов актина на эукариотические клетки (пояснения в тексте)

ствия его у холерных вибрионов сомнительна. Всего в одной публикации [36] сообщалось о способности *V. cholerae* к продукции токсина, иммунологически родственного SltI, но гены этого токсина у них до сих пор не были выявлены. С другой стороны, эти гены связаны с фагом [36, 42], а искусственно созданный вакцинный штамм *V. cholerae* оказался способным к экспрессии *sltB* [48]. Поэтому нельзя полностью исключить, что они могут быть приобретены холерными вибрионами, возможно, уже были приобретены какими-то единичными штаммами и еще не успели распространиться в популяции. В то же время у холерных вибрионов есть другой блокатор белкового синтеза. Это cholix-токсин, совершенно отличный от SltI по структуре и механизму действия. Обладая рибозилтрансферазной активностью, он модифицирует фактор элонгации 2 подобно дифтерийному токсину и экзотоксину А псевдомонад. Cholix-токсин вызывает гибель культивируемых клеток за счет их апоптоза. Его ген достаточно широко распространен среди холерных вибрионов [26].

**Токсины с неизвестным механизмом действия.** Отдельную группу мы выделяем факторы, причастность которых к патогенезу показана, но механизм действия пока не установлен. В их число входит цитотонический фактор Cef (CHO cell elongating factor) – белок с ММ ~85 кДа, обладающий эстеразной активностью, вызывающий накопление жидкости в кишечнике мышей-сосунков и удлинение культивируемых клеток нескольких линий [6, 30]. При электронно-микроскопических исследованиях с

использованием обеих моделей было выявлено обезвреживание клеток и повреждение их органелл [6]. Однако биологическое действие Cef не связано с повышением уровня цАМФ [30]. Молекула Cef обладает активным центром сериновых липаз/эстераз, но этот домен не отвечает за биологическое действие [4], а как именно он работает в кишечнике, предстоит еще выяснить. Второй токсин с неизвестным механизмом действия – это недавно идентифицированная сериновая протеаза (ММ 59 кДа), вызывающая деградацию ворсин, накопление геморрагической жидкости в кишечнике экспериментальных животных и повреждение всех слоев его слизистой [43].

Наконец, в литературе был описан еще один токсин с неизвестными генетическими детерминантами и неустановленным механизмом действия – NCT (new cholera toxin) [40], однако в дальнейшем нами было показано, что он представляет собой варьирующую по качественному и количественному составу смесь нескольких из перечисленных выше токсинов, компонентами которой, как правило, являются НА/Р и Cef.

**Факторы колонизации.** Кроме токсических субстанций, важная роль в патогенности холерных вибрионов принадлежит факторам адгезии, обеспечивающим колонизацию тонкого кишечника. К ним относится целый ряд связанных с клеткой пилинов: Сер (core encoded pilin), кодируемый геном в составе СТХ и pre-СТХ; токсин-корегулируемые пили адгезии TCP, за образование которых отвечает кластер генов в составе острова патогенности VPI; белки наружной мембраны Omp и др. Маннозочувствительные пили (MSHA) большей частью связывают с персистенцией в водоемах за счет формирования биопленок [17], однако их роль как факторов колонизации кишечника полностью не исключается. Штаммы, несущие СТХ либо pre-СТХ, как правило, содержат детерминанты всех или, по крайней мере, большинства этих факторов [5], СТХ/pre-СТХ<sup>-</sup> (лишенные генов *ser* и *tcpA*) могут колонизировать кишечник за счет продукции других адгезинов. Кроме того, показана высокая колонизирующая способность вибрионов, экспрессирующих T3SS [45] и T6SS [29], механизм которой точно не установлен. Не исключено, что она является следствием «заякоривания» комплекса иглы в мембране клеток-мишеней. Повышение адгезивной активности может также обеспечиваться NanH, MARTX и HlyA [25, 37].

#### Молекулярные механизмы поддержания патогенетического потенциала

**«Молекулярная мимикрия».** В процессе эволюции холерные вибрионы «научились» использовать различные, порой «изохронные» способы взаимодействия с организмом хозяина. Одним из таких способов является использование своеобразной «мимикрии», или имитации токсинами и эффекторами бактерий структуры и функций эукариотических факторов, необходимых для поддержания гомеостаза в макроорганизме. По образному выражению A. Fasano



[22], холерные вибрионы, как и многие другие возбудители кишечных инфекций, «проявляют незаурядные умственные способности, ведя искусную подрывную деятельность по отношению к функциям клеток-мишеней и эксплуатируя их для получения собственной выгоды. Имитируя эукариотические сигнальные факторы, они подстраивают под себя активность регуляторных путей хозяина с помощью токсинов, обладающих поразительным сходством с модуляторами клеточной и межклеточной проницаемости». Мы полагаем, что данная «мимикрия» может в определенной степени препятствовать выработке специфических антител против факторов-«имитаторов», которые не воспринимаются иммунной системой как чужеродные антигены.

На сегодняшний день для холерных вибрионов достоверно установлено наличие трех случаев такой «мимикрии»:

- Zot – зонулин. Собственно токсин Zot, или ΔG [32], является аналогом функционально и иммунологически родственного ему эндогенного модулятора плотных контактов зонулина, осуществляющего физиологическую регуляцию межклеточной проницаемости ткани, и использует его рецептор [22];

- ST – гуанилин. ST является «суперагонистом» эндогенного гормона гуанилина, естественного активатора GC-C, необходимого для поддержания гомеостаза в кишечнике. ST на 50 % гомологичен гуанилину и превышает его по активности в 40 раз [22];

- VopF – формин/Spire. Молекула эффектора T3SS VopF содержит несколько доменов, сходных с таковыми эукариотических нуклеаторов актина – формина (FH1, FH2) и Spire (WH2), участвующих в поддержании гомеостаза актинового цитоскелета [45].

*Дублирование генов, структуры и функций их продуктов.* Интенсивное развитие молекулярных исследований геномов холерных вибрионов позволило наблюдать и такое интересное явление, как дублирование генов либо их участков, кодирующих активные домены факторов патогенности. Самый известный пример – дубликация профагов CTX и pre-CTX. Существуют штаммы, одновременно содержащие CTX и pre-CTX, т.е. у них (как и несущих тандем из двух pre-CTX) дублированы гены *sep*, *zot* и *ace*. [27]. У «гибридных» мозамбикских штаммов, выделенных в 2005 г., кроме тандема из двух профагов CTX на малой хромосоме (который присутствует и у штаммов, выделенных там же в 2004 г.) есть еще одна, «запасная» копия на большой хромосоме [19]. Две копии в составе большой и малой хромосом имеет ген транслокона T6SS *hcp* [38]. Актин-связывающий домен ее эффектора ACD-VgrG1 является гомологом и вероятным предшественником уникального домена ACD-RtxA [23]. Холерогенные штаммы Бенгал, утратившие ген *nanH* вместе с центральной частью острова VPI-2, каким-то образом приобрели другую нейраминидазу [10], происхождение которой можно будет установить после идентификации ее генетиче-

ских детерминант. Не исключено, что альтернативная нейраминидаза не является строго специфичной для вибрионов Бенгал и что ее ген(ы) также могут быть приобретены горизонтально.

Создается впечатление, будто холерные вибрионы в процессе эволюции накапливали и продолжают накапливать «про запас» гены, кодирующие разные факторы патогенности. Тогда в случае повреждения либо утраты одних генов всегда можно активизировать другие, восстановив тем самым реализуемую *V. cholerae* общую стратегию вирулентности.

*Утрата «дублирующих» генов и энергосбережение.* С другой стороны, иногда прослеживается и прямо противоположный процесс – утрата либо повреждение некоторых «дублирующих» генов или детерминант активных доменов, поддержание экспрессии которых может быть энергетически невыгодно. Например, как полагали S.T.Miyata и соавт. [34], классические штаммы «специально» накопили мутации, выводящие из строя T6SS, за ее ненужностью, тогда как штаммы эльтор сохранили «в резерве» способность к ее экспрессии. Результаты наших исследований также показали, что одновременное присутствие детерминант ACD-VgrG1 и ACD-RtxA, ACD-VgrG1 и кластера генов T3SS, профага CTX и T3SS характерно лишь для меньшинства штаммов [5].

*Факторы патогенности – продукты генов мобильных генетических элементов и множественность путей их горизонтальной передачи.* Своеобразным путем реализации холерными вибрионами стратегии вирулентности представляется «эксплуатация» в качестве факторов патогенности продуктов генов *sep*, *ace* и *zot*, входящих в состав геномов филаментозных фагов CTXφ и pre-CTXφ и необходимых для фагопродукции [7, 13, 21]. Гены *ctxAB* не являются собственно фаговыми и не имеют отношения к вирогению. Они были приобретены фагом pre-CTXφ, в результате чего образовался CTXφ [13], который стал основным фактором их горизонтального переноса в клетки нехолерогенных штаммов. В настоящее время общеизвестна способность TCR служить ему рецептором. Однако их наличие является необходимым, но не достаточным условием эффективного проникновения фага в бактериальную клетку, для этого необходимы также продукты генов *tol*-кластера (TolQRA) [24]. Они способны обеспечивать горизонтальную передачу CTXφ даже в отсутствие TCR, хотя вероятность такого события довольно низка. Кластер генов *tolQRA* по всей видимости видоспецифичен [5], что вполне объяснимо с точки зрения показанного A.J.Heilpern, M.K.Waldor [24] участия их продуктов в поддержании целостности наружной бактериальной мембраны. Вторым альтернативным путем передачи генов CTX является неспецифическая трансдукция гетерологичными фагами. К ним относятся, в частности, VGJφ, переносящий CTXφ с более высокой частотой, чем при собственной TCR-зависимой трансдукции, и сходный с ним VEJφ [15]. Оба используют для адсорбции пили MSHA и



после проникновения в бактериальную клетку интегрируют в *attRS* либо в альтернативные *dif*-подобные сайты. Представители O1 серогруппы располагают еще и третьим путем – за счет трансдукции СТХ фагом CP-T1, рецептором которому служит O1-антиген. Вместе с геномом СТХ этот фаг часто «захватывает» и переносит и близлежащие гены RTX-кластера [14]. На самом деле число фагов, переносящих гены СТХ-элемента, вероятно, значительно больше [22]. Такая способность была выявлена у некоторых фагов, содержащих двухцепочечную ДНК, выделенных из морской воды [18]. Предположительно, переносить СТХ может и VSK [15].

Таким образом, холерные вибрионы извлекают определенную выгоду даже из взаимоотношений с внутриклеточными паразитами, используя их в качестве «транспортного средства» для распространения генов факторов патогенности в тотальной популяции вида.

Сам VPI был первоначально описан как другой филаментозный профаг, способный к образованию репликативной формы и инфекционных вирионов, однако ряд авторов опровергают это положение, не отрицая, однако, фагового происхождения острова [21]. Это же можно сказать и о VPI-2, обладающем всеми свойствами острова патогенности. Предполагалось, что он был приобретен за счет горизонтальной передачи, но впоследствии утратил мобильность [25]. Тем не менее, было показано, что VPI может передаваться от штамма к штамму фагом CP-T1, а VPI-2 способен к образованию внехромосомных элементов, которые, возможно, представляют первую стадию трансдукции, что требует экспериментальной проверки [21].

Не следует также забывать о таких путях генетического обмена, как конъюгация и трансформация, способность к которой у естественно некомпетентных холерных вибрионов может быть обретаема в присутствии хитина водных ракообразных [31].

Таким образом, краткий анализ структуры и функций известных на сегодняшний день факторов патогенности холерных вибрионов показал, что в распоряжении возбудителя имеется достаточно весомый «арсенал стратегических вооружений» для проявления вирулентности. Все его составляющие практически никогда не используются одновременно одним и тем же штаммом, вероятно, по причине энергетической выгоды, однако их генетические детерминанты представлены в общей популяции патогенного вида *V. cholerae*, будучи «распределены» по геномам его представителей в различных сочетаниях. Это предполагает возможность обмена генетическим материалом за счет процессов горизонтальной передачи, чему может способствовать наличие большого числа мобильных элементов и мегаинтегрона, а также «транспортных средств», представленных множеством бактериофагов, осуществляющих специфическую и неспецифическую трансдукцию. Следует отметить также, что при-

веденное здесь разделение факторов патогенности на группы по конечному результату их действия на клетки макроорганизма является весьма условным и несколько не претендует на статус исчерпывающей классификации. Оно было использовано нами с целью более наглядной иллюстрации взаимозаменяемости токсических субстанций, обладающих разными способами биологического действия, но в конечном итоге вызывающих развитие острого диарейного синдрома. Очевидно, этой взаимозаменяемостью объясняются неудачи при попытке создания совершенно неактивных живых холерных вакцин. Несмотря на то, что способность к эпидемическому распространению характерна только для холерогенных (*ctxAB*<sup>+</sup>) штаммов, в основном O1 серогруппы, на протяжении седьмой пандемии неоднократно наблюдались как спорадические случаи, так и вспышки тяжелых холероподобных заболеваний, обусловленных нехолерогенными (*ctxAB*<sup>-</sup>) штаммами [5, 20, 28, 41]. Экспрессия ими дополнительных факторов патогенности нередко приводит не только к нарушениям водно-электролитного баланса, но и к возникновению воспалительных процессов в кишечнике, которые менее выражены при действии СТ. Известно, например, что способностью вызывать воспаление, наряду с рассмотренными нами типами активности, обладают MARTX, WO7, HA/P, HlyA, T3SS и T6SS [12, 23, 29, 42, 46, 48]. Кроме того, экспрессия структурных генов зависит от сложных систем регуляции. Эти аспекты остались за пределами настоящего обзора и требуют отдельного рассмотрения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бардахчян Э.А., Монахова Е.В., Харланова Н.Г., Саямов С.Р., Писанов Р.В. Ультраструктурные изменения тонкой кишки мышей-сосунков, вызванные действием гемагглютининов/протеаз холерных вибрионов. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2008; 145(4):475–80.
2. Бардахчян Э.А., Харланова Н.Г., Ломов Ю.М., Ткачева Т.И. Ультраструктурные изменения эпителиоцитов и сосудов микроциркуляторного русла тонкой кишки кроликов-сосунков, инфицированных холерными вибрионами. *Морфология.* 2001; 120(5):79–84.
3. Монахова Е.В., Писанов Р.В. Сравнительный анализ литературных и компьютерных данных о свойствах цитотоксического фактора NMDCY и гемагглютининов/протеаз холерных вибрионов. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 1(91):15–20.
4. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Мазрухо А.Б., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Свойства Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов: биоинформационный анализ и экспериментальные данные. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 2:10–14.
5. Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Божко Н.В. ПЦР-детекция генов системы секреции третьего типа (TTSS) и других факторов патогенности/персистенции у холерных вибрионов различных серогрупп. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2010; 6:20–5.
6. Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Мазрухо А.Б., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Изучение биологического действия цитотоксического фактора Cef холерных вибрионов на моделях *in vitro* и *in vivo*. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):62–5.
7. Писанов Р.В. Zot и Ace – дополнительные токсины, входящие в состав кассеты вирулентности холерных вибрионов. *Пробл. особо опасных инф.* 2002; 1(83):15–21.
8. Саямов С.Р., Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Ткачева Т.И., Маркина О.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В., Бардахчян Э.А. Ультраструктурные изменения в культивируемых клетках под действием гемагглютининов/протеаз холерных вибрионов. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2011; 152(10):438–42.
9. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев

- В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эль-тор, изолированных на территории России в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2011; 3:11–8.
10. Шиманюк Н.Я., Дуванова О.В., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Нейраминидаза *Vibrio cholerae* O139 «Бенгал»: обнаружение, очистка и некоторые свойства. *Биотехнология.* 1999; 3:56–62.
11. Ahrens S., Geissler B., Satchell K.J. Identification of a His-Asp-Cys catalytic triad essential for function of the Rho inactivation domain (RID) of *Vibrio cholerae* MARTX toxin. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(2):1397–408.
12. Bhattacharyya S., Gosh S., Shant J., Ganguly N.K., Majumdar S. Role of the W07-toxin on *Vibrio cholerae*-induced diarrhoea. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1670:69–80.
13. Boyd E.F., Heilpern A.J., Waldor M.K. Molecular analysis of a putative CTX $\phi$  precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX $\phi$ s by toxigenic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(19):5530–38.
14. Boyd E.F., Waldor M.K. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTX $\phi$  by bacteriophage CP-T1. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):5898–905.
15. Campos J., Martinez E., Izquierdo Y., Fando R. VEX $\phi$ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. *Microbiology.* 2010; 156(1):108–15.
16. Chakrabarti S.R., Chaudhuri K., Sen K., Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *J. Bacteriol.* 1996; 178(2):524–30.
17. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):3220–5.
18. Choi S., Dunams D., Jiang S.C. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(3):1015–22.
19. Choi S.Y., Lee J.H., Kim E.J., Lee H.R., Jeon Y.S., von Seidlein L., Deen J., Ansaruzzaman M., Lucas M., Barreto A., Songane F., Mondlane C., Nair G.B., Czerkinsky C., Clemens J.D., Chun J., Kim D.W. Classical RS1 and environmental RS1 elements in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring a tandem repeat of CTX prophage: revisiting Mozambique in 2005. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59(3):302–8.
20. Dutta D., Chowdhury G., Pazhani G.P., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Rajendran K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya M.K., Mitra U., Takeda Y., Nair G.B., Ramamurthy T. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhoea, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19:464–7.
21. Faruque, S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence.* 2012; 3(7):556–65.
22. Fasano A. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut.* 2002; 50(Suppl 3):iii9–iii14.
23. Fullner Satchell K.J. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect. Immun.* 2007; 75(11):5079–84.
24. Heilpern A.J., Waldor M.K. CTX $\phi$  infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products. *J. Bacteriol.* 2000; 182(6):1739–47.
25. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VP-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology.* 2002; 148:3681–93.
26. Jørgensen R., Purdy A.E., Fieldhouse R.J., Kimber M.S. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(16):10671–8.
27. Ledón T., Campos J., Suzarte E., Rodríguez B., Marrero K., Fando R. El Tor and Calcutta CTX $\phi$  precursors coexisting with intact CTX $\phi$  copies in *Vibrio cholerae* O139 isolates. *Res. Microbiol.* 2008; 159(20):81–7.
28. Lizárraga-Partida M.L., Quilici M.-L. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 clinical strains, including new nontoxigenic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic years between 1991 and 2000. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1364–71.
29. Ma A.T., McAuley S.B., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion system requires bacterial endocytosis by host cell. *Cell Host Microbe.* 2009; 5:234–43.
30. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72.
31. Meibom K.L., Blakesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science.* 2005; 310(5755):1824–7.
32. Menon D., Karyekar C.S., Fasano A., Lu R., Eddington N.D. Enhancement of brain distribution of anticancer agents using DeltaG, the 12 kDa active fragment of ZOT. *Int. J. Pharm.* 2005; 306(1–2):122–31.
33. Miller K.A., Hamilton E., Dziejman M. The *Vibrio cholerae* *trh* gene is coordinately regulated in vitro with type III secretion system genes by VtrR(A)/VtrR(B) but does not contribute to Caco2-BBE cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* 2012; 80(12):4444–55.
34. Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1:117.
35. Nishibuchi M., Khaomaneemai V., Honda T., Kaper J.B., Miwatani T. Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *V. mimicus*, and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 67:251–6.
36. O'Brien A.D., Holmes R.K. Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1987; 51(2):206–20.
37. Olivier V., Queen J., Satchell K.J.F. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins. *PLoS One.* 2009; 4:e7352.
38. Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 12(1):1–7.
39. Saha P.K., Koley H., Nair G.B. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane-damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3101–8.
40. Sanyal S.C. A new diarrhoeagenic cholera toxin. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1990; 9(1):125.
41. Sarkar B., Bhattacharya T., Ramamurthy T., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Preferential association of the heat-stable enterotoxin gene (*stn*) with environmental strains of *Vibrio cholerae* belonging to the O14 serogroup. *Epidemiol. Infect.* 2002; 129(2):245–51.
42. Sears C.L., Kaper J.D. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(1):167–215.
43. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P.K., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Bhadra R.K., Wai S.N., Pal A. Studies on a novel serine protease of a  $\Delta$ hapA $\Delta$ priV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One.* 2010; 5:e13122.
44. Takeda T., Peina Y., Ogawa A., Dohi S., Abe H., Nair G.B., Pal S.C. Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; 64(1):23–7.
45. Tam V.C., Serruto D., Dziejman M., Briehner W., Mekalanos J.J. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a form-in/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe.* 2007; 1(2):95–107.
46. Tam V.C., Suzuki M., Coughlin M., Saslowsky D., Biswas K., Lencer W.I., Faruque S.M., Mekalanos J.J. Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2010; 1(5):e00289–10.
47. Valeva A., Walev I., Weis I., Boukhallouf F., Wassenaar T.M., Endres K., Fahrenholz F., Bhakdi S., Zitzer A. A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(24):25143–8.
48. Walia K., Ganguly N.K. Toxins of *Vibrio cholerae* and their role in inflammation, pathogenesis, and immunomodulation. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. Epidemiological and molecular aspects on cholera. Springer Science+Business Media; 2010. P. 259–74.
49. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2(1):11–7.
50. Yanagihara I., Nakahira K., Yamane T., Kaieda S. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermo-stable direct hemolysin. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(21):16267–74.

## References

1. Bardakhch'yan E.A., Monakhova E.V., Kharlanova N.G., Sayamov S.R., Pisanov R.V. [Ultra structural changes in the small intestine of suckling mice as a consequence of exposure to cholera vibrio haemagglutinin/protease]. *Byul. Eksp. Biol. Med.* 2008; 145(4):475–80.
2. Bardakhch'yan E.A., Kharlanova N.G., Lomov Yu.M., Tkacheva T.I. [Ultra structural changes of epithelial cells and microvasculature of small intestine of suckling rabbits inoculated with cholera vibrios]. *Morfologiya.* 2001; 120(5):79–84.
3. Monakhova E.V., Pisanov R.V. [A Comparative analysis of literature and computer-based data about the properties of cholera vibrio cytotoxic factor, NMDCY, and hemagglutinin/protease]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 1(91):15–20.
4. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Markina O.V., Alekseeva L.P. [Cef properties (CHO cell elongating factor) of cholera vibrios: bio-information analysis and experimental findings]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2012; 2:10–4.
5. Monakhova E.V., Smolikova L.M., Bozhko N.V. [PCR detection of TTSS genes (third type secretion system) and other pathogenicity/persistence factors in cholera vibrios of various serotypes]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2010; 6:20–5.



6. 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*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):62–5.
7. Pisanov R.V. [Zot and Ace are additional toxins included in cholera vibrio virulence cassette]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2002; 1(83):15–21.
8. Sayamov S.R., Monakhova E.V., Fedorenko G.M., Tkacheva T.I., Markina O.V., Alekseeva L.P., Pisanov R.V., Bardakhch'yan E.A. [Ultra structural changes in cultured cells under the influence of cholera vibrio hemagglutinin/protease]. *Byul. Eksperim. Biol. Med.* 2011; 152(10):438–42.
9. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutirev V.V. [Variability of the genome of the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, isolated in the territory of Russia in modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2011; 3:11–8.
10. Shimanyuk N.Ya., Duvanova O.V., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [*Vibrio cholerae* O139 "Bengal" receptor destroying enzyme: detection, purification and particular properties]. *Biotechnologiya.* 1999; 3:56–62.
11. Ahrens S., Geissler B., Satchell K.J. Identification of a His-Asp-Cys catalytic triad essential for function of the Rho inactivation domain (RID) of *Vibrio cholerae* MARTX toxin. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(2):1397–408.
12. Bhattacharyya S., Gosh S., Shant J., Ganguly N.K., Majumdar S. Role of the W07-toxin on *Vibrio cholerae*-induced diarrhoea. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1670:69–80.
13. Boyd E.F., Heilpern A.J., Waldor M.K. Molecular analysis of a putative CTX $\phi$  precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX $\phi$ s by toxigenic *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(19):5530–38.
14. Boyd E.F., Waldor M.K. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTX $\phi$  by bacteriophage CP-T1. *Infect. Immun.* 1999; 67(11):5898–905.
15. Campos J., Martinez E., Izquierdo Y., Fando R. VEP $\phi$ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae* able to transduce the cholera toxin genes. *Microbiology.* 2010; 156(1):108–15.
16. Chakrabarti S.R., Chaudhuri K., Sen K., Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *J. Bacteriol.* 1996; 178(2):524–30.
17. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):3220–5.
18. Choi S., Dunams D., Jiang S.C. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(3):1015–22.
19. Choi S.Y., Lee J.H., Kim E.J., Lee H.R., Jeon Y.S., von Seidlein L., Deen J., Ansaruzzaman M., Lucas M., Barreto A., Songane F., Mondlane C., Nair G.B., Czerkinsky C., Clemens J.D., Chun J., Kim D.W. Classical RS1 and environmental RS1 elements in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring a tandem repeat of CTX prophage: revisiting Mozambique in 2005. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59(3):302–8.
20. Dutta D., Chowdhury G., Pazhani G.P., Guin S., Dutta S., Ghosh S., Rajendran K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya M.K., Mitra U., Takeda Y., Nair G.B., Ramamurthy T. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19:464–7.
21. Faruque, S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence.* 2012; 3(7):556–65.
22. Fasano A. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut.* 2002; 50(Suppl 3):iii9–iii14.
23. Fullner Satchell K.J. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect. Immun.* 2007; 75(11):5079–84.
24. Heilpern A.J., Waldor M.K. CTX $\phi$  infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products. *J. Bacteriol.* 2000; 182(6):1739–47.
25. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology.* 2002; 148:3681–93.
26. Jørgensen R., Purdy A.E., Fieldhouse R.J., Kimber M.S. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(16):10671–8.
27. Ledón T., Campos J., Suzarte E., Rodríguez B., Marrero K., Fando R. El Tor and Calcutta CTX $\phi$  precursors coexisting with intact CTX $\phi$  copies in *Vibrio cholerae* O139 isolates. *Res. Microbiol.* 2008; 159(20):81–7.
28. Lizárraga-Partida M.L., Quilici M.-L. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 clinical strains, including new nontoxigenic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic years between 1991 and 2000. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1364–71.
29. Ma A.T., McAuley S.B., Pukatzki S., Mekalanos J.J. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion system requires bacterial endocytosis by host cell. *Cell Host Microbe.* 2009; 5:234–43.
30. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72.
31. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science.* 2005; 310(5755):1824–7.
32. Menon D., Karyekar C.S., Fasano A., Lu R., Eddington N.D. Enhancement of brain distribution of anticancer agents using DeltaG, the 12 kDa active fragment of ZOT. *Int. J. Pharm.* 2005; 306(1–2):122–31.
33. Miller K.A., Hamilton E., Dziejman M. The *Vibrio cholerae* *trh* gene is coordinately regulated *in vitro* with type III secretion system genes by VtrR(A)/VtrR(B) but does not contribute to Caco2-BBE cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* 2012; 80(12):4444–55.
34. Miyata S.T., Kitaoka M., Wieteska L., Frech C., Chen N., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front. Microbiol.* 2010; 1:117.
35. Nishibuchi M., Khaemaneiam V., Honda T., Kaper J. B., Miwatani T. Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *V. mimicus*, and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 67:251–6.
36. O'Brien A.D., Holmes R.K. Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 1987; 51(2):206–20.
37. Olivier V., Queen J., Satchell K.J.F. Successful small intestine colonization of adult mice by *Vibrio cholerae* requires ketamine anesthesia and accessory toxins. *PLoS One.* 2009; 4:e7352.
38. Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008; 12(1):1–7.
39. Saha P.K., Koley H., Nair G.B. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane-damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3101–8.
40. Sanyal S.C. A new diarrhoeagenic cholera toxin. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 1990; 9(1):125.
41. Sarkar B., Bhattacharya T., Ramamurthy T., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Preferential association of the heat-stable enterotoxin gene (*stn*) with environmental strains of *Vibrio cholerae* belonging to the O14 serogroup. *Epidemiol. Infect.* 2002; 129(2):245–51.
42. Sears C.L., Kaper J.D. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(1):167–215.
43. Syngkon A., Elluri S., Koley H., Rompikuntal P.K., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Bhadra R.K., Wai S.N., Pal A. Studies on a novel serine protease of a  $\Delta$ hapA $\Delta$ prtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One.* 2010; 5:e13122.
44. Takeda T., Peina Y., Ogawa A., Dohi S., Abe H., Nair G.B., Pal S.C. Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991; 64(1):23–7.
45. Tam V.C., Serruto D., Dziejman M., Briehner W., Mekalanos J.J. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe.* 2007; 1(2):95–107.
46. Tam V.C., Suzuki M., Coughlin M., Saslowsky D., Biswas K., Lencer W.I., Faruque S.M., Mekalanos J.J. Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2010; 1(5):e00289–10.
47. Valeva A., Walev I., Weis I., Boukhallouk F., Wassenaar T.M., Endres K., Fahrenholz F., Bhakdi S., Zitzer A. A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(24):25143–8.
48. Walia K., Ganguly N.K. Toxins of *Vibrio cholerae* and their role in inflammation, pathogenesis, and immunomodulation. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. Epidemiological and molecular aspects on cholera. Springer Science+Business Media; 2010. P. 259–74.
49. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2(1):11–7.
50. Yanagihara I., Nakahira K., Yamane T., Kaieda S. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(21):16267–74.

#### Authors:

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

#### Об авторах:

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

Поступила 13.05.13.



Е.В.Пименов<sup>1,2</sup>, В.А.Оборин<sup>3</sup>, А.Г.Ивонин<sup>1,2</sup>

# ВЛИЯНИЕ ЖИДКОЙ ЧАСТИ КРОВИ И ЕЕ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИЙ *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

<sup>1</sup>Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров, Российская Федерация;<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров, Российская Федерация

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния жидкой составляющей крови и ее отдельных белковых фракций на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека *in vitro*. Регистрацию связывания бактерий с клетками-мишенями в экспериментах осуществляли с помощью фотометрического метода. В работе выявлено ингибирующее действие нативных плазмы и сыворотки крови, а также отдельных групп сывороточных белков (альбуминов и нормальных иммуноглобулинов) на прикрепление бактерий к эритроцитам. Результаты проведенных исследований позволили предположить о существовании двух возможных механизмов подавления адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к человеческим эритроцитам компонентами жидкой части крови: блокирования поверхностных микробных структур, ответственных за адгезивную функцию, и экранирования рецепторов эритроцитарной мембраны.

**Ключевые слова:** штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, адгезивная активность, эритроциты, плазма и сыворотка крови, альбумины, нормальные иммуноглобулины.

E.V.Pimenov<sup>1,2</sup>, V.A.Oborin<sup>3</sup>, A.G.Ivonin<sup>1,2</sup>

## Impact of the Liquid Part and Some Separate Components of Blood on the Process of Interaction between *Yersinia pestis* EV NIEG Bacteria and Human Red Blood Cells *in vitro*

<sup>1</sup>Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktывkar; <sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov; <sup>3</sup>Vyatka State Humanities University, Kirov, Russian Federation

Objective of the research has been the evaluation of impact of blood liquid part and its separate protein fractions on the process of *Yersinia pestis* EV NIEG adhesion to human erythrocytes *in vitro*. Bacterial binding with target-cells has been registered using photometric technique. Identified has been inhibiting effect of blood native plasma and serum, as well as some groups of serum proteins, (albumins and normal immunoglobulins) on attachment of bacteria to human red blood cells. Based on the obtained results it has been assumed that there are two possible mechanisms of suppression of *Yersinia pestis* EV NIEG adhesion to human erythrocytes performed by the liquid components of blood – surface microbial structure blockage and erythrocyte membrane receptor shielding.

**Key words:** *Yersinia pestis* EV NIEG strain, adhesive activity, erythrocytes, blood plasma and serum, albumin, common immunoglobulins.

Чума является особо опасной бактериальной инфекционной болезнью с природной очаговостью и трансмиссивным механизмом передачи [6]. Факт присутствия возбудителя чумы (*Yersinia pestis*) в кровеносном русле у инфицированных людей и животных показан отечественными [2] и зарубежными [15] исследователями. Общеизвестно, что у диких грызунов бактериемия служит одним из факторов передачи чумного микроба блохами различным видам млекопитающих и тем самым способствует возникновению эпизоотий и эпидемий чумы [1].

Попав в кровь, чумные бактерии неизбежно контактирует с ее гуморальными факторами и форменными элементами. Однако если вопросы взаимодействия *Y. pestis* с лейкоцитами освещены [9], то роль эритроцитов периферической крови в развитии инфекционного процесса при чуме остается слабоизученной. При этом именно эритроциты, являясь самой многочисленной популяцией форменных элементов крови с огромной общей площадью поверхности (до 3800 м<sup>2</sup> у взрослого человека) [8], обладают наиболь-

шей потенциальной способностью к контактному взаимодействию с микроорганизмами, попавшими в кровеносное русло.

Сообщения, посвященные адгезии чумных бактерий к эритроцитам, в литературе крайне малочисленны. Показано, что свойство агглютинировать нативные эритроциты млекопитающих характерно для клеток *Y. pestis* [3] и выделенных из них белков – рН 6 антигена [12] и белка S-слоя [4]. По данным [13], чумные бактерии способны прикрепляться к поверхности эритроцитов в условиях *in vitro* и *in vivo*, а затем проникать внутрь клеток, вызывая их деструктивные изменения. В то же время нужно заметить, что с помощью метода световой микроскопии, использованного авторами указанной работы, практически невозможно установить, находится микробная клетка внутри эритроцита или адсорбирована на клеточной поверхности.

Ранее нами с применением оригинальной методики выявлена выраженная адгезивная активность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроци-

тов человека, лабораторных и домашних животных в условиях *in vitro* [10], изучены механизмы адсорбции данного штамма на человеческих эритроцитах [11]. Учитывая, что в этих исследованиях применялись только отмытые эритроциты, представляло интерес изучение влияния жидкой внеклеточной части крови и ее отдельных белковых фракций на процесс цитадгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ.

### Материалы и методы

В работе использовали клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ, выделенные из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Бактерии выращивали на ГРМ-агаре (рН 7,4) с добавлением генцианвиолета (1:100000) при температуре (28±1) °С в течение 48 ч, после чего суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,4). Конечная концентрация клеток в суспензии соответствовала 1,0 у.е. оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм и длине оптического пути кюветы 5 мм. При измерении ОП суспензии пользовались фотоэлектроколориметром КФК-2.

Периферическую венозную кровь 0 (I) группы получали в ФГЛУ «Кировская областная станция переливания крови» (Киров) от здоровых доноров. В качестве антикоагулянта применяли гепарин (5,0 ЕД/мл крови). Для выделения фракции эритроцитов пробы крови центрифугировали при 500 g в течение 10 мин, отбирали плазму и лейкоцитарную пленку (верхний слой осевших клеток), а эритроциты трижды отмывали 0,9 % раствором хлорида натрия (рН 7,4) при аналогичном режиме центрифугирования и ресуспендировали в этом же растворе. Конечная концентрация эритроцитов составляла  $1,0 \cdot 10^{12}/л$ . Отобранную плазму крови использовали в отдельных сериях экспериментов (см. ниже), в остальных случаях утилизировали вместе с лейкоцитами.

Для получения сыворотки крови донорскую венозную кровь отбирали в стерильную пробирку без антикоагулянта, выдерживали при температуре (37±1) °С в течение 1 ч, отслаивали сгусток свернувшейся крови от стенок пробирки стерильной пастеровской пипеткой и помещали пробу в холодильник с температурой (4±2) °С на 24 ч. По истечении данного срока сыворотку отделяли от кровяного сгустка путем центрифугирования при 500 g в течение 10 мин. Кроме аутологичных плазмы и сыворотки крови в опытах использовали коммерческие препараты, содержащие отдельные фракции сывороточных белков – альбумин человеческий (НПО «Биомед», Пермь) и иммуноглобулин человеческий нормальный (ОАО «Микроген», Москва).

Уровень адгезии бактерий к эритроцитам определяли с помощью метода [10]. Для этого в пробирках смешивали по 2,5 мл суспензии бактерий и 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов. В качестве контроля использовали пробы, содержащие 2,5 мл суспензии бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора хлори-

да натрия (контроль № 1) и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов (контроль № 2). Образцы инкубировали на вращающейся платформе при температуре (37±1) °С в течение 30 мин, центрифугировали при 500 g в течение 1,5 мин, после чего путем фотоколориметрии определяли значение ОП супернатанта в пробах. Показатель адгезии (ПА) рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{D_{к1} + D_{к2} - D_{он}}{D_{к1}} \times 100 \%,$$

где ПА – показатель адгезии,  $D_{к1}$  – ОП супернатанта в контрольной пробе № 1,  $D_{к2}$  – ОП супернатанта в контрольной пробе № 2,  $D_{он}$  – ОП супернатанта в опытной пробе.

Для оценки влияния плазмы и сыворотки крови, а также отдельных фракций сывороточных белков на уровень адгезии пользовались вышеописанной схемой постановки эксперимента, однако в процессе приготовления опытных и контрольных проб № 2 в них вместо 1,0 мл суспензии отмытых эритроцитов вносили 0,75 мл тестируемого препарата (в цельном виде или в разведении) и 0,25 мл эритроцитарной массы, полученной после центрифугирования 1,0 мл суспензии эритроцитов (1000 g, 10 мин) и удаления супернатанта.

Статистическую обработку цифровых результатов и определение достоверности различий между двумя выборками проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat» версии 4.03.

### Результаты и обсуждение

Проведенные эксперименты показали, что все рассматриваемые препараты оказывали выраженное ингибирующее действие на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам (таблица). Наибольшей антиадгезивной активностью обладали аутологичные плазма и сыворотка крови человека, которые при использовании в цельном виде снижали величину ПА по сравнению с контролем (уровнем адгезии в отсутствии препаратов) в 7,3 и 5,2 раза соответственно. Ингибирующий адгезию эффект плазмы и сыворотки крови проявлялся вплоть до их разведения 1:64 и исчезал при разведении 1:128. Альбумин и нормальный иммуноглобулин человека, применяемые цельными, снижали ПА по сравнению с контролем в 2,2 и 1,9 раза соответственно. Антиадгезивное действие данных препаратов регистрировали до разведения 1:8.

О способности биологических жидкостей и их отдельных компонентов предотвращать адгезию патогенных бактерий к клеткам макроорганизма известно с 80-х годов XX в. [14]. По данным [5], антиадгезивная функция секретов и жидкостей организма связана с тем, что растворенные в них макромолекулы физиологически активных веществ взаимодействуют с поверхностными структурами бактериаль-

Уровень адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека в присутствии плазмы, сыворотки крови и отдельных сывороточных белков ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

| Препараты                              | ПА, %                                                          |             |             |             |            |            |           |          |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------|----------|
|                                        | Разведения препаратов в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,4) |             |             |             |            |            |           |          |
|                                        | б/р                                                            | 1:2         | 1:4         | 1:8         | 1:16       | 1:32       | 1:64      | 1:128    |
| Нативная плазма крови                  | 10,4±4,3***                                                    | 18,1±6,3*** | 25,8±7,2*** | 37,1±6,1*** | 42,3±6,7** | 53,8±4,1** | 60,9±5,4* | 75,8±3,9 |
| Нативная сыворотка крови               | 14,7±5,8***                                                    | 23,8±4,9*** | 28,1±4,6*** | 31,2±5,2*** | 47,5±5,2** | 54,1±5,8*  | 62,7±2,0* | 72,4±6,0 |
| Альбумин человеческий                  | 35,4±3,7***                                                    | 52,7±5,2*** | 57,7±4,1*   | 63,0±2,8*   | 73,8±4,5   | -          | -         | -        |
| Иммуноглобулин человеческий нормальный | 40,6±5,1***                                                    | 47,3±6,3*** | 51,4±5,7**  | 60,2±4,9*   | 71,8±6,1   | -          | -         | -        |
| Контроль (без препаратов)              | 76,2±5,3                                                       |             |             |             |            |            |           |          |

Примечание: б/р – без разведения; «-» – исследование не проводилось. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$  – различия достоверны по сравнению с контролем.

ных клеток и создают стерические препятствия для связывания с рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Белковые или гликопротеиновые комплексы, связывающиеся с факторами адгезии микроорганизмов различных таксономических групп, выявлены практически в каждой биологической жидкости или секрете [7].

В результате проведенных исследований нами впервые установлено наличие у жидкой составляющей крови человека собственного защитного антимикробного действия, направленного на снижение адгезии чумного микроба к эритроцитам. Показано, что антиадгезивными свойствами в отношении штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают как нативные плазма и сыворотка крови человека, так и их отдельные белковые фракции – альбумины и нормальные иммуноглобулины. В то же время отсутствие статистически значимых различий между уровнями адгезии в присутствии цельных плазмы и сыворотки крови, а также их соответствующих разведений (от 1:2 до 1:64) косвенно указывало на неспособность плазменного белка фибриногена ингибировать связывание чумных бактерий с эритроцитами.

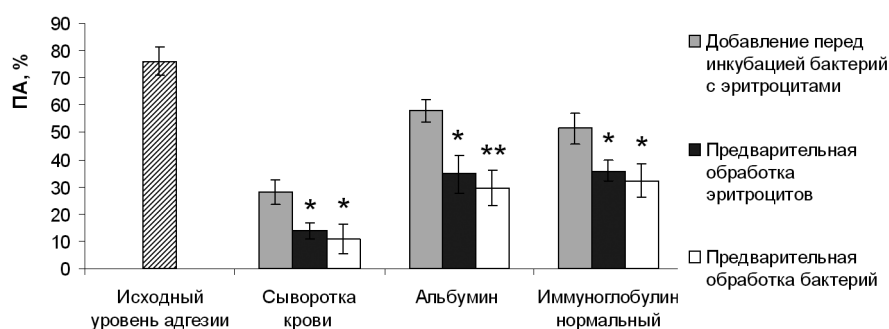
В последующем для выяснения возможных механизмов действия тестируемых препаратов на адгезию мы предварительно инкубировали сыворотку крови, альбумин и нормальный иммуноглобулин (разведения 1:4) с эритроцитами, либо с микроорганизмами на вращающейся платформе при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, а уже затем в пробы добавляли интактные (необработанные) микробные клетки или эритроциты. После образцы инкубировали еще 30 мин при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  и определяли интенсивность адгезивного процесса.

Обработка аутологичной сывороткой крови, альбумином и иммуноглобулином эритроцитов и бактерий до их последующего инкубирования с интактными бактериями или эритроцитами приводила к достоверному снижению ПА по сравнению с таковым при внесении препаратов в образцы непосредственно перед началом совместного инкубирования микробных клеток с эритроцитами (рисунок).

Полученные результаты позволяли предположить о наличии двух возможных механизмов прерывания прикрепления клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека изучаемыми препаратами: блокирования поверхностных структур микробных клеток, участвующих в адгезии, и экранирования рецепторов эритроцитарной мембраны. О существовании первого механизма свидетельствовало выявленное в эксперименте понижение уровня адгезии при предварительной обработке препаратами бактерий, о существовании второго – понижение аналогичного показателя при обработке эритроцитов.

Таким образом, с использованием метода фотокolorиметрии для регистрации цитадгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ нами установлено, что нативные плазма и сыворотка крови человека, а также отдельные сывороточные белки (альбумины и нормальные иммуноглобулины) обладают выраженной способностью препятствовать прикреплению чумного микроба к красным кровяным клеткам в эксперименте *in vitro*. Для установления подобного эффекта в условиях *in vivo* необходимы дальнейшие исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-00426-а) и программы фундаментальных исследований УрО РАН (проект № 12-П-4-1069).



Показатель адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека при различных вариантах внесения сыворотки крови и отдельных сывороточных белков в систему «бактерии-эритроциты»:

\* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$  – различия достоверны по сравнению с добавлением препарата в пробы непосредственно перед инкубацией бактерий с эритроцитами



# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 2. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 4:3–11.
2. Бибикина В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина; 1974. 188 с.
3. Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н. Пили адгезии у *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1985; 6:13–7.
4. Дятлов И.А., Антонова О.А. Выявление и характеристика антигена *Yersinia pestis*, проявляющего свойства белков S-слоя. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1999; 4:90–1.
5. Еропкина Е.М., Афиногенов Г.Е. Антиадгезивная активность белковых комплексов биологических жидкостей и секретов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1994; 11:110–6.
6. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 1:17–23.
7. Макаренко И.Д., Компанец Г.Г., Запорожец Т.С. Ингибирование адгезии патогенных микроорганизмов на эукариотических клетках. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 3:121–5.
8. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: Издательство ЯГПУ; 2009. 178 с.
9. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Руководство. Саратов; 1992. 172 с.
10. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотокolorиметрическим методом. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 1(103):48–50.
11. Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Исследование механизмов взаимодействия бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):54–7.
12. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П., Потапов В.Д. Физико-химическая и биологическая характеристика pH 6 антигена *Yersinia pestis*, выделенного иммуносорбционным методом. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1993; 3:12–7.
13. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(2):150–8.
14. Mertz P.M., Patti J.M., Marcin J.J., Marshall D.A. Model for studying bacterial adherence to skin wounds. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(9):1601–4.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

## References

1. Anisimov A.P. [*Yersinia pestis* factors responsible for plague agent circulation and persistence in ecological systems of natural foci. Communication 2]. *Mol. Gen. Microbiol. Immunol.* 2002; 4:3–11.

2. Bibikova V.A., Klassovsky L.N. [Plague Transmission by Fleas]. M.: Meditsina; 1974. 188 p.
3. Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N. [Pili of adhesion in *Yersinia pestis*]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 6:13–7.
4. Dyatlov I.A., Antonova O.A. [Identification and characterization of *Yersinia pestis* antigen exerting S-layer protein properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1999; 4:90–1.
5. Eroпкина Е.М., Афиногенов Г.Е. [Adhesive activity of protein complexes of biological liquids and secretions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1994; 11:110–6.
6. Kutyrev V.V. [Pressing issues of particularly dangerous infectious diseases and sanitary protection of the territories under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 1:17–23.
7. Makarenkova I.D., Kompanets G.G., Zaporozhets T.C. [Inhibition of pathogenic microorganism adhesion onto eukaryotic cells]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006; 3:121–5.
8. Murav'ev A.V., Cheporov S.V. [Hemorheology (Experimental and Clinical Aspects)]. Yaroslavl: YSPU (Yaroslavl State Pedagogical University) Publishing House; 2009. 178 p.
9. Naumov A.V., Ledvanov M.Yu., Drozdov I.G. [Plague Immunology. Practice Guidance]. Saratov; 1992. 172 p.
10. Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G. [Analysis of adhesion of *Yersinia pestis* vaccine strain EV to erythrocytes of the animals using photocolormetric method]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 103:48–50.
11. Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. [Investigation of mechanisms of interaction of *Yersinia pestis* EV NIEG vaccine strain bacteria with human red blood cells]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 114:54–7.
12. Stepanshina V.N., Gremyakova T.A., Anisimov A.P., Potapov V.D. [Physico-chemical and biological pH 6 characteristics of *Yersinia pestis* antigen isolated by means of immuno-adsorption technique]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3:12–7.
13. Feodorova V.A., Devdariani Z.L. The interaction of *Yersinia pestis* with erythrocytes. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(2):150–8.
14. Mertz P.M., Patti J.M., Marcin J.J., Marshall D.A. Model for studying bacterial adherence to skin wounds. *J. Clin. Microbiol.* 1987; 25(9):1601–4.
15. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10:35–66.

## Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (24, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, 167982, Russian Federation), Vyatka State Agricultural Academy (133, Oktyabr'sky Pr., Kirov, 610017, Russian Federation).

Oborin V.A. Vyatka State Humanities University. 26, Krasnoarmeyskaya St., Kirov, 610002, Russian Federation. E-mail: vaoborin50@mail.ru

## Об авторах:

Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук (Российская Федерация, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24), Вятская государственная сельскохозяйственная академия (Российская Федерация, 610017, Киров, Октябрьский проспект, 133).

Оборин В.А. Вятский государственный гуманитарный университет. Российская Федерация, 610002, Киров, ул. Красноармейская, 26. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 24.10.13.

И.В.Тучков, Я.М.Краснов, А.А.Горяев, Ж.В.Матвеева, А.В.Степанов, Н.В.Майоров, А.К.Никифоров

## НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ G ГЛИКОПРОТЕИНА РОССИЙСКОГО ФИКСИРОВАННОГО ШТАММА «МОСКВА 3253» ВИРУСА БЕШЕНСТВА

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

Получен полный сиквенс G гликопротеина, региона ша-пси и Н-концевого участка L гена штамма вируса бешенства «Москва 3253». Проведено сравнение аминокислотной последовательности белков штамма «Москва 3253» и других фиксированных штаммов вируса. Определена 98 % гомология ДНК со штаммом RV-97, тогда как гомология ДНК штамма PV (Pasteur virus) составила 91 %. Построено филогенетическое дерево родства изучаемого штамма и различных групп фиксированного вируса бешенства. Обнаружено что исследуемый штамм имеет большее генетическое родство со штаммами японской группы, чем со штаммом PV. Высказано предположение, что штамм PV не является производным вируса выделенного Пастером, а относится к американской группе штаммов.

**Ключевые слова:** вирус бешенства, филогенетический анализ, нуклеотидная последовательность, полимеразная цепная реакция, сиквенирование ДНК.

I.V.Tuchkov, Ya.M.Krasnov, A.A.Goryaev, Zh.V.Matveeva, A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, A.K.Nikiforov

## Nucleotide Sequence and Phylogenetic Analysis of Glycoprotein-G of the Russian Fixed Rabies Virus Strain "Moscow 3253"

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

Fully sequenced have been glycoprotein-G, sha-psi region, as well as H-end site of the L-gene in the rabies virus strain "Moscow 3253". Compared are amino acid sequences of proteins of "Moscow 3253" strain and other fixed strains of the virus. Established is 98 % DNA homology with RV-97, and 91% homology with PV (Pasteur virus) strain. Constructed has been phylogenetic tree of the strain under study alongside with various groups of fixed rabies virus. It is revealed that "Moscow 3253" strain has closer genetic relations with Japanese group of strains, than with PV strain. Put forward is an assumption that PV strain does not derive from the virus isolated by Pasteur, but relates to the American group of strains.

**Key words:** rabies virus, phylogenetic analysis, nucleotide sequence, polymerase chain reaction, DNA sequencing.

Филогенетический анализ молекулярных данных является одним из подходов к изучению структуры и функции генетических макромолекул и их эволюционного преобразования. Основная цель филогенетического анализа – изучение порядка дивергенции последовательностей генов и аминокислот, а также сравнение эволюционных событий в родственных молекулах ДНК или РНК. Консервативность генов позволяет определять отдаленное родство между их представителями, давно разошедшимися в ходе эволюции.

Возбудитель бешенства относится к роду *Lissavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса бешенства это несегментированная, антисмысловая, однонитевая РНК величиной 12000 нуклеотидов. Вирусная РНК кодирует пять основных белков, три из которых (L, Р и N) связаны с нуклеокапсидом, а два других (G и М) входят в состав липопротеиновой оболочки [5].

Несколько вирусных белков содержат антигенные и иммунодоминантные участки, хотя G белок считается основным иммуногеном и антигеном вируса бешенства [6]. Уличный вирус бешенства, выделенный Пастером в 1882 г., в дальнейшем был пассирован через мозг кролика путем субдурально-

го заражения. Штамм PV (Pasteur virus) официально получен в 1965 г. из Панамемериканского зоонозного центра (Буэнос-Айрес, Аргентина) и, вероятно, является производным оригинального пастеровского вируса. Сведений о том, как штамм из США попал в Аргентину, нет. После 1965 г. в институте Пастера в Париже этот штамм прошел один пассаж на мозге кролика и был адаптирован к культуре клеток ВНК-21 [4].

Штаммы японской группы тоже берут свое начало от Пастеровского штамма, который был передан в Японию, вероятно, в 1915 г. [8]. После серии пассажей на мозге кролика и мозге морской свинки получен штамм Nishigahara. Производными этого штамма в результате адаптации к куриному эмбриону и культуре клеток являются штаммы RC\_HL и NiCe [9].

Американская ветвь оригинального фиксированного вируса Пастера представлена штаммами PM (Pitman – Moore) и CVS (Challenge virus Standart): первый адаптирован к мозгу кролика и культуре клеток, второй – к мозгу мыши и культуре клеток [4].

Группа американских штаммов представлена штаммами Sad-B19, SAD-21, ERA, Vnukovo-32. Штамм-предшественник был выделен от бешеной собаки в штате Алабама (США) в 1935 г.

Вышеуказанные штаммы были фиксированы путем проведения пассажей через мозг мыши, куриный эмбрион и клетки почки сирийского хомячка [3].

Штамм Flury выделен в 1939 г. из мозга девочки, погибшей от бешенства. Через 40–50 пассажей получен штамм LEP Flury (Low embryo passages), а через 180 пассажей HEP Flury (High embryo passages) [4].

В 1886 г. Пастеровский штамм был передан в Россию [1]. Было проведено 3500 внутримозговых пассажей этого штамма на кроликах, и в настоящее время он используется под названием «Москва». В данном исследовании используется штамм «Москва» 3253-го пассажа.

Фиксированный штамм «Овечий» является производным штамма «Москва», полученным в результате 80 пассажей в мозговой ткани овец. С использованием методов культивирования в прививаемых клетках почки детеныша хомячка из штамма «Овечий», был получен фиксированный штамм «Щелково-51» [2]. В результате культивирования в клетках почки сайги штамм «Овечий» был селекционирован фиксированный вирус бешенства штамм РБ-71 [3].

После адаптации этого штамма к культуре клеток почки детеныша хомячка в Покрове получен штамм RV-97, который в 2007 г. был полностью сиквенирован А. Metlin и соавт. Следует отметить, что если геномы штаммов группы PV и американской группы в большинстве сиквенированы, то из российских штаммов полная нуклеотидная последовательность известна только для штамма RV-97 [7].

### Материалы и методы

Штамм фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» получен из Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова (Москва).

Выделение суммарной РНК проводили, используя набор GeneJET RNA Purification Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с инструкцией к набору.

Синтез первой цепи комплементарной ДНК на вирусной РНК проводили с использованием набора «RevertAid First strand cDNA Synthesis Kit» («Fermentas», Литва) и протокола для «random» праймеров. ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» производства «ДНК-Технология» (Москва). В пробирку вносили 10 мкл кДНК разведенной 1:10 и 15 мкл реакционной смеси, содержащей по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 2,5 мкл буфера для ПЦР; 2,5 мкл 8 мМ dNTP; 1 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,2 мкл 5 ед/мкл Taq ДНК-полимеразы («Бионем» Россия); 6,8 мкл деионизованной воды. Продукты ПЦР очищали с помощью набора реактивов «Wizard<sup>TM</sup> PCR Preps DNA Purification Kit» (Promega, США). Сиквенирование проводили на генетическом анализаторе «CEQ-8000» с использованием стандартных протоколов пробоподготовки и программного обеспечения прибора.

Сборку и выравнивание последовательностей,

а также расчет генетических дистанций и филогенетическую реконструкцию по методу ближайшего связывания NJ осуществляли с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.1. Кроме собственных данных, для филогенетического анализа были использованы последовательности гена G гликопротеина из GenBank других штаммов Rabies virus: Ni Ce, AB128149; Nishigahara, AB044824; RC-HL, AB009663; PV, M13215; SAD B19, M31046; SRV9, AF499686; ERA, EF206707; Hep-Flury, AB085828; Lep-Flury, DQ099524; PM1503, DQ099525; RV-97, EF542830. Филогенетическое дерево построено на основе данных штамма SHBRV-18, AY705373.

### Результаты и обсуждение

Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК методом обратной транскрипции с помощью обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей и случайных праймеров. Первая пара специфических праймеров была взята из литературных данных и ограничивала регион ша-пси (участок между G и L генами.) [4].

После получения первого сиквенса последовательность была верифицирована в программе BLAST. Определена 98 % гомология со штаммом RV-97, тогда как гомология со штаммом PV составила 91 %. В дальнейшем праймеры для сиквенирования подбирались уже на последовательность RV-97 с перекрытием участков.

После получения полного сиквенса G гликопротеина, региона ша-пси, и Н-концевого участка L гена проведено сравнение аминокислотной последовательности штамма «Москва 3253» с последовательностями других известных фиксированных штаммов.

Выявлена аминокислотная замена пролина на аргинин в позиции 107, которая дает возможность отличить производственный штамм от других фиксированных штаммов вируса бешенства, в том числе и от штамма RV-97.

Построено филогенетическое дерево родства различных представителей фиксированного вируса бешенства. Сиквенс генома штамма SHBRV, выделенного от летучей мыши, лег в основу филогенетического дерева. Обнаружено, что исследуемый штамм имеет большее генетическое родство со штаммами японской группы, чем со штаммом PV.

Наши данные полностью согласуются с данными А. Metlin и соавт., предположившими, что маловероятно происхождение штамма RV-97, производного штамма «Москва», от штамма PV, полученного из Аргентины.

Мы считаем, что общим предком российских и японских штаммов фиксированного вируса бешенства является оригинальный пастеровский вирус, от которого они берут начало (российские штаммы с 1886 г., а японские – с 1915 г.). Штамм PV не является производным вируса, выделенного Пастером, а по филогенетическому анализу скорее относится к



группе, берущей начало от штамма, выделенного от собаки в Алабаме (США) в 1935 г.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гамалея Н.Ф., Мечников И.И., Тимирязев К.А. Пастер. Издательство академии наук СССР; 1946. 52 с.
2. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. М.: Аквариум; 2001. 303 с.
3. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 334 с.
4. Sacramento D., Badrane H., Bourhy H., Tordo N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1149–58.
5. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Part II – The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses. Elsevier Academic Press; 2005. P. 609–14.
6. Faber M., Faber M.L., Papaneri A., Bette M., Weihe E., Dietzschold B., Schnell M.J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005; 79:14141–8.
7. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1–2):242–7.
8. Sakamoto S., Nakatake H., Tokiyoshi S., Yamamoto M., Kawai A., Smith. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan. *Virus Genes.* 1994; 8(1):35–46.
9. Wenqiang Jiao, Xiangping Yin, Zhiyong Li, Xi Lan, Xuerui Li, Xiaoting Tian, Baoyu Li, Bin Yang, Yun Zhang, Jixing Liu. Molecular characterization of China virus vaccine strain. *Virol. J.* 2011; 8:521

## References

1. Gamaleya N.F., Mechnikov I.I., Timiryazev K.A. [Pasteur]. USSR

- Science Academy publishing house; 1946. 52 p.
2. Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. [Rabies in Animals]. M.: Akvarium; 2001. 301 p.
3. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 334 p.
4. Sacramento D., Badrane H., Bourhy H., Tordo N. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73:1149–58.
5. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Part II – The Negative Sense Single Stranded RNA Viruses. Elsevier Academic Press; 2005. P. 609–14.
6. Faber M., Faber M.L., Papaneri A., Bette M., Weihe E., Dietzschold B., Schnell M.J. A single amino acid change in rabies virus glycoprotein increases virus spread and enhances virus pathogenicity. *J. Virol.* 2005; 79:14141–8.
7. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., Huovilainen A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1–2):242–7.
8. Sakamoto S., Nakatake H., Tokiyoshi S., Yamamoto M., Kawai A., Smith. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan. *Virus Genes.* 1994; 8(1):35–46.
9. Wenqiang Jiao, Xiangping Yin, Zhiyong Li, Xi Lan, Xuerui Li, Xiaoting Tian, Baoyu Li, Bin Yang, Yun Zhang, Jixing Liu. Molecular characterization of China virus vaccine strain. *Virol. J.* 2011; 8:521

## Authors:

Tuchkov I.V., Krasnov Ya.M., Goryaev A.A., Matveeva Zh.V., Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapl@microbe.ru

## Об авторах:

Тучков И.В., Краснов Я.М., Горяев А.А., Матвеева Ж.В., Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapl@microbe.ru

Поступила 16.09.13.

УДК 616.98:579.852.11

**Л.Ю.Аксенова, А.Г.Рязанова, Е.В.Жданова, О.И.Цыганкова, Н.П.Буравцева, Е.И.Еременко,  
И.С.Тюменцева, О.И.Коготкова, А.А.Зуенко, А.Н.Куличенко**

**РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ  
К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ  
НЕПРЯМЫМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ**

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

Разработана и апробирована тест-система для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител. Набор включает в себя антигенный препарат, положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец, ФИТЦ-конъюгат кроличьих антител. Изучены 10 акапсульных штаммов *B. anthracis* с различным плазмидным составом и морфологией колоний. Установлено, что в качестве антигенного препарата оптимальным является вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1. Чувствительность данной тест-системы по диагностическому титру составляет не менее 1:40 при рабочем разведении ФИТЦ-конъюгата 1:16. Специфичность набора изучали на 100 сыворотках здоровых доноров. Установлено, что 3 % сывороток имели специфическое свечение на 3+ в диагностическом разведении. Подтверждена 100 % воспроизводимость данного метода в разные временные сроки, а также при проведении исследования разными специалистами. Сконструированная тест-система позволяет подтвердить диагноз сибирской язвы у людей.

*Ключевые слова:* *Bacillus anthracis*, тест-система, сибирская язва, антитела.

**L.Yu.Aksenova, A.G.Ryazanova, E.V.Zhdanova, O.I.Tsygankova, N.P.Buravtseva, E.I.Eremenko,  
I.S.Tyumentseva, O.I.Kogotkova, A.A.Zuenko, A.N.Kulichenko**

**Construction and Approval of the Test-System for the Detection of Antibodies to Anthrax Agent  
Using Indirect Fluorescent Immunoassay**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

Constructed and validated has been the test-system for the detection of antibodies to anthrax agent using indirect fluorescent immunoassay. The panel consists of antigen preparation, positive control sample, negative control, and FITS-labeled rabbit antibodies. Studied have been 10 acapsular *B. anthracis* strains with different plasmid content and colony morphology. *B. anthracis* vaccine strain STI-1 is demonstrated to be the optimal one as antigen preparation. Sensitivity of this test-system is not less than 1:40, the working dilution of FITC-conjugate being 1:16. Specificity of the panel has been studied using 100 sera of healthy donors. Approved is 100 % reproducibility of the technique at different time intervals, as well as when carried by different specialists. The test-system allows for confirmation of anthrax diagnosis in humans.

*Key words:* *Bacillus anthracis*, test-system, anthrax, antibodies.

Эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Российской Федерации продолжает оставаться напряженной [1]. Наиболее часто вспышки этой инфекции среди животных и, как следствие, заболевания людей встречаются в субъектах Южного, Северо-Кавказского, Приволжского, Сибирского федеральных округов. Выделить культуру возбудителя от больных кожной формой сибирской язвы людей затруднительно, изоляты *Bacillus anthracis* получают в среднем лишь в 31 % случаев [2].

В соответствии с действующими методическими указаниями МУ 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» в тех случаях, когда не удастся выделить культуру возбудителя для постановки диагноза этой инфекции у человека при наличии соответствующей клинической картины и эпидемиологического анамнеза, необходимо проведение генетических (ПЦР) и иммунологических (ИФА, МФА) методов исследования.

Однако ввиду отсутствия зарегистрированных отечественных диагностических тест-систем для МФА и ИФА эти методы не включены в перечень тех, которыми можно лабораторно подтвердить диагноз сибирской язвы у человека. Все это делает актуальным разработку и производство набора для выявления антител в сыворотке крови людей непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА).

Целью работы явилась разработка и конструирование тест-системы для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител в сыворотке крови людей.

Метод основан на иммунохимической реакции антигена со специфическими антителами, содержащимися в исследуемых сыворотках. В качестве антигена используется убитая вегетативная культура вакцинного штамма сибиреязвенного микроба. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют *in vitro* с помощью флуоресцеинизотиоци-

ната (ФИТЦ)-конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов человека.

Индикаторный штамм должен обладать следующими свойствами: наличие полного состава комплекса антигенов (особенно поверхностных), отсутствие раннего спорообразования, типичность морфологии бактериальных клеток. Учитывая это, были апробированы 10 акапсульных штаммов *B. anthracis* с различным плазмидным составом и морфологией колоний: СТИ-1; СТИ-с – вариант штамма СТИ-1, растущий в S-форме; ΔСТИ – бесплазмидный вариант штамма СТИ-1; 228/4 – бесплазмидный вариант штамма 228; 228/8; 228/8-2 – вариант штамма 228/8, растущий в S-форме; 55; Sterne 34F<sub>2</sub>; ΔSterne – бесплазмидный вариант Sterne 34F<sub>2</sub>; Ихтиман. Наилучшие результаты были получены со штаммами СТИ-1, 228/8, Ихтиман, у которых отмечалось специфическое свечение бактериальных клеток при использовании иммунной сыворотки людей, больных кожной формой сибирской язвы, в разведениях 1:160, 1:320. В мазках со штаммами СТИ-с, 228/4, 228/8-2, 55, Sterne, ΔSterne, ΔСТИ специфическое свечение на 3–4+ наблюдалось в разведениях 1:80, 1:160, кроме того, в мазках с культурой ΔSterne отмечались единичные споры.

В дальнейшем отобранные штаммы СТИ-1, 228/8, Ихтиман культивировали на различных средах выращивания: агаре Хоттингера, агаре Хоттингера с добавлением 5 % дефибринированной крови барана, питательном агаре на основе Brain Heart Infusion, бикарбонатно-сывороточном агаре. Существенного различия при использовании различных сред выращивания не выявилось, специфическое свечение на 3–4+ наблюдалось в разведениях 1:160, 1:320 при культивировании на всех питательных средах. Следует отметить небольшое преимущество агара Хоттингера с добавлением 5 % дефибринированной крови барана. При этом морфология бактериальных клеток в мазках с культурой Ихтиман была менее типичной (отсутствие нитей) по сравнению с культурой СТИ-1.

Таким образом, при конструировании тест-системы нМФА нами был отобран вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1.

Иммуноглобулины класса G (IgG) выделяли каприловым методом из сыворотки крови человека, концентрировали полиэтиленгликолем-6000 до 20 мг/мл по белку, доводили pH до 4,4 1 М раствором соляной кислоты и проводили связывание IgG 2,5 % глютаровым альдегидом. Полученные полимеризованные иммуноглобулины измельчали в 10 мл фосфатного буферного раствора в гомогенизаторе. От несвязавшегося белка осадок отмывали последовательно в трехкратном объеме глицин-HCl (0,1 М) буферном растворе pH (2–3), далее в таком же объеме глицин-NaOH (0,1 М) буферном растворе pH (8±0,1) и в фосфатно-солевом буфере 0,01 М концентрации с 0,15 М раствором натрия хлорида pH (7,6±0,05). Отмывку от несвязавшегося белка контролировали на спектрофотометре при длине волны 280 нм.

Для получения кроличьих сывороток против IgG человека использовали схему иммунизации с применением иммуномодуляторов тималина и циклофосфана. Первые три инъекции проводили полимеризованными IgG в паховую область по 0,5 мл каждому кролику и по 1 мл тималина внутримышечно, при третьей инъекции дополнительно вводили по 1 мл циклофосфана внутримышечно. Через 30 дней кроликам-продуцентам трижды вводили внутривенно интактные IgG с концентрацией белка 15 мг/мл. В основу схемы иммунизации положена методика И.С.Тюменцевой [3].

На 8–9-е сутки после последней инъекции проводили пробное взятие крови и определение активности иммунных сывороток методом двойной иммунодиффузионной преципитации в геле по Оухтерлони. Титр полученных сывороток составлял 1:16–1:32. После кровопускания из сывороток выделяли иммуноглобулины каприловым методом, концентрируя их до 20 мг/мл. Конъюгацию с флуоресцеин-изотиацианатом (ФИТЦ) осуществляли при pH (9,5±0,1) из расчета 20,0 мг красителя на 1 г белка.

Очистку конъюгата от несвязавшегося ФИТЦ проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50. При очистке конъюгата собирали фракции первого пика, определяли концентрацию белка и молярное отношение ФИТЦ/белок спектрофотометрическим методом при двух длинах волн 280 нм и 495 нм, используя разведение конъюгата 1:50 и 1:100. Оптимальная концентрация белка конъюгата – (10±1) мг/мл, M<sub>w</sub>/M<sub>o</sub> – 3–5.

Полученный препарат разливали в ампулы, замораживали до (–40±1) °С и лиофилизировали на сушильной установке ЛС-500.

Для определения срока хранения приготовленных фиксированных и обеззараженных мазков их хранили при 4 °С (±1) в течение 18 мес. Установлено, что мазки с культурой *B. anthracis* СТИ-1 в течение срока наблюдения сохраняли исходное качество – контрольные положительные сыворотки обеспечивали свечение сибиреязвенных микробных клеток на 4+ в диагностических титрах.

В качестве положительного контрольного образца использовали сыворотки, полученные от больных сибирской язвой во время вспышек данной инфекции в 2010 г. в Чеченской Республике и Республике Дагестан. Перед исследованием сыворотки крови обеззараживали добавлением мертиолатата натрия до концентрации 1:10000, инактивировали на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин, лиофилизировали и запаивали в ампулы.

Для изучения специфичности тест-системы было использовано 100 сывороток здоровых доноров, предоставленных Ставропольской краевой станцией переливания крови. Сыворотки крови также обеззараживали, инактивировали, лиофилизировали и запаивали в ампулы. В работе использовали сыворотки в разведениях 1:20 и 1:40.



В результате установлено, что три сыворотки доноров давали положительную реакцию со свечением 3+ в разведениях 1:20 и 1:40. При исследовании остальных сывороток свечения не наблюдалось. Специфичность тест-системы составила 97 %. Контрольная положительная сыворотка в диагностическом титре 1:40 обеспечивала специфическое свечение на 4+.

Чувствительность метода по диагностическому титру не менее 1:40 при рабочем разведении ФИТЦ-конъюгата не менее 1:16. При его апробации в разные временные сроки, при проведении исследования разными специалистами получены идентичные результаты, т.е. метод одинаково воспроизводим.

Разработанный набор реагентов иммунофлуоресцентной тест-системы включает в себя следующие компоненты:

- антигенный препарат – предметные стекла, на поверхность которых нанесены по 8 фиксированных мазков 18-часовой вегетативной культуры вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1;

- положительный контрольный образец – сыворотка крови реконвалесцента, содержащая антитела против возбудителя сибирской язвы, обеззараженная, инактивированная, лиофилизированная;

- отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела против возбудителя сибирской язвы, инактивированная, лиофилизированная;

- ФИТЦ – конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов человека;

- инструкция по применению.

На сконструированную тест-систему разработаны нормативные документы (инструкция по применению, технические условия, образцы внешней и внутренней маркировки), проведены внутрилабораторные и межлабораторные испытания.

Таким образом тест-система для определения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител специфична, проста в обращении, имеет срок годности не менее года и может быть рекомендована для лабораторной диагностики сибирской язвы у людей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):37–9.
2. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2008. 416 с.
3. Тюментцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Базиков И.А., Алиева Е.В. Способ получения диагностической сыворотки. Патент № 213510 РФ, опубл. 27.08.99 г. Бюл. № 24.

#### References

1. 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]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111): 37–9.
2. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V., Nikiforov V.V. [Human Anthrax: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.
3. Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Efremenko V.I., Bazikov I.A., Alieva E.V. [Method of diagnostic serum production]. RF Patent 213510.

#### Authors:

Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhdanova E.V., Tsygankova O.I., Buravtseva N.P., Eremenko E.I., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Zuenko A.A., Kulichenko A.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жданова Е.В., Цыганкова О.И., Буравцева Н.П., Еременко Е.И., Тюментцева И.С., Коготкова О.И., Зуенко А.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 24.04.13.

Л.А.Башарова, С.П.Ярков, С.И.Третьяков, В.Н.Злобин

## СОЗДАНИЕ ИНДИКАТОРНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РИККЕТСИЙ БЕРНЕТА

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация

Целью работы явилась разработка иммунохроматографических индикаторных элементов (ИЭ) для экспресс выявления риккетсий Бернета. В качестве антител захвата при построении иммунохроматографического анализа использовали кроличьи IgG к коксиеллам Бернета, выделенные из гипериммунной сыворотки кроликов спиртовым фракционированием по Кону и дополнительно очищенные аффинной хроматографией с использованием белка А. Антигеном служили инактивированные клетки коксиелл Бернета, штамм «Желтогорлая мышь-Луга». Иммунохроматографический анализ был построен в формате «сэндвич» с использованием вспомогательных и аналитических мембран «Миллипоре». В результате проведенных исследований разработаны ИЭ для выявления риккетсий Бернета с чувствительностью  $1 \cdot 10^6$  м.к./мл и временем анализа – 20 мин. ИЭ специфичен также по отношению к риккетсиям Провачека, антигенным комплексам риккетсий Провачека и риккетсий Сибирика в концентрации 8 АЕ/мл, а также вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП). Разработанные ИЭ могут быть использованы для экспресс-индикации риккетсий Бернета на различных стадиях лабораторного исследования. Короткое время анализа, отсутствие дополнительных технологических операций, визуальная и (или) приборная регистрация позволяют рассматривать иммунохроматографический метод выявления риккетсий Бернета как один из вариантов выявления этих микроорганизмов в полевых условиях, при мониторинге объектов окружающей среды.

**Ключевые слова:** иммунохроматография, выявление, *Coxiella burnetii*.

L.A.Basharova, S.P.Yarkov, S.I.Tret'yakov, V.N.Zlobin

## Construction of Immune-Chromatographic Indicator Elements for Burnet Rickettsia Detection

State Research Institute for Biological Instrumentation Engineering of the Federal Medical-Biological Agency,  
Moscow, Russian Federation

Objective of the research was to construct immune-chromatographic indicator elements (IE) for rapid Burnet Rickettsia detection. Rabbit IgGs to *Coxiella burnetii* isolated from hyperimmune rabbit sera using Cohn fractionation and further purified by means of affinity chromatography with A-protein were used as capture antibodies during the process of immune-chromatographic assay development. Inactivated cells of *Coxiella burnetii*, “Yellow-necked mouse – Luga” strain, performed the role of the antigen. Immune-chromatographic assay was plotted in a “sandwich” format with application of accessory and analytical membranes “Millipore”. Based on the investigations conducted, developed were the IEs for Burnet Rickettsia detection, their sensitivity being of  $1 \cdot 10^6$  mc/ml, and the elapsed time – 20 minutes. The IE is specific to other members of the family *Rickettsiaceae*, for instance to *R. prowazekii*, to antigen complexes of *R. prowazekii* and *R. sibirika*, as well as to vaccinia virus (L-IVP strain). The IE engineered can be used for rapid indication of Burnet Rickettsia at different stages of laboratory investigation. Span time reduction, lack of necessity to perform any accessory technological operations, visual and (or) automatic registration of the results build up premises to observe immune-chromatographic method for Burnet Rickettsia detection as one of the alternatives for identification of these microorganisms under field conditions when monitoring ambient environment objects.

**Key words:** immune-chromatography, detection, *Coxiella burnetii*.

Риккетсии Бернета (*Coxiella burnetii*) относятся к внутриклеточным микроорганизмам семейства риккетсий (*Rickettsiaceae*), рода *Coxiella* [2, 3], вызывающим лихорадку Ку – острую инфекционную болезнь с полиморфной клинической картиной, что затрудняет диагностику и клиническую дифференциацию лихорадки Ку с другими инфекционными болезнями, такими как брюшной тиф, бруцеллез, пневмонии различной этиологии, аденовирусные инфекции, туберкулез. Решающее диагностическое значение имеют серологические тесты, с помощью которых выявляют специфические антитела у больных. Для серологической диагностики наиболее широко используют реакцию агглютинации (РА), реакцию связывания комплемента (РСК) и реакцию прямой иммунофлуоресценции (РНИФ) [1, 6].

Эпидемической особенностью лихорадки Ку, по сравнению с другими риккетсиозами, является множественность резервуаров и источников инфекции

в природе, а также множественность путей передачи возбудителя человеку от источника инфекции – аэрогенным путем, через воду, пищевые продукты. Возбудитель относится к необычно устойчивым микроорганизмам во внешней среде, а также к различным физическим и химическим воздействиям [3].

Учитывая сказанное выше, выявление риккетсий Бернета в объектах окружающей среды представляет актуальную задачу. Обнаружение возбудителя инфекции по схеме специфической индикации осуществляется при помощи табельных методов – метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой гемагглютинации эритроцитов (РНГА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Иммунохроматографические экспресс-методы индикации риккетсий Бернета в нашей стране до настоящего времени отсутствовали.

Целью настоящей работы явилась разработка иммунохроматографического индикаторного элемен-

та (ИЭ) для выявления риккетсий Бернета в объектах окружающей среды.

### Материалы и методы

В работе использовали кроличьи поликлональные антитела (ПКА) класса IgG, выделенные спиртовым фракционированием по Кону из гипериммунной сыворотки кроликов породы шиншилла, иммунизированных клетками *S. burnetii* штамм «Желтогорлая мышь-Луга». Титр ПКА в РНИФ составил 1:2560. ПКА подвергали дополнительной очистке методом колоночной аффинной хроматографии на агарозе с использованием белка А. Использовали колонки производства фирмы Pall (США).

В качестве антигена использовали инаktivированные формальдегидом клетки риккетсий Бернета штамм «Желтогорлая мышь-Луга», полученные из селезенки инфицированных беспородных белых мышей. Выделение риккетсий осуществляли путем растирания селезенки в ступке с 0,9 % раствором формальдегида на 1 % растворе хлорида натрия из расчета 1 мл на 1 селезенку. Для повышения выхода риккетсий из клеточного материала исходную суспензию подвергали трехкратному замораживанию до  $-40^{\circ}\text{C}$  и оттаиванию. Антиген отделяли от клеточного детрита центрифугированием. Концентрация антигена, определенная по стандарту мутности, составила  $1 \cdot 10^{10}$  м.к./мл. Антигенный материал риккетсий и спиртовая фракция ПКА к ним были получены из научно-исследовательского и испытательного центра медико-биологической защиты «ГосНИИИ военной медицины» Минобороны России. Готовили десятикратные разведения суспензии риккетсий в диапазоне концентраций  $10^5$ – $10^8$  м.к./мл в разводящем буфере состава – 0,1 М ФБ pH 7,8 с 0,5 % БСА и 0,4 % твин-20.

Для изучения специфичности разработанных ИЭ использовали риккетсии Провачека (ФС 42-3930-00), АГ риккетсий Сибирика или Провачека, представляющие собой лиофилизированные антигенные комплексы, выделенные путем эфирной обработки риккетсий, выращенных в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов и инаktivированных фенолом («НПО «Микроген»), и осповакцину штамма Л-ИВП, ФСП 42-05041124-04 (НПО «Вирион»).

Изготовление ИЭ осуществляли согласно схеме, описанной нами ранее [4]. Наночастицы коллоидного золота для конъюгирования с антителами получали восстановлением 0,01 % раствора золотохлористоводородной кислоты  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия [8]. Стабилизирующую концентрацию иммуноглобулинов для полученного золя золота, соответствующую точке адсорбционного насыщения поверхности частиц золя данными антителами, определяли визуально по агрегации и выпадению в осадок частиц золя [7]. Аналитическую зону ИЭ формировали из IgG против риккетсий Бернета, а контрольную зону – из антител козы против иммуноглобулинов кролика (КозАК). Регистрацию аналитического эффекта проводили как визуально, так и с помощью отече-

ственного видеоцифрового анализатора иммунохроматограмм «Рефлеком» (ООО «Синтеко-Комплекс»), внесенного в государственный реестр средств измерений России [5]. Прибор регистрировал величину окрашивания аналитической и контрольной зон ИЭ в условных единицах. Измерения для каждой концентрации микробных клеток и отрицательных контролей проводили пятикратно, вычисляли среднее арифметическое и определяли погрешность измерения с использованием коэффициентов Стьюдента ( $t_p=2,78$  при  $n=5$ ) с 95 % надежностью.

### Результаты и обсуждение

Сконструированный нами ИЭ для выявления риккетсий состоял из аналитической мембраны с присоединенными подложками разного вида, соединенных в мультимембранный композит. На аналитическую мембрану были нанесены в виде тонких линий растворы специфических к риккетсиям антител (в аналитическую зону ИЭ) и КозАК (в контрольную зону ИЭ). Мультимембранный композит помещали в пластиковую оправку с круглым отверстием для внесения образца и прямоугольным отверстием для считывания результатов анализа. Жидкий образец, нанесенный на ИЭ, содержащий суспензию риккетсий, под действием капиллярных сил начинал перемещаться по подложке для впитывания образца, далее смывал с конъюгатной подложки конъюгат наночастиц золя золота со специфическими антителами. При этом образовывался окрашенный иммунный комплекс, который с током жидкости перемещался по аналитической мембране. Иммунный комплекс задерживался специфическими антителами, нанесенными в аналитической зоне аналитической мембраны, что приводило к образованию окрашенной в красно-вишневый цвет линии. Часть иммунного комплекса и несвязавшийся конъюгат продвигались по аналитической мембране до контрольной зоны, где антивидовые антитела образовывали иммунный комплекс с антителами конъюгата. Образование такого комплекса визуально проявлялось в образовании окрашенной линии в контрольной зоне и свидетельствовало об иммунохимической активности конъюгата. Если в образце риккетсии Бернета отсутствовали, либо их концентрация была ниже чувствительности ИЭ, то окрашенная линия в аналитической зоне не образовывалась. Это соответствовало отрицательному результату анализа и такой ИЭ считался непригодным, а результаты анализа, полученные с его помощью, не учитывались.

При регистрации результатов иммунохроматографического анализа визуально различимая четкая полоса красно-вишневого цвета в аналитической зоне ИЭ соответствовала показаниям прибора «Рефлеком» ( $2,30 \pm 0,02$ ) усл.ед. и более, а интенсивность окрашивания аналитической зоны в отрицательном контроле (визуально воспринимаемое как отсутствие окрашивания) не превышала ( $1,10 \pm 0,04$ ) усл.ед. Интенсивность окрашивания аналитической зоны ИЭ была пропорциональна концентрации риккетсий в анализируемых растворах (таблица).



Чувствительность и специфичность ИЭ для выявления риккетсий Бернета

| Наименование препарата                             | Концентрация              | Визуальная оценка интенсивности окрашивания аналитической зоны ИЭ* | Интенсивность окрашивания**, измеренная анализатором «Рефлеком», усл.ед. (n=5) |                     |
|----------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
|                                                    |                           |                                                                    | Аналитическая зона ИЭ                                                          | Контрольная зона ИЭ |
| Отрицательный контроль                             | 0 м.к./мл                 | -                                                                  | 1,10±0,04                                                                      | 7,30±0,20           |
| Риккетсии Бернета<br>штамм «Желтогорлая мышь-Лука» | 5·10 <sup>5</sup> м.к./мл | +                                                                  | 1,20±0,04                                                                      | 7,40±0,10           |
|                                                    | 1·10 <sup>6</sup> м.к./мл | ++                                                                 | 2,30±0,02                                                                      | 7,70±0,20           |
|                                                    | 5·10 <sup>6</sup> м.к./мл | +++                                                                | 4,90±0,10                                                                      | 8,10±0,30           |
|                                                    | 1·10 <sup>7</sup> м.к./мл | +++                                                                | 6,30±0,02                                                                      | 7,90±0,20           |
| Риккетсии Провачека                                | 1·10 <sup>8</sup> м.к./мл | -                                                                  | 1,20±0,10                                                                      | 7,50±0,20           |
| Антиген риккетсий Провачека                        | 8 АЕ/мл                   | -                                                                  | 1,10±0,05                                                                      | 7,40±0,10           |
| Антиген риккетсий Сибирика                         | 8 АЕ/мл                   | -                                                                  | 1,10±0,03                                                                      | 7,80±0,20           |
| Осповакцина, штамм Л-ИВП                           | 1·10 <sup>8</sup> ООЕ/мл  | -                                                                  | 1,20±0,04                                                                      | 8,0±0,10            |

\* «-» – отсутствие видимой глазом полосы; «+» – слабая красно-вишневая полоса; «++» – четко различимая красно-вишневая полоса; «+++» – четкая, интенсивно окрашенная полоса.

\*\* А – среднее значение показаний прибора, усл.ед., ε – рассчитанная погрешность измерения при 95 % надежности и коэффициенте Стьюдента t<sub>p</sub>=2,78.

При изучении специфичности полученных ИЭ показано, что разработанный ИЭ специфичен, не дает перекрестных реакций с другими представителями семейства *Rickettsiaceae* – риккетсиями Провачека в концентрации 1·10<sup>8</sup> м.к./мл, антигенными комплексами риккетсий Провачека и риккетсий Сибирика в концентрации 8 АЕ/мл, и вирусом осповакцины штамма Л-ИВП в концентрации 1·10<sup>8</sup> ООЕ/мл (таблица).

Чувствительность ИЭ для выявления риккетсий Бернета укладывается в типичные диапазоны чувствительности иммунохроматографического метода при выявлении клеток микроорганизмов и токсинов, так например, бактерии выявляются в диапазоне 2·10<sup>5</sup> – 1·10<sup>6</sup> КОЕ/мл, вирусы 2·10<sup>5</sup> – 5·10<sup>7</sup> БОЕ/мл, а бактериальные токсины 50–250 мг/мл [9].

Время анализа с помощью ИЭ составляло 20 мин при комнатной температуре. Экспериментально доказано, что чувствительность и время анализа с помощью ИЭ в диапазоне температур 10–35 °С не изменялась. Нами показано, что при добавлении в суспензии риккетсий почвенной пыли до конечной концентрации 0,1 мг/мл чувствительность ИЭ не уменьшалась, а ложноположительные результаты анализа не возникали. Время хранения ИЭ в упаковке не менее 1 года при комнатной температуре.

В результате проведенных исследований разработаны иммунохроматографические ИЭ для выявления риккетсий Бернета с чувствительностью 1·10<sup>6</sup> м.к./мл. Короткое время анализа, отсутствие дополнительных технологических операций, визуальная и (или) приборная регистрация позволяют рассматривать иммунохроматографический метод выявления риккетсий Бернета как один из вариантов выявления этих микроорганизмов в полевых условиях при мониторинге объектов окружающей среды. ИЭ можно также использовать как дополнительное средство иммунохимического анализа, повышающее достоверность идентификации риккетсий, после этапа биологического обогащения проб.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосенкова Н.И., Дайтер А.Б., Токарев Н.К. Лихорадка Ку. Лабораторные исследования в эпидемиологической практике. Л.; 1976. С. 67–85.

2. Лобан К.М. Лихорадка Ку (кокциеллез). М.: Медицина; 1987. 128 с.

3. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.

4. Титов А.А., Шиленко И.В., Морозов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов. *Прикладная биохим. и микробиол.* 2012; 48(2):249–56.

5. Ярков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Злобин В.Н. Индикация возбудителей особо опасных заболеваний с помощью иммунохроматографии и видеоцифрового анализа. *Вестник РАМН.* 2007; 12:22–6.

6. Fiset P., Wisserman C.L., El Batawi Y. Immunologic evidence of human fetal infection with *C. burnetii*. *Am. J. Epidemiol.* 1975; 101(1):65–9.

7. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and antiimmunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and coat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.* 1977; 25 (11):1187–200.

8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press. Inc.; 1996. P. 593–604.

9. Peruski A.H., Peruski L.F. Immunological methods for detection and identification infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13

## References

1. Amosenkova N.I., Dayter A.B., Tokarevich N.K. [*Coxiella burnetii* Infection. Laboratory Studies in Epidemiological Investigations]. L.; 1976 P. 67–85.

2. Loban K.M. [*Coxiella burnetii* Infection]. M.: Meditsina; 1987. 128 p.

3. Onishchenko G.G., editor [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents: Practice Guidelines]. M.: ZAO "Gigiena"; 2006. 288 p.

4. Titov A.A., Shilenko I.V., Morozov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. [Development and optimization of immune-chromatographic assays for botulinum toxin detection]. *Priklad. Biokhim. Mikrobiol.* 2012; 48(2):249–56.

5. Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Basharova L.A., Zlobin V.N. [Indication of pathogenic agents causing particularly dangerous infections using immunochromatography and image digitizing]. *RAMS Bulletin.* 2007; 12:22–6.

6. Fiset P., Wisserman C.L., El Batawi Y. Immunologic evidence of human fetal infection with *C. burnetii*. *Am. J. Epidemiol.* 1975; 101(1):65–9.

7. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and antiimmunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and coat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.* 1977; 25 (11):1187–200.

8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press. Inc.; 1996. P. 593–604.

9. Peruski A.H., Peruski L.F. Immunological methods for detection and identification infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13

## Authors:

Basharova L.A., Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Zlobin V.N. State Research Institute for Biological Instrumentation Engineering at the Federal Medical-Biological Agency. Moscow, Russian Federation

## Об авторах:

Башарова Л.А., Ярков С.П., Третьяков С.И., Злобин В.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, корпус 1. E-mail: niibp@dol.ru

Поступила 04.06.13.

Е.В.Гаврилова, Р.А.Максютов, С.Н.Щелкунов

**ОРТОПОКСВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ: ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА (ОБЗОР)***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация*

Отсутствие у населения иммунитета против патогенных для человека ортопоксвирусных инфекций и участвовавшие случаи поражения человека данными вирусами требует разработки быстрых высокочувствительных методов видоспецифичной диагностики ортопоксвирусов. В обзоре представлена современная эпидемиологическая ситуация по ортопоксвирусным инфекциям человека. Освещены клинические аспекты течения заболеваний, вызванных вирусами натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян, оспы коров и осповакцины. Представлен исторический обзор классических методов диагностики данных вирусов. Обобщены достижения в области современных молекулярно-диагностических методов, учитывающих как родоспецифичную, так и видоспецифичную детекцию агентов ортопоксвирусных инфекций человека. Показана актуальность такого типирования в плане возможного появления ВНО-подобного вируса в результате естественной эволюции существующих зоонозных ортопоксвирусов или применения вируса натуральной оспы в качестве агента биотерроризма.

**Ключевые слова:** вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус оспы коров, вирус осповакцины, мультиплексный ПЦР, ПЦР в реальном времени, видоспецифичная детекция.

E.V.Gavrilova, R.A.Maksyutov, S.N.Shchelkunov

**Orthopoxvirus Infections: Epidemiology, Clinical Picture, and Diagnostics (Scientific Review)***State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tovo, Russian Federation*

Lack of immunity among the population against pathogenic orthopoxviruses and an increased number of these infections human cases testify to the need of development of the rapid high-sensitive methods for species-specific orthopoxvirus diagnostics. The review presents current epidemiological situation on human orthopoxvirus infections. Addressed are clinical aspects of the disease, caused by small pox virus (SPV), Monkeypox virus, cowpox virus, and vaccinia virus. Represented is a historical survey of the conventional methods for diagnostics of these particular viruses. Reconsidered are the benefits of researches into the sphere of state-of-the-art molecular-diagnostic techniques taking into view both genus-specific and species-specific detection of agents, causing orthopoxvirus infections in humans. Demonstrated is the urgency of new-generation typing in view of occurrence of a novel SPV-like virus emerged as a result of natural evolution of existing zoonotic orthopoxviruses or SPV application as a biological terroristic agent.

**Key words:** small pox virus, Monkeypox virus, cowpox virus, vaccinia virus, multiplex PCR, real-time PCR, species-specific detection.

Род *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae* широко известен двумя представителями – вирусом натуральной оспы (ВНО), возбудителем натуральной оспы, одного из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, и вирусом осповакцины (ВОВ), с помощью которого были проведены миллиарды вакцинаций людей и осуществлена всемирная победа над натуральной оспой. В состав рода также входят такие патогенные для человека зоонозные вирусы, как вирус оспы обезьян (ВОО) и вирус оспы коров (ВОК) [43].

В 1980 г. на 33-й Всемирной ассамблее здравоохранения было объявлено о глобальной ликвидации оспы и рекомендовано прекратить вакцинацию против данной инфекции. К настоящему времени население всех стран мира в возрасте до 35 лет не имеет иммунитета ни против оспы, ни против других ортопоксвирусных инфекций. А люди старшего возраста, ранее вакцинированные против оспы, имеют ослабленный иммунитет против данной группы вирусов [16, 36]. С каждым годом человечество становится все менее защищенным от ортопоксвирусных инфекций. Об этом свидетельствуют многочисленные сообщения о случаях поражения человека данными вирусами [3, 8, 10, 11, 18, 28, 33]. Обсуждаются воз-

можности появления ВНО-подобного вируса в результате естественной эволюции существующих зоонозных ортопоксвирусов [41] или применение ВНО в качестве агента биотерроризма [6]. Опыт кампании по ликвидации оспы показывает, что наличие эффективной системы наблюдения за случаями оспы и при поддержке соответствующей инфраструктуры быстрые и тщательные действия по сдерживанию распространения инфекции могут прервать цепь передачи и остановить вспышки оспы в течение относительно короткого времени. Поэтому своевременная и надежная оценка вида возбудителей является начальным и наиболее важным звеном в сложной цепи противоэпидемических и терапевтических мероприятий по борьбе с ортопоксвирусными инфекциями. Этим объясняется особый интерес в настоящее время к поиску быстрых, высокочувствительных и высокоспецифичных методов детекции и идентификации ортопоксвирусов, патогенных для человека.

**Традиционные диагностические методы**

К традиционным методам экспресс-диагностики ортопоксвирусов относятся: электронная микроско-

пия (ЭМ) содержимого кожных поражений и мазков глотки; обнаружение ортопоксвирусного антигена в обработанных пробах с помощью соответствующей тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА); выявление антител к ортопоксвирусам в сыворотке крови в соответствующей тест-системе ИФА. При необходимости установления диагноза в упрощенных (полевых) условиях, отсутствии соответствующих тест-систем ИФА и невозможности исследовать пробу с помощью электронной микроскопии, используют вспомогательные методы – метод флуоресцирующих антител, реакцию микропреципитации в агаре, реакцию торможения гемагглютинации [43].

Что касается электронной микроскопии, несмотря на высокую чувствительность и надежность метода, большинство исследователей отмечают ряд его недостатков. При использовании метода ЭМ отсутствует возможность проводить видовую дифференциацию ортопоксвирусов. Это относится и к серологическим методам, которые позволяют идентифицировать, как правило, только родовую принадлежность вирусов, и их чувствительность не всегда достаточна при анализе клинических образцов.

Выделение возбудителя на куриных эмбрионах или в культуре клеток проводят для подтверждения диагноза, а также всесторонней характеристики клинического образца. Необходимым этапом исследования является изоляция вируса. Время исследования с использованием как той, так и другой системы изоляции составляет от 3 до 6 сут, а предусмотренное при отрицательном результате проведение 2-го пассажа вдвое удлинит этот срок. Следует особо отметить, что по современным правилам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) работа с живым ВНО разрешена лишь в двух лабораториях мира, аттестованных ВОЗ, – в Сотрудничающих центрах ВОЗ по оспе при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область, Россия) и Центрах по контролю и предотвращению заболеваний (Атланта, Джорджия, США).

Совершенствование средств и методов лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций происходит на основе достижений в молекулярно-биологическом изучении вирусов группы оспы, среди основных тенденций этого процесса необходимо отметить комплекс диагностических методов, основанных на генетическом анализе ортопоксвирусных инфекций. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, олигонуклеотидные микрочипы, мультиплексная ПЦР представляют собой последние диагностические разработки для клинической лаборатории.

#### **Применение молекулярно-диагностических методов в видоспецифичной детекции ортопоксвирусов**

*Вирус оспы коров.* Оспа коров у человека – зоонозное заболевание, основное количество случа-

ев которого регистрируется в странах Европы [46]. Природным резервуаром вируса оспы коров (ВОК) являются грызуны [22]. Передача вируса человеку происходит при прямом контакте с инфицированным животным, это могут быть как грызуны [12], так и животные, контактирующие с грызунами: кошки, собаки и другие. В большинстве случаев заболевание у человека протекает доброкачественно и характеризуется развитием местных поражений, чаще всего на кистях, предплечьях, лице и реже других частях тела. Течение инфекционного процесса сопровождается ухудшением самочувствия, повышением температуры. Иногда происходит генерализация процесса [12, 19, 46].

За последние годы в странах Европы отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания людей оспой коров [46]. В декабре 2008–январе 2009 гг. во Франции и Германии наблюдалась беспрецедентная вспышка оспы коров у людей [8, 28], обусловленная передачей ВОК от инфицированных домашних крыс. Это указывает на необходимость специальных усилий по подготовке медицинского персонала, разработке современных средств быстрой диагностики этиологического агента данного заболевания, поиску противовирусных препаратов, специфичных против ортопоксвирусов.

На сегодняшний день для диагностики ВОК используют серологические [29] и биологические методы [5]. Видовую идентификацию ВОК можно осуществить с помощью метода ПЦР в реальном времени [17]. Метод, основанный на TaqMan ПЦР в реальном времени, впервые позволил специфически детектировать ВОК. Метод адаптирован к 3 различным диагностическим приборам (Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, USA), iQ 5 (BioRad, USA) и Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia)). Для диагностики ВОК также используют секвенирование [9].

*Вирус осповакцины.* Вирус осповакцины (ВОВ) является прототипным видом рода Orthopoxvirus. Он наиболее хорошо изучен среди всех представителей этого рода. Свое название получил от *variola vaccinae* (от латинского слова *vacca* – корова) [43]. Споры о природном резервуаре ВОВ до сих пор продолжаются. По последним данным вспышек заболевания людей, обусловленных ВОВ-подобным вирусом в Индии и Бразилии, природным резервуаром этого вируса являются грызуны, которые могут быть вовлечены в его распространение и трансмиссию в природе [23]. Передача вируса человеку происходит при прямом контакте с инфицированным животным. В большинстве случаев образуются характерные высыпания, чаще локализованные на руках, иногда на ногах и лице. Заболевание у человека протекает доброкачественно, в некоторых случаях у больных отмечаются такие симптомы, как повышенная температура, головные боли, редко лимфаденопатия [45]. В настоящее время зарегистрированы несколько сообщений о вспышках заболеваний людей, вызван-



ных зоонозными ВОВ-подобными вирусами [3, 18] в разных странах. Так как грызуны ассоциированы с трансмиссией ВОВ в природе, необходим контроль распространения заболевания человека, обусловленного этим вирусом. Одним из способов эпидемиологического надзора является лабораторная диагностика. Наравне с классическими методами [47], в настоящее время разработаны специфические методы для идентификации ВОВ на основе LightCycler ПЦР в реальном времени и с применением ДНК-интеркалирующих красителей [31, 45].

**Вирус оспы обезьян.** Оспа обезьян – зоонозная инфекция, циркулирующая среди различных видов дикоживущих грызунов и приматов, обитающих преимущественно в зоне влажных тропических лесов Центральной и Западной Африки. Инфекционным агентом является вирус оспы обезьян (ВОО). К настоящему времени имеются свидетельства, подтверждающие, что несколько видов млекопитающих играют важную роль в циркуляции ВОО и являются источником первичного заражения вследствие прямого контакта с ними человека [35]. Источником заражения оспой обезьян может явиться и больной этой инфекцией человек [43].

С момента открытия оспы обезьян у человека случаи этого заболевания у людей регулярно регистрировали в Африке [7, 11, 26]. В 2003 г. вспышка оспы обезьян у людей была впервые зафиксирована вне африканского континента – в США [10]. Данная инфекция была завезена в США с больными животными из Западной Африки, используемыми в качестве домашних питомцев. Клинические признаки оспы обезьян у людей сходны с таковыми натуральной оспы, преобладавшей на Африканском континенте: головная боль, слабость, боли в мышцах, характерная сыпь. Инкубационный период длится 10–14 дней. Отличительной особенностью от натуральной оспы являются лимфадениты, которые наблюдаются у более 85 % заболевших. Летальность при оспе обезьян у людей, установленная по результатам изучения 300 случаев в ходе специального проекта ВОЗ (1981–1986), составила 9,8 % [43].

ВОО, являясь зоонозом, широко представлен в природе, что является угрозой для человека во время вероятного контакта с африканскими животными. Смертельные случаи от заболевания оспой обезьян были зарегистрированы в странах Центральной Африки [7, 43]. Ранее считалось, что оспа обезьян с гораздо меньшей эффективностью передается от человека к человеку, чем натуральная оспа. Однако постепенное накопление данных приводит к необходимости пересмотреть представления об оспе обезьян как о малокоонтагиозной инфекции человека. Так, во время вспышки оспы обезьян в провинции Восточный Касаи количество заболевших в результате передачи инфекции от человека к человеку составило 73 % [20]. При этом число генераций в цепи передачи инфекций от человека к человеку достигало 8. Основной особенностью вспышки оспы обезьян в

Конго в 2003 г. также являлась передача инфекции от человека к человеку, с наличием, как предполагают, 7 генераций [26, 27]. Все это говорит об обострении эпидемической ситуации по оспе обезьян не только для стран Африки, но и, как показала вспышка оспы обезьян в США в 2003 г., для всего мира.

Для диагностики ВОО используют классические методы [43]. Для специфической диагностики ВОО D.A.Kulesh и соавт. [25] предложили метод на основе ПЦР в реальном времени (TaqMan с малобороздочным ДНК-лигандом, на основе последовательности генов F3L и N3R), который был испытан на образцах, полученных от 52 грызунов во время вспышки оспы обезьян в США в 2003 г. M.Saijo и соавт. [38] для обнаружения ДНК ВОО предложили альтернативный метод LightCycler ПЦР на основе последовательности гена A26L. Для обоих методов показана 100 % специфичность.

**Вирус натуральной оспы.** Вирус натуральной оспы (ВНО) является строгим антропонозом. По общепринятой классификации штаммы ВНО разделяют на два эпидемиологических типа: вирусы большой оспы (*variola major*) с летальностью во время вспышки заболевания натуральной оспы от 5 до 40 % и вирусы малой оспы (*variola minor*) с меньшей летальностью. Малую оспу в Южной Америке принято называть *alastrim* в отличие от Африки, где за ней сохранилось наименование *variola minor* [43].

Клинические проявления большой оспы многообразны. Всего различают пять клинических форм натуральной оспы: дискретная, сливная, геморрагическая, вариолоид и натуральная оспа без сыпи [2]. Такое разнообразие форм течения натуральной оспы, полагают, связано с состоянием иммунитета человека в момент заражения. Инкубационный период у большинства больных равен 7–9 дням. Далее наступает продромальный период (до появления температуры), который, как правило, сохраняется 1–3 дня и сопровождается головной болью, слабостью, бессонницей, тошнотой, болями в мышцах и суставах. Далее следует лихорадочный период. На 3–4-е сутки от начала лихорадки появляются папулезные высыпания (истинная сыпь – основное клиническое проявление оспы), которые проходят стадию папулы, везикулы, пустулы и стадию образования корок.

Оспа относится к высококоонтагиозным болезням. Для *variola major* инфекционность в среднем составляла для восприимчивых лиц при тесном контакте 58,4 % [43]. По материалам программы ликвидации оспы установлено, что в среднем один больной заражал пять человек, хотя нередко эта цифра могла быть значительно больше. Вакцинация против оспы резко снижает восприимчивость к инфекции. В этом случае заразительность уменьшается до 3,8 %.

Клиническая диагностика оспы при типичных формах: дискретной, сливной, геморрагической с наличием сыпи ставится при динамическом наблюдении за больным и процессе развития сыпи. Крайне затруднен диагноз при вариолоиде и оспе без сыпи [2].

Ранее, вариолоид часто принимался за ветряную оспу, аспе vulgaris, импетиго, и другие инфекционные заболевания. К этому добавляется и то обстоятельство, что современное поколение врачей-инфекционистов не встречалось с оспой и знает о ней лишь из учебников и руководств. Все это может привести к тому, что в результате неправильно установленного первоначального диагноза своевременно не будет принят необходимый комплекс противоэпидемических мероприятий, и инфекция начнет свободно распространяться. В связи с этим особое значение приобретают методы лабораторной диагностики, позволяющие дать быстрый ответ вне зависимости от клинического опыта врача.

Широкое развитие лабораторных методов обнаружения ВНО обусловлено программой по глобальной ликвидации натуральной оспы, а в последние годы – опасностью биотеррористических атак с использованием ВНО. На современном этапе проводят вирусоскопическое (ЭМ), вирусологическое, серологическое (микропреципитация в агаре, ИФА)

[43] и молекулярно-диагностическое исследование биологических образцов. Среди молекулярно-диагностических следует отметить высокочувствительные методы, основанные на ПЦР в реальном времени, которые в настоящее время получили широкое развитие. Опубликованные данные о новых разработанных методах идентификации ВНО на основе ПЦР в реальном времени обобщены в таблице.

### Диагностика ортопоксвирусных инфекций человека на основе мультиплексного ПЦР

Факт наличия четырех видов патогенных для человека ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ), имеющих различную патогенность и эпидемическую значимость, указывает на целесообразность применения методов, позволяющих одновременно обнаружить и охарактеризовать видовую принадлежность вируса. Описанные выше методы позволяют детектировать и дифференцировать только один из патогенных для человека ортопоксвирусов. Проблема

Генодиагностика ВНО при использовании ПЦР в реальном времени

| Метод       | Ген-мишень*                 | Чувствительность/<br>Специфичность | Примечание                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Ссылки   |
|-------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| TaqMan      | A56R                        | 96,1–99,5 %/<br>95,7–98,3 %        | Позволяет детектировать ДНК ВНО. Специфичность и чувствительность были проанализированы на ДНК 73 изолятов различных вирусов, в том числе 48 различных изолятов ВНО                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [20]     |
| TaqMan MGB  | A56R                        | 96 %/98 %                          | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО за счет одновременного использования двух специфичных флуоресцентных проб. Метод адаптирован с использованием лиофилизованных реагентов смеси                                                                                                                                                                                                                                                                                              | [4]      |
| TaqMan MGB  | A56R                        | 75,0–93,8 %/<br>100 %              | Позволяет детектировать ДНК ВНО. Специфичность и чувствительность были проанализированы на ДНК панелей: USAMRIID и CDC blind panel                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | [23]     |
| LightCycler | A56R                        | N/A / N/A                          | Позволяет детектировать и дифференцировать ДНК ортопоксвирусов. Недостаток – разработанные флуоресцентные пробы к ВНО имеют идентичную нуклеотидную последовательность с ДНК некоторых штаммов ВОК, что может привести к ошибочному выявлению вирусного агента                                                                                                                                                                                                                                                                      | [32]     |
| LightCycler | A56R                        | N/A/ N/A                           | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (T <sub>m</sub> , 62,45 °С) относительно других ортопоксвирусов (T <sub>m</sub> , 56,24–56,72 °С). Недостаток – разработанные флуоресцентные пробы к ВНО имеют идентичную нуклеотидную последовательность с ДНК некоторых штаммов ВОК и ВОВр, что может привести к ошибочному выявлению вирусного агента. Также отсутствие апробации методики на полноразмерной ДНК вируса натуральной оспы            | [13]     |
| LightCycler | A56R                        | N/A / N/A                          | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (T <sub>m</sub> , 56 °С) относительно других ортопоксвирусов (T <sub>m</sub> , 58–59 °С). Недостаток – отсутствие апробации методики на полноразмерной ДНК вируса натуральной оспы                                                                                                                                                                                                                     | [33]     |
| TaqMan      | A27L                        | N/A /100 %                         | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО за счет одновременного использования двух специфичных флуоресцентных проб. Специфичность была проанализирована на ДНК 85 штаммов различных ортопоксвирусов. Метод адаптирован к 4-м различным диагностическим приборам                                                                                                                                                                                                                     | [38]     |
| LightCycler | A27L                        | N/A /100 %                         | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (T <sub>m</sub> , 55,9–57,8 °С) относительно других ортопоксвирусов (T <sub>m</sub> , 61,3–65,0 °С). Были проанализированы 120 штаммов различных ортопоксвирусов, включая 46 штаммов вируса натуральной оспы. Специфичность определена на 31500 образцов крови здоровых доноров. На основе метода разработан коммерческий набор RealArt Orthopox LC PCR kit (Artus GmbH) для лабораторных исследований | [31, 39] |
| TaqMan      | C22L/B28R                   | N/A / N/A                          | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | [14]     |
| LightCycler | 1. D7R<br>2. A8L<br>3. A13L | N/A / N/A                          | Позволяет детектировать ДНК всех ортопоксвирусов и одновременно дифференцировать ДНК ВНО по уникальной температуре плавления (T <sub>m</sub> , 62–64 °С) относительно других ортопоксвирусов (T <sub>m</sub> , 44–59 °С). В основе метода лежит одновременное использование набора флуоресцентных проб, рассчитанных к трем районам ДНК ВНО, что позволяет избежать ложноположительных результатов на ДНК ВНО                                                                                                                       | [29]     |

\*OPT BOB штамм Copenhagen; N/A – не определена.

одновременной видовой идентификации решается посредством таких диагностических подходов, как гибридизация молекул ДНК на олигонуклеотидных микрочипах, применение мультиплексного формата классической ПЦР или ПЦР в реальном времени.

Один из последних разработанных методов на основе олигонуклеотидных микрочипов позволяет одновременно детектировать и идентифицировать ДНК шести видов ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ, ВОВр и ВЭ). В данной работе [37] были рассчитаны олигонуклеотидные зонды к генам С23L/В29R и В19R ортопоксвирусов для видоспецифичной диагностики, а также для увеличения специфичности метода к генам ОРТ31 вируса ветряной оспы, US4 и US5 вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, соответственно. В других работах также были предложены способы, позволяющие детектировать и дифференцировать ДНК ортопоксвирусов, патогенных для человека с помощью олигонуклеотидных микрочипов с высокой чувствительностью и специфичностью [15]. Однако к настоящему моменту нет ни одного коммерчески доступного диагностического набора для обнаружения ДНК ортопоксвирусов на основе методики микрочипов.

Мультиплексная полимеразная цепная реакция – вариант ПЦР, в которой в реакционной смеси одновременно присутствует смесь нескольких пар праймеров, специфичных в отношении разных генетических локусов, что позволяет проводить одновременную амплификацию соответствующих участков ДНК-матриц. Идея амплифицировать в одной пробирке сразу несколько различных генетических локусов привела к разработке в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» одностадийного экспресс-метода идентификации четырех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, на основе мультиплексной ПЦР (МПЦР) с последующим электрофоретическим анализом продуктов реакции [1, 42]. Специфичность разработанного метода МПЦР оценили на панели образцов ДНК 59 штаммов ортопоксвирусов, включая архивный клинический материал (корочки кожных поражений), полученный от людей, болевших в 1970–1975 гг. натуральной оспой или оспой обезьян (коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Специфичность составила 100 %.

Результаты выполненной работы представляют значительный практический интерес. Данный подход лег в основу набора реагентов «ВЕКТОР-МПЦР-ОСПА» на которое получено регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09002 и разрешение к производству, продаже и применению на территории Российской Федерации.

На основе ПЦР в реальном времени в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» также разработан метод мультиплексной TaqMan ПЦР в реальном времени (MuRT-PCR) для специфического выявления и дифференциации в одной реакции ДНК патогенных для человека ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ [44]. Для проведения MuRT-PCR-анализа ортопоксвирусов ДНК использовали одновременно четыре пары видоспецифичных олигонуклеотидных

праймеров и четыре гибрида олигонуклеотидные пробы с различными флуоресцентными красителями и соответствующими тушителями флуоресценции. Специфичность и чувствительность разработанного метода оценена при анализе ДНК 29 штаммов ортопоксвирусов, включая архивный клинический материал, полученный от людей, больных оспой, а также при анализе ДНК экспериментального материала, выделенной от мышей, зараженных ВОК и сурков, зараженных ВОО. Специфичность составила 100 %. Данная процедура позволяет с большей чувствительностью и в более короткое время по сравнению с ранее разработанным методом МПЦР осуществлять видоспецифичную генодиагностику ортопоксвирусов, патогенных для человека.

Таким образом, существование связанных с грызунами природных очагов таких патогенных для человека ортопоксвирусов, как ВОО и ВОК в пределах экваториального, тропического, субтропического, умеренного климатических поясов [43]; многочисленные сообщения о случаях поражения человека данными вирусами в последнее время; отсутствие у населения поствакцинального иммунитета и в связи с этим возрастающая угроза биотерроризма – все это создает риск обострения эпидемической ситуации по ортопоксвирусным инфекциям с возможными катастрофическими последствиями. В связи с этим разработка быстрых высокочувствительных методов видоспецифичной диагностики ортопоксвирусов становится все более актуальной.

Развитие молекулярно-диагностических методов открывает новые возможности в лабораторной диагностике ортопоксвирусных инфекций. Рассмотренные в данном обзоре современные генетические методы обладают рядом преимуществ, в частности, высокой специфичностью и чувствительностью. Возможность проводить анализ в формате мультиплекс обеспечивает быстрое получение результата и возможность работы с большим количеством образцов. Однако крайне высокая чувствительность может привести к ложноположительным результатам, а положительный результат, играет важную роль в случае принятия экстренных мер. В связи с этим на современном этапе развития лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций человека очевидна необходимость комплексного подхода, который заключается в использовании различных лабораторных методов, как классических (выделение вируса на ХАО, ИФА, ЭМ), так и современных (методы на основе ПЦР, секвенирование). Это значительно повысит надежность получаемых результатов по видовой идентификации ортопоксвирусов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения № 8152, № 8536 и № 8802.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилова Е.В., Бабкин И.В., Щелкунов С.Н. Мультиплексный ПЦР-анализ для видоспецифичной экспресс-идентификации ортопоксвирусов. *Мол. генет. микробиол. и ви-*



русол. 2003; 1:45–52.

2. Методические рекомендации. Натуральная оспа (клиника, лечение, иммунопрофилактика). М.: ФМБА; 2006. 60 с.

3. Abrahao J.S., Guedes M.I.M., Trindade G.S., Fonseca F.G., Campos R.K., Mota B.F., Lobato Z.I., Silva-Fernandes A.T., Rodrigues G.O., Lima L.S., Ferreira P.C., Bonjardim C.A., Kroon E.G. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*. 2009; 4:e7428.

4. Aitichou M., Saleh S., Kyusung P., Huggins J., O'Guinn M., Jahrling P., Ibrahim S. Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *J. Virol. Methods*. 2008; 153(2):190–5.

5. Bonnekoh B., Falk K., Reckling K., Kenkies S., Nitsche A., Ghebremedhin B., Pokrywka A., Franke L., Thriene B., König W., Pauli G., Gollnick H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J. Dtsch Dermatol. Ges.* 2008; 6:210–3.

6. Bray M., Buller M. Looking back at smallpox. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:882–9.

7. Breman J.G. Monkeypox: an emerging infection for humans? In: Scheld W.M., Craig W.A., Hughes J.M., editors. *Emerging infections 4*. Washington: ASM Press; 2000. P. 45–67.

8. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:777–80.

9. Carletti F., Bordini L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:499–500.

10. CDC. Update: multistate outbreak of monkeypox in Illinois, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 2003; 52:642–6.

11. Damon I.K., Roth C.E., Chowdhary V. Discovery of monkeypox in Sudan. *N. J. Engl. Med.* 2006; 355(9):962–3.

12. Elsendoorn A., Agius G., Le Moal G., Aajaji F., Favier A.L., Wierzbicka-Hainault E., Béraud G., Flusin O., Crance J.M., Roblot F. Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat. *J. Infect.* 2011; 63(5):391–3.

13. Espy M.J., Cockerill F.R., Meyer R.F., Bowen M.D., Poland G.A., Hadfield T.L., Smith T.F. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6):1985–8.

14. Fedele C.G., Negro A., Molero F., Sanchez-Seco M.P., Tenorio A. Use of Internally Controlled Real-Time Genome Amplification for Detection of Variola Virus and Other Orthopoxviruses Infecting Humans. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(12):4464–70.

15. Fitzgibbon J.E., Sagripanti J.L. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2):160–7.

16. Gallwitz S., Schutzbank T., Heberling R.L., Katler S.S., Galpin J.E. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4068–70.

17. Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of Real-Time PCR Assay for Detection of Cowpox Virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40.

18. Gurav Y.K., Raut C.G., Yadav P.D., Tandale B.V., Sivaram A., Pore M.D., Basu A., Mourya D.T., Mishra A.C. Buffalopox outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.* 2011; 100(3–4):242–7.

19. Honlinger B., Huemer H.P., Romani N., Czerny C.P., Eisendel K., Hopel R. Generalized cowpox infection probably transmitted from a rat. *Br. J. Dermatol.* 2005; 153:451–3.

20. Human monkeypox in Kasai Oriental, Zaire (1996–1997). *Wkly Epidemiol. Rec.* 1997; 72(15):101–4.

21. Ibrahim M.S., Kulesh D.A., Saleh S.S., Damon I.K., Esposito J.J., Schmaljohn A.L., Jahrling P.B. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(8):3835–39.

22. Kinnunen P.M., Henttonen H., Hoffmann B., Kallio E.R., Korthase C., Laakkonen J., Niemimaa J., Palva A., Schlegel M., Ali H.S., Suominen P., Ulrich R.G., Vaheri A., Vapalahti O. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8):1133–40.

23. Kroon E.G., Mota B.E., Abrahão J.S., Fonseca F.G., Trindade G.D. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* 2011; 92(2):150–63.

24. Kulesh D.A., Baker R.O., Loveless B.M., Norwood D., Zwiers S.H., Mucker E., Hartmann C., Herrera R., Miller D., Christensen D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Jahrling P.B. Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler platforms. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(2):601–9.

25. Kulesh D.A., Loveless B.M., Norwood D., Garrison J., Whitehouse C.A., Hartmann C., Mucker E., Miller D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Huhn G., Miser L.L., Imig C., Martinez M., Larsen T., Rossi C.A., Ludwig G.V. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the

Roche LightCycler. *Lab. Invest.* 2004; 84(9):1200–8.

26. Learned L.A., Reynolds M.G., Wassa D.W., Li Y., Olson V.A., Karem K., Stempora L.L., Braden Z.H., Kline R., Likos A., Libama F., Moudzeo H., Bolanda J.D., Tarangonia P., Boumandoki P., Formenty P., Harvey J.M., Damon I.K. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(2):428–34.

27. Mukinda V.B.K., Mwema G., Kilundu M., Heymann D.L., Khan A.S., Esposito J.J. Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. Monkeypox Epidemiologic Working Group. *Lancet.* 1997; 349:1449–50.

28. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:781–4.

29. Nitsche A., Kurth A., Pauli G. Viremia in human Cowpox virus infection. *J. Clin. Virol.* 2007; 40:160–2.

30. Nitsche A., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1207–13.

31. Nitsche A., Steger B., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J. Virol. Methods*. 2005; 126:187–95.

32. Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5):1940–46.

33. Panning M., Asper M., Kramme S., Schmitz H., Drosten C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopoxviruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem.* 2004; 50(4):702–8.

34. Putkuri N., Piiparinen H., Vaheri A., Vapalahti O. Detection of human orthopoxviruses infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *J. Med. Virol.* 2009; 81:146–52.

35. Reynolds M.G., Carroll D.S., Olson V.A., Hughes C., Galley J., Likos A., Montgomery J.M., Suu-Ire R., Kwasi M.O., Jeffrey Root J., Braden Z., Abel J., Clemmons C., Regnery R., Karem K., Damon I.K. A Silent Zoonotic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(4):746–54.

36. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107:16262–7.

37. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Sinyakov A.N. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol.* 2006; 78(10):1325–40.

38. Saijo M., Ami Y., Suzuki Yuriko., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Iizuka I., Sakai K., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of congo basin and west African MPXV strains. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61:140–2.

39. Scaramozzino N., Ferrier-Rembert A., Favier A., Rothlisberger C., Richard S., Crance J., Meyer H., Garin D. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopoxviruses. *Clin. Chem.* 2007; 53(4):606–13.

40. Schmidt M., Roth K.W., Meyer H., Seifried E., Hourfar M.K. Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion*. 2005; 45:399–403.

41. Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154:1865–71.

42. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes*. 2005; 19:1–8.

43. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer; 2005. 425 p.

44. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2011; 175(2):163–9.

45. Trindade G.H., Li Y., Olson V.A., Emerson G., Regnery R.L., Fonseca F.G., Kroon E.G., Damon I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods*. 2008; 152:63–71.

46. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierrotsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21:153–6.

47. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13:902–4.

## References

- Gavrilova E.V., Babkin I.V., Shchelkunov S.N. [Multiplex-PCR assay for species-specific express identification of orthopoxviruses]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 1:45–52.
- [Smallpox virus (clinical picture, treatment and immune-prophylaxis)]. *Methodological Recommendations (MR)*. M.: FMBA; 2006. 60 p.
- Abraham J.S., Guedes M.I.M., Trindade G.S., Fonseca F.G., Campos R.K., Mota B.F., Lobato Z.I., Silva-Fernandes A.T., Rodrigues G.O., Lima L.S., Ferreira P.C., Bonjardim C.A., Kroon E.G. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE*. 2009; 4:e7428.
- Aitichou M., Saleh S., Kyusung P., Huggins J., O'Guinn M., Jahrling P., Ibrahim S. Dual-probe real-time PCR assay for detection of variola or other orthopoxviruses with dried reagents. *J. Virol. Methods*. 2008; 153(2):190–5.
- Bonnekoh B., Falk K., Reckling K., Kenkies S., Nitsche A., Ghebremedhin B., Pokrywka A., Franke I., Thriene B., König W., Pauli G., Gollnick H. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *J. Dtsch Dermatol. Ges.* 2008; 6:210–3.
- Bray M., Buller M. Looking back at smallpox. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:882–9.
- Breman J.G. Monkeypox: an emerging infection for humans? In: Scheld W.M., Craig W.A., Hughes J.M., editors. *Emerging infections 4*. Washington: ASM Press; 2000. P. 45–67.
- Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:777–80.
- Carletti F., Bordini L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:499–500.
- CDC. Update: multistate outbreak of monkeypox in Illinois, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 2003; 52:642–6.
- Damon I.K., Roth C.E., Chowdhary V. Discovery of monkeypox in Sudan. *N. J. Engl. Med.* 2006; 355(9):962–3.
- Elsendoorn A., Agius G., Le Moal G., Aajaji F., Favier A.L., Wierzbicka-Hainault E., Béraud G., Flusin O., Crance J.M., Roblot F. Severe ear chondritis due to cowpox virus transmitted by a pet rat. *J. Infect.* 2011; 63(5):391–3.
- Espy M.J., Cockerill F.R., Meyer R.F., Bowen M.D., Poland G.A., Hadfield T.L., Smith T.F. Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6):1985–8.
- Fedele C.G., Negro A., Molero F., Sanchez-Seco M.P., Tenorio A. Use of Internally Controlled Real-Time Genome Amplification for Detection of Variola Virus and Other Orthopoxviruses Infecting Humans. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(12):4464–70.
- Fitzgibbon J.E., Sagripanti J.L. Simultaneous identification of orthopoxviruses and alphaviruses by oligonucleotide macroarray with special emphasis on detection of variola and Venezuelan equine encephalitis viruses. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2):160–7.
- Gallwitz S., Schutzbank T., Heberling R.L., Katler S.S., Galpin J.E. Smallpox: residual antibody after vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:4068–70.
- Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of Real-Time PCR Assay for Detection of Cowpox Virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1):37–40.
- Gurav Y.K., Raut C.G., Yadav P.D., Tandale B.V., Sivaram A., Pore M.D., Basu A., Mourya D.T., Mishra A.C. Buffalo outbreak in humans and animals in Western Maharashtra, India. *Prev. Vet. Med.* 2011; 100(3–4):242–7.
- Honlinger B., Huemer H.P., Romani N., Czerny C.P., Eisele K., Hopel R. Generalized cowpox infection probably transmitted from a rat. *Br. J. Dermatol.* 2005; 153:451–3.
- Human monkeypox in Kasai Oriental, Zaire (1996–1997). *Wkly Epidemiol. Rec.* 1997; 72(15):101–4.
- Ibrahim M.S., Kulesh D.A., Saleh S.S., Damon I.K., Esposito J.J., Schmaljohn A.L., Jahrling P.B. Real-time PCR assay to detect smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(8):3835–39.
- Kinnunen P.M., Henttonen H., Hoffmann B., Kallio E.R., Korthase C., Laakkonen J., Niemimaa J., Palva A., Schlegel M., Ali H.S., Suominen P., Ulrich R.G., Vaheri A., Vapalahti O. Orthopox virus infections in Eurasian wild rodents. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8):1133–40.
- Kroon E.G., Mota B.E., Abraham J.S., Fonseca F.G., Trindade G.D. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Res.* 2011; 92(2):150–63.
- Kulesh D.A., Baker R.O., Loveless B.M., Norwood D., Zwiers S.H., Mucker E., Hartmann C., Herrera R., Miller D., Christensen D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Jahrling P.B. Smallpox and pan-orthopox virus detection by real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler platforms. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(2):601–9.
- Kulesh D.A., Loveless B.M., Norwood D., Garrison J., Whitehouse C.A., Hartmann C., Mucker E., Miller D., Wasieleski L.P.Jr., Huggins J., Huhn G., Miser L.L., Imig C., Martinez M., Larsen T., Rossi C.A., Ludwig G.V. Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab. Invest.* 2004; 84(9):1200–8.
- Learned L.A., Reynolds M.G., Wass D.W., Li Y., Olson V.A., Karem K., Stempora L.L., Braden Z.H., Kline R., Likos A., Libama F., Moudzeo H., Bolanda J.D., Tarangona P., Boumandoki P., Formenty P., Harvey J.M., Damon I.K. Extended interhuman transmission of monkeypox in a hospital community in the republic of the Congo, 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(2):428–34.
- Mukinda V.B.K., Mwema G., Kilundu M., Heymann D.L., Khan A.S., Esposito J.J. Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. Monkeypox Epidemiologic Working Group. *Lancet.* 1997; 349:1449–50.
- Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15:781–4.
- Nitsche A., Kurth A., Pauli G. Viremia in human Cowpox virus infection. *J. Clin. Virol.* 2007; 40:160–2.
- Nitsche A., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1207–13.
- Nitsche A., Steger B., Ellerbrok H., Pauli G. Detection of vaccinia virus DNA on the LightCycler by fluorescence melting curve analysis. *J. Virol. Methods*. 2005; 126:187–95.
- Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H. Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(5):1940–46.
- Panning M., Asper M., Kramme S., Schmitz H., Drosten C. Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem.* 2004; 50(4):702–8.
- Putkuri N., Piiparinen H., Vaheri A., Vapalahti O. Detection of human orthopoxviruses infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR. *J. Med. Virol.* 2009; 81:146–52.
- Reynolds M.G., Carroll D.S., Olson V.A., Hughes C., Galley J., Likos A., Montgomery J.M., Suu-Ire R., Kwai M.O., Jeffrey Root J., Braden Z., Abel J., Clemmons C., Regnery R., Karem K., Damon I.K. A Silent Zoonotic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(4):746–54.
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107:16262–7.
- Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Shnyakov A.N. Microarray assay for detection and discrimination of Orthopoxvirus species. *J. Med. Virol.* 2006; 78(10):1325–40.
- Saijo M., Ami Y., Suzuki Yuriko., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Iizuka I., Sakai K., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. Diagnosis and assessment of monkeypox virus (MPXV) infection by quantitative PCR assay: differentiation of congo basin and west African MPXV strains. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61:140–2.
- Scaramozzino N., Ferrier-Rembert A., Favier A., Rothlisberger C., Richard S., Crance J., Meyer H., Garin D. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses. *Clin. Chem.* 2007; 53(4):606–13.
- Schmidt M., Roth K.W., Meyer H., Seifried E., Hourfar M.K. Nucleic acid test screening of blood donors for orthopoxviruses can potentially prevent dispersion of viral agents in case of bioterrorism. *Transfusion.* 2005; 45:399–403.
- Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154:1865–71.
- Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. Multiplex PCR detection and species differentiation of orthopoxviruses pathogenic to humans. *Mol. Cell. Probes.* 2005; 19:1–8.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. New York: Springer; 2005. 425 p.
- Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2):163–9.
- Trindade G.H., Li Y., Olson V.A., Emerson G., Regnery R.L., Fonseca F.G., Kroon E.G., Damon I. Real-time PCR assay to identify variants of Vaccinia virus: implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. *J. Virol. Methods.* 2008; 152:63–71.
- Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierroutsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21:153–6.
- Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalo poxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13:902–4.

## Authors:

Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

## Об авторах:

Гаврилова Е.В., Максютлов Р.А., Шелкунов С.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Колыцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 11.09.13.



Е.В.Найденова, В.Е.Куклев, Ю.И.Яшечкин, С.А.Щербакова, В.В.Кутырев

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ (ОБЗОР)

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

В работе приведены современные данные о распространении, строении и классификации вирусов Денге и лабораторной диагностике вызываемых ими заболеваний с использованием классических и современных вирусологических методов, рассматривается возможность применения различных лабораторных тестов в разные сроки от начала заболевания. Участвовавшие в настоящее время случаи завоза данного инфекционного заболевания на территорию Российской Федерации показывают необходимость разработки тест-систем отечественного производства, а также внедрения в практику противочумных институтов технологий выделения вирусов на биологической модели или культуре клеток.

**Ключевые слова:** вирусы Денге, лихорадка денге, лабораторная диагностика.

E.V.Naydenova, V.E.Kuklev, Yu.I.Yashechkin, S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

## Current State of Dengue Fever Laboratory Diagnostics (Scientific Review)

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

The paper contains the data on the distribution, morphology and classification of Dengue viruses as well as laboratory diagnostics of the diseases caused by them using conventional and modern virology methods. Discussed is the possibility of application of various laboratory techniques at different stages from the onset of the disease. In addition, up to date cases of Dengue fever importation into the territory of the Russian Federation are becoming more frequent which testifies to the need of the development of domestically produced test-system, as well as introduction of modern technologies of virus isolation on the biological model or cell culture into the practice of plague control institutions.

**Key words:** Dengue viruses, Dengue fever, laboratory diagnostics.

Заболевание, вызванное вирусами Денге, носит эпидемический характер с вовлечением сотен тысяч человек и широко распространено в Юго-Восточной Азии, на островах Тихого океана, в странах Карибского бассейна, в Южной и Центральной Америке, в Африке [4, 5, 41, 46]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевание отмечено более чем в 100 странах. Ежегодно в мире переболевает около 50 млн человек. Под угрозой заражения находятся около 2,5 млрд жителей планеты. За последние десятилетия в мире произошло значительное увеличение случаев заболевания лихорадкой денге во многих, эндемичных по этой инфекции, регионах [3, 24, 45].

Целью настоящей работы был обзор имеющихся сведений о методах лабораторной диагностики лихорадки денге и эффективности их использования в зависимости от сроков заболевания.

Лихорадка денге – острая природно-очаговая арбовирусная инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [4, 8]. В результате исследований [4, 5, 45, 46] было показано, что заболевание вызывают 4 различающихся по антигенным и генетическим свойствам вируса. Возбудители лихорадки денге – вирусы Денге I–IV типов относятся к семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, к антигенному комплексу вирусов Денге [4, 8, 45, 46]. Вирусы Денге содержат односпираль-

ную, позитивную, линейную РНК и покрыты двухслойной липидной мембраной, состоящей из фосфолипидов и холестерина. Размеры сферического вириона колеблются в пределах 40–50 нм в диаметре. В состав вириона входят 3 структурных протеина: капсидный протеин С, мажорный оболочечный протеин Е, либо ргМ (у незрелых вирионов), либо М (у зрелых вирионов). В инфицированных клетках синтезируется 7 неструктурных протеинов: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 [29, 46, 48, 49].

В соответствии с Санитарными правилами 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», действующими в настоящее время на территории Российской Федерации, вирусы Денге отнесены ко II группе патогенности. Лихорадка денге является нозологической формой, входящей в список инфекционных (паразитарных) болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации (Приложение 1 к СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территорий Российской Федерации»), и входит в перечень нозологий, ассоциированных с чрезвычайными ситуациями в области общественного здравоохранения, имеющими международное значение (Приложение 2 Международных медико-санитарных правил (2005 г.)). Согласно Международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10) лихорадке



денге (классической) и геморрагической лихорадке, вызванной вирусами Денге (ГЛД), присвоены коды А-90 и А-91 соответственно.

Основным переносчиком возбудителя является синантропный комар *Stegomyia aegypti*. Также эпидемиологическое значение в качестве переносчика имеет и другой вид комаров – *Stegomyia albopictus*. На территории Российской Федерации в районе Большого Сочи (Краснодарский край) были обнаружены местные популяции комаров *St. aegypti* и *St. albopictus* – основных переносчиков вирусов Денге [1, 2, 9]. И после 40-летнего отсутствия популяции комаров *St. aegypti* восстановились на территории Черноморского побережья Кавказа [10]. Эти данные не исключают возможность возникновения вспышки лихорадки денге в этом регионе [1]. Похожая ситуация складывалась в 1927–1928 гг. в Греции, где была зафиксирована крупная вспышка лихорадки денге, в результате которой погибло более 1000 чел. [32]. Также в 2010 г. местная передача вирусов Денге была впервые зарегистрирована во Франции и Хорватии, а завезенные случаи заболевания выявлены в других европейских странах [19, 28, 36, 38].

В последние годы эта экзотическая инфекционная болезнь приобретает актуальность и для Российской Федерации. По данным В.Ф.Ларичева [3], за период 2002–2011 гг. было верифицировано 46 случаев лихорадки денге, завезенных в Россию из тропических и субтропических стран. Случаи лихорадки денге были связаны с посещением Индонезии (22), Таиланда (11), Вьетнама (3), Индии (3), Венесуэлы (2), Сингапура (1), Шри-Ланки (1), Малайзии (1), Коста-Рики (1) и Доминиканской Республики (1). Распределение 46 диагностированных случаев лихорадки денге по годам было следующим: в 2002 г. – 3, 2006 г. – 1, 2007 г. – 2, 2008 г. – 3, 2009 г. – 8, в 2010 г. – 17, 2011 г. – 12 (по сведениям за 6 первых месяцев).

Лихорадку денге дифференцируют от малярии, лихорадки чикунгунья, москитных лихорадок, желтой лихорадки, других геморрагических лихорадок, инфекционно-токсического шока при бактериальных заболеваниях (сепсис, менингококцемия и др.) [45].

Лабораторная диагностика лихорадки денге, как и других вирусных инфекций, основана на выявлении вируса или его частиц, а также исследовании динамики титра антител, и проводится с использованием вирусологических, серологических и молекулярно-генетических методов [4, 5, 7, 45, 46].

Основным вирусологическим методом является изоляция вируса из клинического материала и его идентификация [4, 5, 7, 45, 46, 49, 50]. Для выделения вирусов Денге используют кровь, сыворотку крови или плазму, обогащенную эритроцитами, так как вирус хорошо сохраняется и размножается в лейкоцитах, в случае летального исхода – пробы внутренних органов. При лихорадочной форме заболевания вероятность выделения вирусов выше, чем при геморрагической [4, 5].

Оптимальным методом выделения вирусов Денге является заражение «комариных» клеточных культур. Наиболее часто с этой целью используется клон C6/36 (*St. albopictus*), полученный из клеток личинок комаров *St. albopictus* [5, 12, 25, 27, 35, 40, 41, 44, 45, 46]. Так, в 2011 г. на клеточной культуре C6/36 в Бразилии выделили вирус Денге IV типа, циркуляция которого ранее на этой территории не отмечалась [41]. По данным некоторых авторов, хорошей чувствительностью для изоляции вирусов Денге обладают культура клеток *Vero*, выделенная из почек обезьян и *BHK-21* – культуры из почек хомячков [40, 41, 44, 46, 49]. Размножение вируса происходит в цитоплазме клеток относительно медленно, развитие цитопатического эффекта наблюдается не всегда. Наличие вируса в культурах клеток учитывают на 4–5-й день после заражения и подтверждают с помощью электронной микроскопии, иммуофлюоресцентного анализа, иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4, 5, 7, 45, 46].

В качестве биологической модели чаще всего используют новорожденных белых мышей, но этот метод менее эффективен и требует длительного периода адаптации вируса [4, 5, 7, 45, 46, 50]. Для выделения вируса заражают не человекообразных обезьян, в основном макак-резусов (*Macaca mulatta*). Но использование обезьян в качестве биологической модели не позволяет изучать патогенез инфекции, так как у животных при повторном заражении признаки ГЛД не наблюдаются [50].

Молекулярное типирование полученных вирусных изолятов проводят с использованием ПЦР и секвенирования [11, 14, 22, 38, 42]. Это является важной задачей для прогнозирования эпидемий и изучения географической миграции вирусных штаммов. При генотипировании вируса Денге-I может быть использован любой из 9 генов (за исключением NS4A), для вируса Денге-II удобными мишенями могут быть фрагменты генома PrM/M, E, NS1, NS3, NS4A и NS5, для вирусов Денге, относящихся к III типу, исследуют все 10 генов, а для вируса Денге IV типа подходящими объектами могут являться C, PrM/M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS4A и NS5 [24].

Иммуносерологическая диагностика используется для определения и антигенов, и антител. На ранних стадиях заболевания выявляют вирусный антиген NS1, присутствие которого в сыворотке крови больного указывает на размножение вируса Денге в организме, и ранние антитела – IgM, которые появляются в первые несколько дней от начала болезни. К 10–14-му дню от начала заболевания в крови синтезируются антитела класса G [4, 5, 7, 12, 13, 17, 38, 40, 41]. Успех серологической диагностики вирусных инфекций зависит от специфичности реакции и соблюдения временных условий взятия крови. Для обнаружения иммуноглобулинов класса M кровь берут однократно. В большинстве случаев для выявления IgG исследуют парные сыворотки крови, взятые с

интервалом в 2–3 недели. Положительным результатом считается 4-кратное нарастание титра антител [4, 5, 7, 8]. Во время повторной инфекции, вызванной вирусом Денге другого типа, титры антител нарастают быстрее, в основном, за счет иммуноглобулинов класса G и сохраняются в течение всей жизни, титры IgM в данном случае значительно ниже, нежели при первой встрече с возбудителем. Для определения первичного и повторного случаев инфицирования вирусами Денге определяют соотношение между IgM и IgG.

При серологической диагностике заболеваний, вызванных вирусами Денге, применяют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), реакцию связывания комплемента (РСК), реакцию нейтрализации (РН) [4, 5, 7], но в последнее время наибольшую популярность приобрел ИФА для выявления антигенов и антител класса M и G [4, 5, 12, 13, 15, 17, 45, 46]. При изучении чувствительности и специфичности различных иммуносерологических тестов было показано, что препараты для выявления вирусного антигена лучше всего использовать до 4-го дня от начала болезни, потом в крови начинают появляться первые антитела и чувствительность данных методов резко снижается.

В качестве методов экспресс-диагностики хорошо себя зарекомендовали тесты для иммунохроматографии, позволяющие выявить вирусные антигены и антитела разного класса к вирусам Денге в первые сутки от начала заболевания. Чувствительность тестов составила, по данным авторов, 81,5 и 82,4 % (после 15 и 30 мин инкубации соответственно), специфичность результатов была 100 % [17]. В России зарегистрированы и разрешены к использованию одностадийный твердофазный иммунохроматографический тест для качественного определения антигена NS1 вируса Денге в сыворотке, плазме и цельной крови человека «SD BIOLINE Dengue NS1 Ag» и одностадийный твердофазный иммунохроматографический тест для качественного и раздельного определения IgG и/или IgM антител к вирусу Денге в сыворотке, плазме и цельной крови человека «SD BIOLINE Dengue IgG/IgM», производства фирмы «Standard diagnostics» (Корея).

К применению в практике разрешены иммуноферментный тест для определения антител класса IgM к антигенам вируса Денге в сыворотке или плазме крови человека «Anti-Dengue virus ELISA (IgM)» и иммуноферментный тест для определения антител класса IgG к антигенам вируса Денге в сыворотке или плазме крови человека «Anti-Dengue virus ELISA (IgG)», «Euroimmun» (Германия).

В России в настоящее время зарегистрированные препараты для проведения ИФА отечественного производства отсутствуют. Экспериментальные наборы для выявления IgM и IgG ко всем типам вирусов Денге разработаны в ГБУН НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского (Москва), которые представляют собой поливалентные тест-системы, включающие

анти поли денге пероксидазный конъюгат, приготовленный из иммуноглобулина, полученного из иммунных асцитных жидкостей мышей, иммунизированных 4 типами вирусов Денге, и смесь антигенов 4 типов вирусов Денге [3].

Использование молекулярно-генетических методов диагностики (ПЦР, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay), LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay)) вирусных инфекций позволяет выявить РНК вируса в первые дни от начала заболевания [4, 29, 41, 42, 45, 46]. Так как вирусы Денге содержат РНК, то в начале работы проводят реакцию обратной транскрипции. Эффективность методов генной диагностики во многом зависит от выбора оптимальных объектов для исследования и правильного забора материала. Согласно рекомендациям ВОЗ при исследовании клинического материала от больных с подозрением на лихорадку денге генодиагностическими методами оптимальными сроками забора материала являются первые дни болезни (до 5–7-го дня), когда вирус циркулирует в крови. В этот период можно обнаружить его антигены и РНК [45, 46].

Зарубежными авторами опубликовано большое количество работ, посвященных разработке и созданию ПЦР-тест-систем для выявления РНК вирусов Денге. Одним из первых, кто опубликовал данные о применении ОТ-ПЦР в лабораторной диагностике лихорадки денге, был Lanciotti и соавт. в 1992 г. В результате этой работы была создана двухраундная ОТ-ПЦР-тест-система для выявления РНК вирусов Денге всех четырех типов с учетом результатов методом электрофореза в агарозном геле [29]. В последующем были созданы как универсальные тест-системы для выявления РНК вирусов Денге, так и тест-системы для дифференциации их по типам [18, 23, 25, 35, 42, 45, 46]. Например, с помощью двухраундной ОТ-ПЦР был выявлен завозной случай лихорадки денге из Таиланда в США, а в последующем проведена идентификация и сиквенс выделенного штамма вируса Денге I типа [36]. Имеются данные о создании мультиплексной ОТ-ПЦР для выявления и идентификации всех четырех типов вирусов Денге и вируса Чикунгунья [16, 35, 38]. В последние годы для детекции и дифференциации вирусов Денге по типам используют ПЦР в режиме реального времени [20, 26, 33, 48].

В РосНИПЧИ «Микроб» был разработан и внедрен в практику здравоохранения «Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген Денге-РЭФ)», предназначенный для выявления и дифференциации по типам вирусов Денге в клиническом и биологическом материале [6]. Помимо этого, в России зарегистрирован и широко применяется «Набор реагентов для выявления и дифференциации РНК вируса денге (Dengue virus, DV) I–IV типов в биологическом материале методом полиме-

разной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс Dengue virus type-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва). Работа в данном направлении ведется в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.).

Метод NASBA является перспективным для ранней диагностики вирусных инфекционных болезней, включая и лихорадку денге [45, 47]. Достоинством данного метода является непосредственная амплификация РНК, что позволяет с высокой чувствительностью детектировать РНК-содержащие вирусы. В работе S.-J.L.Wu и соавт. [47] представлены результаты изучения специфичности и чувствительности NASBA для выявления РНК вирусов Денге и дифференциации их по типам. Для исследования использовали универсальные праймеры, для дифференциации вирусов Денге-специфичные зонды. Была показана 100 % специфичность метода, чувствительность составила 98,5 % по сравнению с выделением вируса на культуре клеток.

В диагностике флавивирусных инфекций, в том числе и лихорадки денге, также нашел применение метод RT-LAMP, основанный на изотермической амплификации генов-мишеней с использованием ДНК-полимеразы и набора из 4 олигонуклеотидных праймеров, что обуславливает высокую специфичность данной реакции. Этот метод хорошо себя зарекомендовал для выявления вирусов Денге и дифференциации их по типам на ранних сроках заболевания, была показана его высокая чувствительность и специфичность, сопоставимая с таковой для ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов [39]. Данный методический подход успешно апробирован в комбинированном исследовании вирусов Денге (I–IV типов), японского энцефалита и Западного Нила [31].

Таким образом, в данной работе показано, что в настоящее время лабораторная диагностика лихорадки денге осуществляется, в большинстве случаев, вирусологическими методами или с использованием диагностикумов зарубежных производителей. Однако участвовавшие случаи завоза данного инфекционного заболевания на территорию Российской Федерации диктуют необходимость разработки тест-систем отечественного производства, а также внедрения в практику противочумных институтов технологий выделения вирусов на биологической модели или культуре клеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L. и *Aedes albopictus* Skuse – новая биологическая угроза для юга России. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 3: 49–55.
2. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse на территории Российской Федерации. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 1:3–4.
3. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2012; 1:35–9.
4. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология: Руководство. М.: МИА; 2008. 655 с.

5. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М: Медицина; 1989. 336 с.
6. Найденова Е.В., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А. Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. *Национальные приоритеты России*, Спец. выпуск. 2011; 2(5):153.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство. М.:ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.
8. Покровский В.И., редактор. Инфекционные болезни: Руководство для врачей. М.: «Медицина»; 1996. 528 с.
9. Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я., Ганушкина Л.А., Орабей В.Г., Сергиев В.П. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. в г. Сочи. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2005; 3:3–5.
10. Юничева Ю.В., Рябова Т.Е., Маркович Н.Я., Безжонова О.В., Ганушкина Л.А., Семенов В.Б. Первые данные о наличии размножающейся популяции комаров *Aedes aegypti* в районе Большого Сочи и в отдельных городах Абхазии. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2008;3:40–43.
11. Alfonso H.L., Amarilla A.A., Gonçalves P., Barros M.T., de Almeida F., Silva T.R., Nunes M.T., Vasconcelos P.F.C., Vieira D.S., Batista W.C., Bobadilla M.L., Vazquez C., Moran M., Figueiredo L.T.M., Aquino V.H. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virology*. 2012; 9:124.
12. Avilés G., Paz M.V., Rangeon G., Ranaivoarisoa M.Y., Verzeri N., Roginski S. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:738–42.
13. Blacksell S.D., Jarman R.G., Gibbons R.V., Tanganuchitcharnchai A., Mammen M.P. Jr., Nisalak A., Kalayanarooj S., Bailey M.S., Premaratna R., de Silva H., Day N.P.J., Laloo D.G. Comparison of seven commercial antigen and antibody detection ELISAs for acute dengue infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):804–10.
14. Bona A.C.D., Twerdochlib A.L., Navarro-Silva M.A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45(3):297–300.
15. Cordeiro M., Braga-Neto U., Nogueira R.M., Ernesto T.A., Marques Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute Dengue infection based on IgG ELISA. *Virology*. 2008; 2(8):280.
16. Dash P.K., Parida M., Santhosh S.R., Saxena P., Srivastava A., Neeraja M., Neeraja M., Lakshmi V., Rao L. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1):52–7.
17. Dussart P., Petit L., Labeau B., Bremond L., Leduc A., Moua D., Mathews S., Baril L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(8):e280.
18. Gittens-St Hilaire M., Clarke-Greenidge N. An analysis of the subtypes of dengue fever infections in Barbados 2003–2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Virology*. 2008; 5:152.
19. Gjenero-Margan I., Aleraj B., Krajcar D., Lesnikar V., Klobucar A., Kurecic-Filipovic S., Komparak S., Martić R., Duričić S., Betica-Radić L., Okmadžić J., Vilibić-Cavlek T., Babić-Erceg A., Turković B., Avsić-Županc T., Radić I., Ljubić M., Sarac K., Benić N., Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16. pii 19805.
20. Gurukumar K.R., Priyadarshini D., Patil J.A., Bhagat A., Singh A., Shah P.S., Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virology*. 2009; 6:10.
21. Hang V.T., Nguyen N.M., Trung D., Tricou V., Yoksan S., Dung N.M., Van Ngoc T., Hien T.T., Farrar J., Wills B., Simmons C. Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(1): e360.
22. Huhtamo E., Uzcátegui N.Y., Siikamäki H. Molecular epidemiology of dengue virus strains from Finnish travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008;14(1):80–3.
23. Ito M., Takasaki T., Yamada K., Nerome R., Tajima S., Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5935–7.
24. Klungthong C., Putnak R., Mammen M.P., Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods.* 2008; 154:175–81.
25. Klungthong G., Gibbons R.V., Thaisomboonsuk B., Nisalak A., Kalayanarooj S., Thirawuth V. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 8:2480–5.
26. Kong Y.Y., Thay C.H., Tin T.C., Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006; 138:123–30.



27. Kuno G., Gubler D.J., Vélez M., Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull. World Health Organ.* 1985; 63(2):279–86.
28. La Ruche G., Souares Y., Armengaud A., Peloux-Petiot F., Delaunay P., Despres P., Lenglet A., Jourdain F., Leparc-Goffart I., Charlet F., Ollier L., Mantey K., Mollet T., Fournier J.P., Torrents R., Leitmeier K., Hilairet P., Zeller H., Van Bortel W., Dejour-Salamanca D., Grandadam M., Gastellu-Etcheberry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15. pii19676.
29. Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J., Vorndam A.V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(3):545–51.
30. Levi J.E., Tateno A.F., Machado A.F., Ramalho D.C., de Souza V.A., Guilarte A.O., de Rezende Feres V.C., Martelli C.M., Turchi M.D., Siqueira J.B. Jr., Pannuti C.S. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of Dengue Virus in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil, in 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 6:1893–97.
31. Li S., Fang M., Zhou B., Ni H., Shen O., Zhang H., Han Y., Yin J., Chang W., Xu G., Cao G. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virol. J.* 2011; 8:360.
32. Louis C. Daily Newspaper View of Dengue Fever Epidemic, Athens, Greece, 1927–1931. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 1:78–82.
33. Menting S., Khoa T.D., Tran T.T., Hoang L.P., Klatser P., Wolthers K.C., Binh T.Q., de Vries P.J., Beld M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* 2011; 2011:514681. doi: 10.1155/2011/514681.
34. Messer W.B., Gubler D.J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):800–9.
35. Mishra B., Sharma M., Pujhari S.K., Ratho R.K., Gopal S., Kumar N., Sarangi G., Chayani N., Varma S.C. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 71(2):118–25.
36. Mohammed H.P., Ramos M.M., Rivera A., Johansson M., Muñoz-Jordan J.L., Sun W., Tomashek K.M. Travel-associated dengue infections in the United States, 1996 to 2005. *J. Travel Med.* 2010; 17(1):8–14.
37. Narvaez F., Gutierrez G., Perez M.A., Elizondo D., Nunez A., Balmaseda A., Harris E. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(11):1397.
38. Nicoletti L., Ciccozzi M. Chikungunya and Dengue Viruses in Travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 1:177–8.
39. Parida M., Horioke K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., Islam M.A., Inoue S., Hosaka N., Morita K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6):2895–903.
40. Potiwat R., Komalamisra N., Thavara U., Tawatsin A., Siriwasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2011; 42(6):1388–94.
41. Rocco I.M., Silveira V.R., Maeda A.Y., dos Santos Silva S.J., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A. First Isolation of Dengue 4 in the State of San Paulo, Brazil, 2011. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2012; 54(1):49–51.
42. Saxena P., Kumar Dash P., Sanhosh S.R. Development and evaluation of one step single tube multiplex PT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virol. J.* 2008; 5:20.
43. Tavakoli N.P., Tobin E.H., Wong S.J., Dupuis A.P., Glasheen B., Kramer L.D., Bernard K.A. Identification of dengue virus in respiratory specimens from a patient who had recently traveled from a region where Dengue Virus infection is epidemic. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 5:1523–27.
44. Van der Schaar H.M., Rust M.J., Waarts B.-L., Van der Ende-Metselaar H., Kuhn R.J., Wilschut J., Zhuang X., Smit J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single virus tracking. *J. Virol.* 2007; 81(21):12019–28.
45. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland; 2009. 160 p.
46. WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland; 1997. 86 p.
47. Wu S.-J. L., Lee E.M., Putvatana R., Shurtleff R.N., Porter K.R., Suhayono W., Watts D.M., King C.C., Murphy G.S., Hayes C.G., Romano J.W. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 8:2794–98.
48. Yong Y.K., Thayan R., Chong H.T. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med. J.* 2007; 48:662–8.
49. Zandi K., Lani R., Wong P.F., Teoh B.T., Sam S.S., Johari J., Mustafa M.R., AbuBakar S. Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in vero cells. *Molecules.* 2012; 17(3):2437–45.
50. Zompi S., Harris E. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2012; 4(1):62–82.

## References

1. Ganushkina L.A., Dremova V.P. [Mosquitoes *Aedes aegypti* L. and *Aedes albopictus* skuse – emerging biological threat to the public health of the population in the southern Russia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 3:49–55.
2. Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. [Concerning mosquito detection (*Aedes (Stegomyia) albopictus* skup.) in the territory of the Russian Federation]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 1:3–4.
3. Larichev V.F., Sayfullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. [Imported cases of Arboviral infections in the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2012; 1:35–9.
4. L'vov D.K., editor [Medical virology: practice guidelines]. M.: MIA; 2008. 655 p.
5. L'vov D.K., Klimenko S.M., Gaydamovich S.Ya. [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.: Meditsina; 1989. 336 p.
6. Naydenova E.V., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A. [Reagent panel for Dengue virus RNA detection (I–IV types) by means of reverse transcription and polymerase chain reaction] *Natsional. Prioritet Rossi.* Special Issue. 2011; 2(5): 153.
7. Onishchenko G.G., editor [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents: Practice Guidelines]. M.: ZAO “MP Gigiena”; 2006. 288 p.
8. Pokrovsky V.I., editor [Infectious Diseases: Guidelines for Physicians]. M.: Meditsina; 1996. 528 p.
9. Ryabova T.E., Yunicheva Yu.V., Markovich N.Ya., Ganushkina L.A., Orabey V.G., Sergiev V.P. [Mosquito detection (*Aedes (Stegomyia) aegypti* L.) in Sochi]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2005; 3: 3–5.
10. Yunicheva Yu.V., Ryabova T.E., Markovich N.Ya., Bezzhonova O.V., Ganushkina L.A., Semenov V.B. [First records of the proliferating mosquito population (*Aedes aegypti*) in the vicinity of the Greater Sochi and in several towns of Abkhazia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2008; 3: 40–43.
11. Alfonso H.L., Amarilla A.A., Gonçalves P., Barros M.T., de Almeida F., Silva T.R., Nunes M.T., Vasconcelos P.F.C., Vieira D.S., Batista W.C., Bobadilla M.L., Vazquez C., Moran M., Figueiredo L.T.M., Aquino V.H. Phylogenetic relationship of dengue virus type 3 isolated in Brazil and Paraguay and global evolutionary divergence dynamics. *Virol. J.* 2012; 9:124.
12. Avilés G., Paz M.V., Rangeon G., Ranaivoarisoa M.Y., Verzeri N., Roginski S. Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9:738–42.
13. Blacksell S.D., Jarman R.G., Gibbons R.V., Tanganuchitcharnchai A., Mammen M.P. Jr., Nisalak A., Kalayanaroj S., Bailey M.S., Premaratna R., de Silva H., Day N.P.J., Lalloo D.G. Comparison of seven commercial antigen and antibody detection ELISAs for acute dengue infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(5):804–10.
14. Bona A.C.D., Twerdochlib A.L., Navarro-Silva M.A. Genetic diversity of dengue virus serotypes 1 and 2 in the State of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/premembrane junction region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2012; 45(3):297–300.
15. Cordeiro M., Braga-Neto U., Nogueira R.M., Ernesto T.A., Marques Jr. Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute Dengue infection based on IgG ELISA. *Virology.* 2008; 2(8):280.
16. Dash P.K., Parida M., Santhosh S.R., Saxena P., Srivastava A., Neeraja M., Neeraja M., Lakshmi V., Rao L. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1):52–7.
17. Dussart P., Petit L., Labeau B., Bremand L., Leduc A., Moua D., Matheus S., Baril L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008; 2(8):e280.
18. Gittens-St Hilaire M., Clarke-Greenidge N. An analysis of the subtypes of dengue fever infections in Barbados 2003–2007 by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Virol. J.* 2008; 5:152.
19. Gjenero-Margan I., Aleraj B., Krajcar D., Lesnikar V., Klobucar A., Kurecic-Filipovic S., Komparak S., Martić R., Duričić S., Betica-Radić L., Okmadžić J., Vilibić-Čavlek T., Babić-Ercog A., Turković B., Avsić-Županc T., Radić I., Ljubić M., Sarac K., Benić N., Mlinarić-Galinović G. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16. pii 19805.
20. Gurukumar K.R., Priyadarshini D., Patil J.A., Bhagat A., Singh A., Shah P.S., Cecilia D. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol. J.* 2009; 6:10.
21. Hang V.T., Nguyen N.M., Trung D., Tricou V., Yoksan S., Dung N.M., Van Ngoc T., Hien T.T., Farrar J., Wills B., Simmons C. Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(1): e360.
22. Huhtamo E., Uzcátegui N.Y., Siikamäki H. Molecular epidemiology of dengue virus strains from Finnish travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(1):80–3.
23. Ito M., Takasaki T., Yamada K., Nerome R., Tajima S., Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5935–7.
24. Klunghong C., Putnak R., Mammen M.P., Zhang C. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods.* 2008; 154:175–81.
25. Klunghong G., Gibbons R.V., Thaisomboonsuk B., Nisalak A.,

- Kalayanarooj S., Thirawuth V. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 8:2480–5.
26. Kong Y.Y., Thay C.H., Tin T.C., Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2006; 138:123–30.
27. Kuno G., Gubler D.J., Vélez M., Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull. World Health Organ.* 1985; 63(2):279–86.
28. La Ruche G., Souares Y., Armengaud A., Peloux-Petiot F., Delaunay P., Despres P., Lenglet A., Jourdain F., Leparc-Goffart I., Charlet F., Ollier L., Mantey K., Mollet T., Fournier J.P., Torrents R., Leitmeyer K., Hilariet P., Zeller H., Van Bortel W., Dejour-Salamanca D., Grandadam M., Gastellu-Etchegorry M. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15. pii19676.
29. Lanciotti R.S., Calisher C.H., Gubler D.J., Chang G.J., Vorndam A.V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(3):545–51.
30. Levi J.E., Tateno A.F., Machado A.F., Ramalho D.C., de Souza V.A., Guilarde A.O., de Rezende Feres V.C., Martelli C.M., Turchi M.D., Siqueira J.B. Jr., Pannuti C.S. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of Dengue Virus in samples collected during an outbreak in Goiânia, Central Brazil, in 2005. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 6:1893–97.
31. Li S., Fang M., Zhou B., Ni H., Shen O., Zhang H., Han Y., Yin J., Chang W., Xu G., Cao G. Simultaneous detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4, Japanese encephalitis virus, and West Nile virus by a combined reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virol. J.* 2011; 8:360.
32. Louis C. Daily Newspaper View of Dengue Fever Epidemic, Athens, Greece, 1927–1931. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 1:78–82.
33. Menting S., Khoa T.D., Tran T.T., Hoang L.P., Klatser P., Wolthers K.C., Binh T.Q., de Vries P.J., Beld M. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Adv. Virol.* 2011; 2011:514681. doi: 10.1155/2011/514681.
34. Messer W.B., Gubler D.J., Harris E., Sivananthan K., de Silva A.M. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):800–9.
35. Mishra B., Sharma M., Pujhari S.K., Ratho R.K., Gopal S., Kumar N., Sarangi G., Chayani N., Varma S.C. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 71(2):118–25.
36. Mohammed H.P., Ramos M.M., Rivera A., Johansson M., Muñoz-Jordan J.L., Sun W., Tomashek K.M. Travel-associated dengue infections in the United States, 1996 to 2005. *J. Travel Med.* 2010; 17(1):8–14.
37. Narvaez F., Gutierrez G., Perez M.A., Elizondo D., Nunez A., Balmaseda A., Harris E. Evaluation of the Traditional and Revised WHO Classifications of Dengue Disease Severity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(11):1397.
38. Nicoletti L., Ciccozzi M. Chikungunya and Dengue Viruses in Travelers. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 1:177–8.
39. Parida M., Horioka K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., Islam M.A., Inoue S., Hosaka N., Morita K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6):2895–903.
40. Potiwat R., Komalamisra N., Thavara U., Tawatsin A., Siriwasatien P. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2011; 42(6):1388–94.
41. Rocco I.M., Silveira V.R., Maeda A.Y., dos Santos Silva S.J., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A. First Isolation of Dengue 4 in the State of São Paulo, Brazil, 2011. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2012; 54(1):49–51.
42. Saxena P., Kumar Dash P., Sanhosh S.R. Development and evaluation of one step single tube multiplex PT-PCR for rapid detection and typing of dengue viruses. *Virol. J.* 2008; 5:20.
43. Tavakoli N.P., Tobin E.H., Wong S.J., Dupuis A.P., Glasheen B., Kramer L.D., Bernard K.A. Identification of dengue virus in respiratory specimens from a patient who had recently traveled from a region where Dengue Virus infection is epidemic. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 5:1523–27.
44. Van der Schaar H.M., Rust M.J., Waarts B.-L., Van der Ende-Metselaar H., Kuhn R.J., Wilschut J., Zhuang X., Smit J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single virus tracking. *J. Virol.* 2007; 81(21):12019–28.
45. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva, Switzerland; 2009. 160 p.
46. WHO. Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland; 1997. 86 p.
47. Wu S.-J. L., Lee E. M., Putvatana R., Shurtliff R.N., Porter K.R., Suharyono W., Watts D.M., King C.C., Murphy G.S., Hayes C.G., Romano J.W. Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 8:2794–98.
48. Yong Y.K., Thayan R., Chong H.T. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med. J.* 2007; 48:662–8.
49. Zandi K., Lani R., Wong P.F., Teoh B.T., Sam S.S., Johari J., Mustafa M.R., AbuBakar S. Flavone enhances dengue virus type-2 (NGC strain) infectivity and replication in vero cells. *Molecules.* 2012; 17(3):2437–45.
50. Zompi S., Harris E. Animal Models of Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2012; 4(1):62–82.

#### Authors:

Naydenova E.V., Kuklev V.E., Yashechkin Yu.I., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Найденова Е.В., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 23.01.13.

УДК 616.932:57.085(042)

**С.А.Еремин, Ю.А.Алешина, А.В.Комиссаров, О.В.Громова, Ю.Г.Васин, А.К.Никифоров,  
Л.Ф.Ливанова, О.А.Волох, О.А.Лобовикова, В.С.Бронникова**

## **МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА (ОБЗОР)**

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

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам культивирования холерного вибриона. Даны сведения о следующих методах, применяемых в технологическом процессе его выращивания: периодическое культивирование, периодическое с подпиткой, отъемно-доливное выращивание микроорганизмов, ферментация с диализом, непрерывное культивирование. Рассмотрены их преимущества и недостатки. Проанализировано влияние таких параметров, как концентрация растворенного кислорода, содержание источника углеводного питания, pH среды, температура, концентрация и физиологическое состояние инокулята, продолжительность технологического процесса на рост этого микроорганизма и синтез его антигенов. Проведенный анализ данных литературы позволяет выбрать способ проведения процесса культивирования холерного вибриона и учесть влияние описанных в обзоре параметров при разработке технологии производства медицинских иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики холеры.

*Ключевые слова:* культивирование, *Vibrio cholerae*, антигены, технологические параметры.

**S.A.Eremin, Yu.A.Aleshina, A.V.Komissarov, O.V.Gromova, Yu.G.Vasin, A.K.Nikiforov, L.F.Livanova,  
O.A.Volokh, O.A.Lobovikova, V.S.Bronnikova**

## **Methods and Technologies of Cholera Vibrio Cultivation (Scientific Review)**

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

Displayed is the review of domestic and foreign literature sources devoted to matters of cholera vibrio cultivation. Discussed is the information concerning the following methods utilized in the technological process of vibrio growth stimulation: batch cultivation, fed-batch, fermentation and dialysis, periodic and continuous cultivation. Analyzed is the impact of such parameters as dissolved oxygen concentration, count of carbon nutrition source, medium pH, temperature rate, concentration and physiological condition of inoculate, duration of technological process, affecting the growth of this microorganism and synthesis of its antigens. Consequently, literature data analysis has contributed to the selection of proper method for cholera vibrio cultivation and consideration of the factors mentioned above for the development of manufacture technology applied to the production of medical immunoglobulin preparations for diagnostics and prophylaxis of cholera.

*Key words:* cultivation, *Vibrio cholerae*, antigens, technological parameters.

Процесс культивирования лежит в основе каждого микробиологического производства, определяя его эффективность, качество продуктов микробного синтеза и целевого продукта. При разработке технологий производства вакцинных препаратов существенную роль играет выбор процесса культивирования, который сразу должен быть направлен на конечную цель и соответствовать будущим масштабам производства.

В связи с этим мы поставили перед собой задачу рассмотреть основные методы и технологии культивирования *Vibrio cholerae*, а также влияние различных параметров на рост этого микроорганизма и синтез антигенов.

Выращивание холерных вибрионов осуществляется на плотных и жидких питательных средах (ПС). При этом культивирование холерных вибрионов на плотных ПС с целью получения профилактических препаратов осуществлялось до начала 60-х годов XX в. в стеклянной посуде небольшой емко-

сти (матрацы, бутылки), что было сопряжено с большой затратой времени, материалов и т.д. На рубеже 60–70-х годов прошлого столетия была разработана технология выращивания холерных вибрионов в производственных целях на плотных ПС в аппаратах АКМ-Ш в условиях контролируемой аэрации [14, 24]. Было установлено, что оптимальным временем выращивания холерного вибриона при температуре 37 °C является 18 ч с периодическим аэрированием стерильным воздухом через каждые 1,5 ч в течение 15 мин в количестве 50 дм<sup>3</sup> в 1 мин. Это позволило увеличить выход биомассы в 4 раза в сравнении с выращиванием на матрацах, при этом полученные вакцины соответствовали нормируемым требованиям. Практически в это же время разрабатывался способ глубинного метода выращивания холерных вибрионов периодическим методом [2], который в настоящее время нашел широкое применение при производстве вакцин.

Часто в процессах микробного культивирова-



ния применяют периодическое культивирование с подпиткой. При таком способе, кроме первичного внесения ПС, добавляют порциями или капельно вещества, стимулирующие или поддерживающие процесс культивирования. Модификацией этого метода является отъемно-доливное выращивание микроорганизмов, сущность которого заключается в том, что часть содержимого ферментера удаляется, а аналогичный объем ПС закачивается. Успешно в экспериментальных целях данный метод применялся при выращивании холерных вибрионов – продуцентов протективных антигенов (ПА) [18]. Авторами была разработана технология двухциклического культивирования штаммов холерного вибриона сероваров Инаба 35А3 и Огава М41 в ферментере. Процесс осуществляли путем отбора на втором часе культивирования 2 дм<sup>3</sup> суспензии из первого ферментера, которую вводили в качестве инокулята во второй ферментер. Использовали ферментеры объемом 40 дм<sup>3</sup>. Культивирование в обоих ферментерах довели до начала фазы стационарного роста. Показано, что в первом и втором циклах не наблюдалось разницы в выходе биомассы, не установлено различий в ультраструктуре вибрионов. Во втором цикле отмечено сокращение минимального времени генерации. Отсутствовала разница в антигенной и иммуногенной активностях, полученных из первого и второго циклов культивирования. Было отмечено, что удельная скорость роста биомассы в первом ферментере была ниже и устанавливалась позже, чем во втором. В диссертации Ю.Г.Васина установлено, что количество холерного токсина (ХТ) и О-антигена (О-АГ), а также биологическая активность ХТ остаются одинаковыми как для периодических культур, так и для каждого цикла отъемно-доливной культуры.

П.Х.Ненковым и соавт. при исследовании процесса культивирования *V. cholerae* сероваров Инаба и Огава в ферментере с автоматическим контролем параметров [19] выявлено, что концентрация кислорода в ПС определяет скорость роста микроорганизмов, уровни утилизации глюкозы и выход биомассы холерных вибрионов. Проведенные исследования по выращиванию холерных вибрионов в ферментере объемом 40 дм<sup>3</sup> в условиях лимита по кислороду и при рО<sub>2</sub> равным 50 % от исходного уровня насыщения ПС дали следующие результаты. При лимитации кислородом концентрация биомассы увеличивалась в течение 9 ч; удельная скорость достигала максимума на втором часу, когда устанавливалась короткая экспоненциальная фаза роста с временем генерации 33 мин; абсолютная скорость роста увеличивалась до третьего часа, а затем снижалась; концентрация микробных клеток в стационарной фазе роста составляла 33 млрд/мл. Насыщение ПС кислородом до 50 % дало следующие результаты: время генерации в экспоненциальной фазе уменьшалось до 20 мин; абсолютная скорость роста микроорганизмов увеличивалась до шестого часа; концентрация микробных клеток в стационарной фазе роста составляла 95 млрд/мл.

Одна из модификаций непрерывного способа

культивирования – ферментация с диализом. При данном методе происходит постоянная подача субстрата в биореактор через специальную мембрану. Процесс диализа снижает концентрацию продуктов метаболизма биомассы, отрицательно влияющих на рост клеток. Кроме того, в процессе диализа происходит определенное концентрирование ПС, а значит и биомассы. Данный метод апробировался при культивировании холерного вибриона [33]. Было показано, что продукция ХТ при данном способе выше в сравнении с ХТ, полученным глубинным способом.

Исследователями была показана возможность применения метода непрерывного культивирования холерных вибрионов с целью получения основных ПА [46]. Было показано, что использование данного метода позволяет получать стандартные препараты, биологическая активность которых не уступает препаратам, полученным при периодическом культивировании.

Оптимальные условия (температура, рН ПС, аэрация и т.д.) синтеза антигенов холерными вибрионами индивидуальны для каждого штамма-продуцента [1, 32]. Одним из первых исследователей, изучавшим влияние температуры культивирования штаммов *V. cholerae* на синтез антигенов, был G.P.Craig. Им было показано, что максимальная продукция ХТ при выращивании на пептонной воде штамма *V. cholerae* VC-12 происходит при температуре 29 °С [27]. D.J.Evans и S.H.Richardson подтвердили эти данные при выращивании холерных вибрионов с казаминовыми аминокислотами. При этом они констатировали, что для лучшего синтеза антигенов необходима высокая степень аэрации среды выращивания [32]. R.A.Finkelstein и соавт. определили ряд оптимальных параметров для культивирования штамма *V. cholerae* 569В Инаба на ПС из казаминовых аминокислот. Ими было показано, что посевная доза должна составлять не менее 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> живых клеток на 1 мл среды; процесс выращивания целесообразно вести до начала стационарной фазы роста микроорганизма; массообменные характеристики ферментера должны быть на уровне 1,5–3,0 г кислорода на 1 дм<sup>3</sup> среды в час [34–36]. Исследовано влияние на рост холерных вибрионов и синтез антигенов аэрации и перемешивания [34, 43, 46, 47]. Исследователями сделан вывод, что продукция антигенов во многом определяется степенью насыщения среды выращивания кислородом. В работе S.Nandi и соавт. [39] при анализе происхождения вариантов *V. cholerae* O1 биовара эльтор показано, что штаммы, выделенные до вспышки 1992 г., вызванной *V. cholerae* O139, продуцируют максимальное количество ХТ при 30 °С, а штаммы, выделенные после нее – при 37 °С.

В диссертации Т.Л.Захаровой установлено, что оптимальными условиями для экспрессии чужеродного адгезина CFA1 в клетках холерного вибриона являются культивирование на CFA-агаре в течение 24 ч при 37 °С и последующее выращивание в течение 18 ч при 37 °С в триптиказосоевом бульоне. В этих условиях адгезивная активность холерных ви-

брионов с плазмидой *pcFA* повышается в 8–30 раз.

В диссертации Т.В.Бугорковой было установлено, что при выращивании холерных вибрионов на мембраноагаре (представляющем собой казеиновый агар, покрытый стерильной целлофановой пленкой) накопление фактора сосудистой проницаемости происходило более интенсивно, чем при выращивании их на казеиновом агаре без мембраны, при этом изменение температур культивирования с 30 °С до 37 °С не оказывало влияния на синтез антигена. Культивирование штамма *V. cholerae* KM 138 O139 серогруппы с целью получения холерного O139 антигена проводили при 35 °С [22, 25].

L.T.Callahan и соавт. [28, 29] проводили исследования по культивированию штамма *V. cholerae* 569В Инаба в комплексной ПС из аминокислот. Культуру выращивали 24 ч при 33 °С, синтез ХТ начинался с 16 ч, когда значение рН превышало 7,0. Величина рН изменялась в течение 12 ч от 7,5 до 6,7, к 24 ч поднималась до 8,2. Глюкоза полностью утилизировалась к 16 часу выращивания. Авторами был сделан вывод, что основным недостатком внесения глюкозы в полном количестве в ПС является резкое уменьшение уровня рН в результате накопления продуктов ее окисления. Данный недостаток может быть устранен добавлением щелочи, при этом поддержание рН на уровне 7,6 ведет к стимулированию роста биомассы и накопления антигенов.

Культивирование штаммов *V. cholerae* KM 200 и KM 197 классического биовара серовара Огава с целью получения ХТ и токсин-корегулируемых пилей адгезии проводили при температуре 30 °С [20, 21].

В патенте США [44] описаны рекомбинантные штаммы *V. cholerae* VCUSM1 (O139 серогруппы) и VCUSM4 (O1 серогруппы биовара эльтор) и вакцина на их основе. Авторами показано, что культивирование данных штаммов холерных вибрионов с целью получения О-АГ целесообразно осуществлять при температуре 37 °С. В исследованиях по получению авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор и оценки их способности к продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава, обеспечивающих формирование антибактериального иммунитета, культивирование штаммов холерного вибриона осуществляли при 37 °С с использованием жидкой и агаризованной ПС [23].

В работе В.Л.Куликовой и соавт. [15] была изучена зависимость основных биологических свойств культур холерных вибрионов 569В Инаба, выращенных при глубинном культивировании от времени выращивания и качества посевного материала. При анализе закономерностей развития холерного вибриона ими было установлено, что при увеличении количества засеваемых микробов сокращается продолжительность генерации, стадии развития микробной популяции быстрее сменяют друг друга. Применение для засева реактора аэрированной культуры позволило сократить продолжительность выращивания, а также увеличить концентрацию холерных вибрионов и содержание в культуральной жидкости ХТ и О-АГ.

Максимум продукции антигенов наблюдался при переходе микробной культуры в стационарную фазу роста, удлинение сроков культивирования не приводило к увеличению концентрации холерных вибрионов и продукции О-АГ, а содержание ХТ уменьшалось. Кроме того, авторами был сделан вывод о необходимости сохранения оптимума рН и температуры при производственном культивировании для стимулирования образования антигенов.

В работе А.Б.Мазрухо и соавт. [17], при определении оптимальных условий продукции ряда факторов патогенности холерных вибрионов штаммов *V. cholerae* O1 569В Инаба, *V. cholerae* биовара эльтор Р-5879, *V. cholerae* биовара эльтор Р-14863 и *V. cholerae* биовара эльтор Р-14873 и *V. cholerae* O139 серовара МО145 было исследовано влияние различных температур и уровня аэрации на продукцию ХТ. При изучении влияния температур выявлено, что продукция ХТ наблюдалась в интервале от 29 до 37 °С, при этом оптимумом является 33 °С. Изучение влияния «теплового шока» (культивирование в течение 2 ч при температуре 43 °С с последующим снижением до 32 °С) показало, что уровень продукции ХТ не возрастал. Также исследователями было обнаружено, что увеличение уровня аэрирования приводит к повышению продукции ХТ.

При глубинном культивировании холерного вибриона значительное количество антигенов спонтанно освобождается в окружающую среду [42], что было использовано при разработке технологий их выращивания.

Исследователями был разработан режим глубинного культивирования холерных вибрионов с добавлением 0,2–0,3 % глюкозы и раствора аммиака в качестве регуляторов оптимальных значений рН, а также изучено влияние уровня аэрации культуральной жидкости на биологические свойства глубинных культур. Проведенные исследования показали, что увеличение степени аэрации измеряемого косвенным методом (по окислению сульфита кислородом) воздуха с 54–60 мг/л/мин до 90–130 мг/л/мин приводит к увеличению интенсивности роста холерных вибрионов и продукции ХТ и О-АГ. Также ими было доказано, что процесс культивирования необходимо вести не более 9–10 ч, после чего наблюдается снижение продукции антигенов [16].

Исследования, проведенные в 70-х годах прошлого столетия в Швейцарии (Swiss Serum and Vaccine Institute, Berne, Switzerland), обнаружили возможность получения ХТ при культивировании *V. cholerae* 569 Инаба в ферментере вместимостью 10 дм<sup>3</sup>. Ими были использованы следующие технологические параметры: посевная доза – 10<sup>7</sup> м.к./л; скорость вращения мешалки – 550 rpm; аэрация воздухом – 1,0 дм<sup>3</sup> воздуха на 1,0 дм<sup>3</sup> ПС в минуту; температура проведения процесса – 30 °С; время проведения процесса – 17 ч [30].

Имеются сведения о режимах культивирования *V. cholerae* 569 Инаба, отработанных южнокорейскими учеными, с целью получения ХТ. Ими было

выявлено, что для большей продукции ХТ целесообразно проводить выращивание холерного вибриона при температуре 32 °С, при автоматическом поддержании уровня pH 7,8 с помощью добавления корригирующих растворов: 10 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  или 10 %  $\text{HCl}$ . Также ими было установлено, что снижение или увеличение температуры культивирования ухудшает синтез ХТ, а его максимальная продукция наблюдается при 35 % насыщении культуральной жидкости кислородом. Оптимальное время культивирования составляет 12 ч [37].

В результате проведения исследований по определению оптимальных условий выращивания штамма *V. cholerae* биовара эльтор KM 234 в колбах Эрленмейера на термостатируемой качалке, при которых происходит наибольшая продукция ХТ, установлено, что эффективный биосинтез ХТ наблюдался при выращивании на казеиновом бульоне (pH 7,6) при 30 °С и времени культивирования – 8 ч [6].

Шведскими учеными были разработаны прогностические модели для роста биомассы, потребления глюкозы и выделения ацетата в ходе роста *V. cholerae* в культуре с периодической подпиткой глюкозой. Данные модели успешно были использованы для контроля за биомассой, глюкозой и ацетатом при помощи многопараметрического анализатора, работающего в режиме он-лайн, для регулирования скорости роста *V. cholerae*, накопления ХТ за счет корректировки скорости подачи глюкозы [38].

Многие исследователи считают, что максимум накопления ПА, синтезируемых *V. cholerae*, в ходе периодического глубинного культивирования происходит при переходе роста микроорганизмов из экспоненциальной в стационарную фазу роста [40, 41, 50].

Имеются сведения о разработке процесса культивирования холерных вибрионов с подпиткой глюкозой. Исследователи доказали, что ее добавление в культуральную жидкость целесообразно осуществлять при переходе роста микроорганизмов в экспоненциальную фазу, а профиль ее подачи зависит от концентрации растворенного кислорода [26, 31]. В ряде работ установлено, что избыточное добавление глюкозы в культуральную жидкость в ходе периодического глубинного культивирования холерных вибрионов приводит к закислению, уменьшению скорости роста микроорганизмов и, соответственно, уменьшению накопления антигенов [31, 45, 48, 49].

Имеются сведения о конструировании штаммов *V. cholerae* с повышенной продукцией одновременно трех основных ПА – ХТ, токсин-корегулируемых пилей адгезии и О1 антигена и определении оптимальных условий их глубинного культивирования [5, 11–13]. В работе С.П.Задновой и соавт. [11] проведено изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *V. cholerae* при их культивировании в термостатированной качалке при 37 °С в Г-образных пробирках, содержащих 3 мл питательного бульона LB (pH 6,8). В качестве продуцента О1 антигена серовара Инаба был использован штамм *V. cholerae* 2415 классического биовара, имею-

щий также высокий уровень биосинтеза ХТ I типа и токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТКПА). Для получения О1 антигена серовара Огава, а также ХТ I типа и ТКПА использовали штамм классического биовара *V. cholerae* 2416. Продуцентом В-субъединицы ХТ служил авирулентный штамм *V. cholerae* KM 93, относящийся к не О1/не О139 серогруппе, для выделения ХТ II типа был взят штамм *V. cholerae* KM 234 эльтор биовара серовара Огава. В качестве продуцентов О139 антигена взяты штаммы *V. cholerae* О139 серогруппы – авирулентный природный KM 230 и вирулентные бескапсульные KM 137 и KM 138. Для каждого штамма определено оптимальное время, необходимое для достижения начала стационарного развития популяции. В результате установлено, что штаммы *V. cholerae* 2415 и KM 206 следует культивировать до 10 ч, тогда как *V. cholerae* KM 93 и KM 234 – 8 ч, *V. cholerae* KM 138, KM 137 и KM 230 – 9 ч, поскольку увеличение срока культивирования последних до 10 ч приводит к лизису культуры.

В работе О.А.Волох и соавт. представлены основные биокинетические показатели роста при масштабированном культивировании в ферментере штаммов *V. cholerae* KM 206 и 2415 О1 серогруппы классического биовара; *V. cholerae* KM137 О139 серогруппы; *V. cholerae* KM234 О1 серогруппы биовара эльтор; *V. cholerae* KM 93 не О1/не О139 серогруппы, являющихся продуцентами основных ПА (О1 и О139 антигенов, ХТ I и II типов, В-субъединицы ХТ II типа, ТКПА) при глубинном культивировании. Для каждого штамма определены оптимальные условия (ПС, pH, время культивирования, использование дополнительного источника углеводов) для максимальной продукции ПА в условиях производства, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных ПА *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов. Температура культивирования для штаммов KM 137 и KM 234 составляла 37 °С, остальные штаммы выращивали при 30 °С. Культивирование штаммов О1 серогруппы классического биовара серовара Огава *V. cholerae* KM 206 и Инаба *V. cholerae* 2415 показало, что при выращивании в LB бульоне они активно синтезируют все антигены (О-АГ, ХТ и ТКПА), при этом установлено, что оптимальным значением pH ПС являются значения 7,2–7,8, время культивирования – 12 ч, при удлинении времени выращивания начинается лизис клеток, а добавление дополнительных источников углерода в ходе выращивания данных штаммов дает возможность продлевать экспоненциальную фазу роста. Глубинное культивирование штамма-продуцента О139 антигена *V. cholerae* KM137 на бульоне LB (pH 7,5±0,1) показало, что оптимальное время выращивания данного штамма составляло 11–12 ч. Дробная подача глюкозы (40 %) при переходе микробной популяции в экспоненциальную фазу роста позволила увеличить удельную скорость роста и сократить время генерации. При оптимизации условий выращивания штамма KM 93 для высокого выхода биомассы и продукции в среду



выращивания В-субъединицы ХТ установлено, что культивирование данного штамма целесообразно проводить в казеиновом бульоне с 1 % пептоном (рН 7,6) отъемно-доливным способом (методом фазовых культур), позволяющим получать больший объем биомассы за короткий промежуток времени. При культивировании штамма-продуцента ХТ II типа *V. cholerae* KM 234 было показано, что интенсификация газообмена и массообмена приводит к постепенному и полному потреблению питательных веществ из среды и, соответственно, более продуктивному росту биомассы и синтезу антигена. Авторами сделан вывод, что для высокой продукции основных ПА холерного вибриона штаммами-продуцентами при масштабированном культивировании необходимо использовать богатые ПС, контролируя рН среды и время культивирования, а также дополнительные источники углерода [5].

Коллективом авторов [10] разработан промышленный способ раздельного получения холерогена-анатоксина и О-АГ холерного вибриона. Холерный вибрион выращивали в условиях глубинного культивирования в реакторе с 250 дм<sup>3</sup> бульона из ферментативного перевара казеина или мяса, с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой. В первые четыре часа роста температуру поддерживали на уровне 37 °С, а затем в течение 5–7 ч снижали до 34–35 °С для сохранения в культуральной жидкости термолабильного холерогена. В начале стационарной фазы роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–100 млрд в 1 мл, остается постоянной 2–3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6 % формалина. Авторами было показано, что закономерности роста у штаммов были сходными, логарифмическая фаза составляла в среднем 4–5 ч, через 10–11 ч наступал стационарный период роста. Основные иммуногены появлялись в культуральной жидкости в начале логарифмической фазы роста (5–6 ч), количество их увеличивалось к концу выращивания.

При разработке способа получения очищенного холерного О-АГ в качестве продуцентов этого ПА использовали штаммы О1 серогруппы М41 Огава и 569В Инаба, а также О139 серогруппы. Холерные вибрионы выращивали при температуре 34–37 °С в реакторе на ПС из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В стационарной фазе роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–80 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6–0,2 % формалина [7].

При конструировании оральной химической вакцины для специфической профилактики холеры, вызванной эпидемически значимыми штаммами НАГ вибрионов О139 серогруппы использовали штаммы холерного вибриона О139 серогруппы [8]. Холерный вибрион О139 серогруппы выращивали при температуре 37 °С в реакторе на ПС из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В ста-

ционарной фазе роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–80 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6–0,2 % формалина. Коллективом авторов была изучена динамика накопления антигенов штамма О139 серовара при глубинном культивировании культуры в условиях производства. Полученные данные показали, что условия выращивания штаммов О1 серовара, разработанные ранее для производства холерной вакцины, обеспечивают не только накопление необходимых антигенов при культивировании штамма О139 серовара, но и способствуют значительно (в 3–4 раза) большему выходу в среду биомассы, растворимого О-АГ и экзоферментов [9].

При разработке способа производства вакцины для профилактики холеры в качестве продуцента О-АГ Огава использовали штамм холерного вибриона *V. cholerae* М41 Огава [3]. Холерный вибрион выращивали при 37 °С в реакторе с 250 дм<sup>3</sup> бульона из ферментативного перевара казеина или Хоттингера в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В стационарной фазе роста (10–12 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 80–110 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6 % формалина.

Авторским коллективом сконструирована ПС на основе фибрина и произведена ее апробация для выращивания холерных вибрионов [4]. При культивировании *V. cholerae* М-41 серовара Огава в ферментере объемом 0,5 м<sup>3</sup> в условиях аэрации и подкормки раствором глюкозы – на ПС из гидролизата фибрина (37 °С, в течение 10 ч) получено биомассы 158·10<sup>9</sup> м.к./мл, соответственно на ПС из гидролизата казеина – 111,4·10<sup>9</sup> м.к./мл. Титры О-АГ, полученного на предлагаемой ПС, в два раза превышали титры О-АГ, полученного на контрольной ПС.

Таким образом, при анализе данных литературы по основным методам и технологиям культивирования холерного вибриона, а также влияния различных параметров на рост этого микроорганизма и синтез антигенов установлено следующее:

- основным методом культивирования холерных вибрионов для получения вакцинных препаратов является периодическое с подпиткой углеводным источником питания, как правило глюкозой;
- недостаток растворенного кислорода в среде и избыточное добавление глюкозы в культуральную жидкость в ходе периодического глубинного культивирования холерных вибрионов приводит к закислению, уменьшению скорости роста микроорганизмов и накопления антигенов;
- культивирование необходимо вести при определенном оптимальном значении рН среды, корректируя его в ходе процесса, как правило, изменением скорости подачи глюкозы или добавлением химического реактива, имеющего щелочное значение рН;
- существенное влияние на процесс культивирования оказывает концентрация инокулята и его физи-

ологическое состояние;

- на синтез антигенов влияет температура проведения процесса;

- максимальная продукция антигенов наблюдается при переходе растущей культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та; 1984: 328 с.
2. Алтухов М.В., Никитин Г.А., Филлипов Н.Ф. Реакторная установка для культивирования микроорганизмов глубинным методом. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 2(6):192.
3. Анисимов П.И., Адамов А.К., Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент 2080121 РФ, опубл. 27.05.1997. Бюл. № 15.
4. Антоничева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.В., Шульгина И.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент 2425866 РФ, опубл. 10.08.2011. Бюл. № 22.
5. Волох О.А., Шепелёв И.А., Заднова С.П., Крепостнова И.М., Еремин С.А. Изучение биокINETических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):52–5.
6. Горяев А.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):56–9.
7. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент 2143280 РФ, опубл. 27.12.1999. Бюл. № 36.
8. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Наумов А.В., Кузьмиченко И.А., Тараненко Т.М. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент 2159128 РФ, опубл. 20.11.2000. Бюл. № 33.
9. Наумов А.В., Джапаридзе М.Н., Громова О.В., Адамов А.К., Елисеев Ю.Ю., Космаенко О.М., Кузьмиченко И.А., Копызов В.Н., Заворотных В.И., Захарова Т.Л., Чеховская Г.В. Использование нового штамма *Vibrio cholerae* O139 в качестве продуцента энтеральной химической вакцины. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 2:52–5.
10. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Мелешенко М.В., Никитина Г.П. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент 2076734 РФ, опубл. 10.04.1997. Бюл. № 13.
11. Заднова С.П., Волох О.А., Крепостнова И.М., Щелканова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Захарова Т.Л., Шепелёв И.А., Еремин С.А., Смирнова Н.И. Изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *Vibrio cholerae* при их культивировании в производственных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 1(93):51–5.
12. Заднова С.П., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Волох О.А. Изучение динамики роста штаммов *Vibrio cholerae*-продуцентов протективных антигенов в условиях глубинного культивирования и выделения токсин-корегулируемых пилей адгезии. *Биотехнология.* 2004; 3:43–8.
13. Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 2(100):68–71.
14. Куликова В.Л., Караева Л.Т. Сравнительное изучение свойств холерных вакцин, полученных с АКМ-III и матрацев. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 2(6):116–22.
15. Куликова В.Л., Коваленко Н.М., Доброва Г.В., Копызов В.Н., Космачева Н.Л. Изучение оптимальных условий роста, формирования специфических антигенов и токсинообразования у культуры холерного вибриона при глубинном выращивании. *Пробл. особо опасных инф.* 1979; 1:65–6.
16. Лавровская В.М., Чибрикова Е.В., Караева Л.Т., Пертова Л.С., Анохина С.В., Анисимова Т.И., Воронкина И.М., Джапаридзе М.Н., Дроздовская Ф.К., Кондрашкова Т.В., Павлова Л.П., Гуртовик А.И. Культивирование холерных вибрионов в условиях аэрации среды и изучение биологических свойств глубинных культур. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 3(37):179–83.
17. Мазрухо А.Б., Михась Н.К., Монахова В.Е., Рожков К.К. Определение оптимальных условий продукции ряда факторов патогенности холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2000; 1:21–4.
18. Ненков П.Х., Страшимиров И.И., Поликар А.Ч. Двухциклическое культивирование холерных вибрионов в ферментере. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1986; 7:21–4.
19. Ненков А.Х., Поликар А.Ч., Цакова А. Культивирование холерных вибрионов в ферментере с автоматическим контролем ряда параметров. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1982; 5:47–50.
20. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Топорков А.В., Челдышева Н.Б. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 200 – продуцент холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии. Патент 2193598 РФ, опубл. 27.11.2002. Бюл. № 33.
21. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Топорков А.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* 2414 классического биовара серовара Огава – продуцент холерного токсина и токсинкорегулируемых пилей адгезии. Патент 2169187 РФ, опубл. 20.06.2001. Бюл. № 17.
22. Смирнова Н.И., Чеховская Г.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 138 серогруппы O139 – продуцент холерного O139 антигена. Патент 2192463 РФ, опубл. 10.11.2002. Бюл. № 31.
23. Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышева Н.Б., Смирнова Н.И. Авирулентные штаммы *Vibrio cholerae* O1 – продуценты протективного O1-антигена: получение и свойства. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106):39–42.
24. Филиппов А.Ф., Николаев Н.И., Шестеренко А.Ф., Караева Л.Т. Культивирование чумного микроба и холерного вибриона на агаре в аппаратах АКМ-III. *Пробл. особо опасных инф.* 1970; 1(11):158–63.
25. Чеховская Г.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготовления диагностической O139 антисыворотки. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2000; 1:34–7.
26. Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Probing control of fed-batch cultures: Analysis and tuning. *Control Engineering Practice.* 2001; 9(7):709–23.
27. Craig G.P. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5.
28. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. *Infect. Immun.* 1971; 7(5):611–8.
29. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence III. *Infect. Immun.* 1983; 7(4):567–72.
30. Germanier R., Forer E., Varallyay S., Inderbitzin T.M. Preparation of a Purified Antigenic Cholera Toxoid. *Infect. Immun.* 1976; 13(6):1692–8.
31. De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.
32. Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.
33. Fedorka-Gray P.J. Production of cholera toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypotoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.
34. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Pathogenesis of experimental cholera-preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxin. *J. Exp. Med.* 1969; 130(1):185–203.
35. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 1970; 121:63–72.
36. Finkelstein R.A. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin. *A. J. Immunol.* 1966; 96(3):440–9.
37. Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.
38. Navratil M., Norberg A., Lembren L., Mandenius C.F. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 2005; 115(1):67–79.
39. Nandi S., Maiti D., Saha A., Bhadra R.K. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. *Microbiology.* 2003; 149(1):89–97.
40. Osek J., Lebens M., Holmgren J. Improved medium for largescale production of recombinant cholera toxin B subunit for vaccine purposes. *J. Microbiol. Methods.* 1995; 24:117–23.
41. Panda A.K., Ghorpade A., Mukhopadhyay A. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for production of B subunit of the *Escherichia coli* enterotoxin. *Biotechnol Bioeng.* 1995; 45:245–50.
42. Pike P., Chandler C. Partial purification and properties of somatic antigen spontaneously released from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1975; 12(1): 187–92.
43. Richardson S.H. Factors influencing in vitro skin permeability factor production *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1969; 100(1):27–34.
44. Ravichandran M., Ali S.A., Rashid N.H. *Vibrio cholerae* strains VCUSM1 and VCUSM4, method of producing same, and vaccine derivatives thereof. Patent 7838016 US, Nov. 23, 2010. United



States Patent.

45. Riesenberger D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51:422–30.

46. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Enterotoxin production by *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* grown in continuous culture with microbial cell recycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46:704–9.

47. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.

48. Sanchez J., Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:481–5.

49. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.

50. Walle M. van de, Fass R., Shiloach J. Production of cholera toxin subunit B by a mutant strain of *Vibrio cholerae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990; 33:389–94.

## References

1. Adamov A.K., Naumshina M.S. [Cholera Vibrios]. Saratov: Saratov State University Publishing House; 1984. 328 p.

2. Altukhov M.V., Nikitin G.A., Filipov N.F. [Reactor unit for submerged cultivation of microorganisms]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 2(6):192.

3. Anisimov P.I., Adamov A.K., Dzharipidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P. [Method of cholera prevention vaccine production]. RF Patent 2080121, opubl. 27.05.1997. Byul. № 15.

4. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.V., Shul'gina I.V., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K. [Nutrient media for submerged cholera vibrio cultivation]. RF Patent 2425866.

5. Volokh O.A., Shepelev I.A., Zadnova S.P., Krepostnova I.M., Eremin S.A. [A study of biokinetic peculiarities and optimization of the conditions for culturing *Vibrio cholerae* strains overproducing protective antigens suitable for use in the production]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):52–5.

6. Goryaev A.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Touchkov I.V., Smirnova N.I. [Construction of an El Tor biovariant *Vibrio cholerae* strain capable of type II cholera toxin hyperproduction and determining the optimal conditions for the production of this protein]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):56–9.

7. Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of production of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280.

8. Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Naumov A.V., Kuz'michenko I.A., Taranenko T.M. [Oral chemical vaccine against cholera]. RF Patent 2159128.

9. Naumov A.V., Dzharipidze M.N., Gromova O.V., Adamov A.K., Eliseev Yu.Yu., Kosmaenko O.M., Kuz'michenko I.A., Kopyrov V.N., Zavorotnykh V.I., Zakharova T.L., Chekhovskaya G.V. [Novel *Vibrio cholerae* O139 strain as a producer of enteric chemical vaccine]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 2:52–5.

10. Dzharipidze M.N., Naumov A.V., Meleshchenko M.V., Nikitina G.P. [Method of manufacturing of peroral chemical vaccine]. RF Patent 2076734.

11. Zadnova S.P., Volokh O.A., Krepostnova I.M., Shchelkanova E.Yu., Livanova L.F., Zakharova T.L., Shepelev I.A., Yereomin C.A., Smirnova N.I. [Studying the main pathogenicity and immunogenicity factors production by different *Vibrio cholerae* strains while cultured under the production conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 1(93):51–5.

12. Zadnova S.P., Eremin S.A., Avdeeva N.G., Volokh O.A. [Studies of growth rates as regards *Vibrio cholerae* strains – producers of the protective antigens, under conditions of submerged cultivation. Isolation of toxin-coregulated pilus of adhesion]. *Biotechnologiya.* 2004; 3:43–8.

13. Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. [Recombinant strains application for simultaneous preparation of several purified cholera vibrio antigen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 2(100):68–71.

14. Kulikova V.L., Karaeva L.T. [Comparative study of cholera vaccine properties, obtained using AKM-III units and fillers]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 2(6):116–22.

15. Kulikova V.L., Kovalenko N.M., Dobrova G.V., Kopyrov V.N., Kosmacheva N.L. [Investigations of optimum growth conditions, specific antigen formation and toxin production base for cholera vibrio culture under submerged cultivation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1979; 1:65–6.

16. Lavrovskaya V.M., Chibrikova E.V., Karaeva L.T., Pertova L.S., Anokhina S.V., Anisimova T.I., Voronkina I.M., Dzharipidze M.N., Drozdovskaya F.K., Kondrashkova T.V., Pavlova L.P., Gurtovik A.I. [Cholera vibrio cultivation under conditions of media aeration, and investigations of biological properties of submerged cultures]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 3(37):179–83.

17. Mazrukho A.B., Mikhas' N.K., Monakhova V.E., Rozhkov K.K. [Identification of optimum conditions for pathogenicity factor production in cholera vibrio]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2000; 1:21–4.

18. Nenkov P.Kh., Strashimirov I.I., Polikar A.Ch. [Two-cycle cholera vibrio cultivation in bioreactor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1986; 7:21–4.

19. Nenkov P.Kh., Polikar A.Ch., Tsakova A. [Cholera vibrio cultivation in bioreactor operated at automatic mode for a range of factors]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1982; 5:47–50.

20. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V., Cheldysheva N.B. [*Vibrio cholerae* strain KM 200 – producer of cholera toxin ad toxin coregulated pilus of adhesion]. RF Patent 2193598.

21. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V. [*Vibrio cholerae* 2414 bacteria strain, Classical biovar, Ogawa serotype – producer of cholera toxin and toxin coregulated pilus of adhesion]. RF Patent 2169187.

22. Smirnova N.I., Chekhovskaya G.V. [*Vibrio cholerae* KM 138 bacteria strain, O139 serotype – producer of cholera O139 antigen]. RF Patent 2192463.

23. Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldysheva N.B., Smirnova N.I. [*Vibrio cholerae* O1 avirulent strains – producers of protective O1 antigen: obtaining and peculiarities]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4(106): 39–42.

24. Filipov A.F., Nikolaev N.I., Shesterenko A.F., Karaeva L.T. [Plague microbe and cholera vibrio agar cultivation using AKM-III]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1970; 1(11):158–63.

25. Chekhovskaya G.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [Non-capsular *Vibrio cholerae* mutants, O139 serotype: construction, identification and utilization for diagnostic O139 anti-serum preparation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2000; 1:34–7.

26. Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Probing control of fed-batch cultures: Analysis and tuning. *Control Engineering Practice.* 2001; 9(7):709–23.

27. Craig G.P. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5.

28. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. *Infect. Immun.* 1971; 7(5):611–8.

29. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence III. *Infect. Immun.* 1983; 7(4):567–72.

30. Germanier R., Forer E., Varallyay S., Inderbitzin T.M. Preparation of a Purified Antigenic Cholera Toxinoid. *Infect. Immun.* 1976; 13(6):1692–8.

31. De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.

32. Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.

33. Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.

34. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Pathogenesis of experimental cholera-preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinoid. *J. Exp. Med.* 1969; 130(1):185–203.

35. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxinoid. *J. Infect. Dis.* 1970; 121:63–72.

36. Finkelstein R.A. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin. *J. Immunol.* 1966; 96(3):440–9.

37. Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.

38. Navratil M., Norberg A., Lembren L., Mandenius C.F. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 2005; 115(1):67–79.

39. Nandi S., Maiti D., Saha A., Bhadra R.K. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. *Microbiology.* 2003; 149(1):89–97.

40. Osek J., Lebens M., Holmgren J. Improved medium for largescale production of recombinant cholera toxin B subunit for vaccine purposes. *J. Microbiol. Methods.* 1995; 24:117–23.

41. Panda A.K., Ghorpade A., Mukhopadhyay A. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for production of B subunit of the *Escherichia coli* enterotoxin. *Biotechnol. Bioeng.* 1995; 45:245–50.

42. Pike P., Chandler C. Partial purification and properties of somatic antigen spontaneously released from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1975; 12(1):187–92.

43. Richardson S.H. Factors influencing in vitro skin permeability factor production *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1969; 100(1):27–34.

44. Ravichandran M., Ali S.A., Rashid N.H. *Vibrio cholerae* strains VCUSM1 and VCUSM4, method of producing same, and vaccine derivatives thereof. Patent 7838016 US, Nov. 23, 2010. United States Patent.

45. Riesenberger D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51:422–30.

46. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Enterotoxin production by *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* grown in continuous culture with microbial cell recycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46:704–9.

47. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.

48. Sanchez J., Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:481–5.

49. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.

50. Walle M. van de, Fass R., Shiloach J. Production of cholera toxin subunit B by a mutant strain of *Vibrio cholerae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990; 33:389–94.

## Authors:

Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.04.13.



А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева,  
Т.Б.Кравченко, И.А.Дятлов, В.М.Павлов

## СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* БЕЗ ГЕНОВ *IGLC*. СООБЩЕНИЕ 2

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

Делеция одной копии гена *iglC* в вакцинном штамме *F. tularensis* 15 не влияет на его способность размножаться в организме мышей, приводит к задержке выработки антител к суммарному антигену туляремии микроба, не изменяет уровень продукции гамма-интерферона в ответ на стимуляцию ультразвуковым дезинтегратором штамма *F. tularensis* 15, увеличивает LD<sub>50</sub> для мышей линии BALB/c на порядок при сохранении протективных свойств. Штамм 15 без двух копий гена *iglC* не способен размножаться в организме мышей, индуцирует выработку слабого гуморального ответа, отличается сниженной на порядок способностью формировать спленоциты, активирующиеся при добавлении туляремии антигена, полностью авирулентен и обладает сниженной протективной активностью. Введение мышам сывороток, взятых через 49 сут от животных, иммунизированных как исходным штаммом *F. tularensis* 15, так и его вариантами с одним и двумя инактивированными генами *iglC*, обеспечивало их стопроцентную защиту от последующего заражения 200 DCL штамма *F. tularensis* 15. Однако при заражении вирулентными штаммами *F. tularensis* 503 и *F. tularensis* Schu (50 DCL и 25 DCL, соответственно) мышей линии BALB/c, которым за 24 ч были введены иммунные сыворотки, имело место только увеличение средней продолжительности жизни.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, ген *iglC*, протективность, антитела.

A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva,  
T.B.Kravchenko, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

## Construction and Investigation of the Variants of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* Lacking *iglC* Genes. Communication 2

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Single copy deletion of the *iglC* gene in the vaccine *Francisella tularensis* strain 15 has no impact on its ability to replicate in mice organism, factors into the delay of antibody production to total tularemia microbe antigen, does not affect gamma interferon production levels in response to stimulation by ultrasound disintegrator. It also increases LD<sub>50</sub> for BALB/c mice by an order while retaining protective properties. Strain *Francisella tularensis* 15 lacking two copies of the *iglC* gene cannot replicate in mice organism, induces weak humoral response, is fully avirulent, and has decreased protective activity. Treatment of mice with sera obtained from the animals immunized on day 49 post immunization both with the stock *F. tularensis* 15 strain and its variants with one or two inactivated *iglC* genes has provided for 100 % protection from challenge with 200 DCL of *F. tularensis* 15 strain. However in case of BALB/c mice exposure to virulent *F. tularensis* 503 and *F. tularensis* Schu strains (50 DCL and 25 DSL, respectively), treated with immune sera 24 hours before, registered has been only mean lifetime increase.

**Key words:** *Francisella tularensis*, *iglC* gene, protective activity, antibodies.

Ранее было показано, что инактивация двух копий гена *iglC* как в варианте экспериментального вакцинного штамма LVS (принадлежащему к голарктическому подвиду), так и в вирулентном штамме Schu неарктического подвида приводит к утрате их протективных свойств и, соответственно, неспособности защитить мышей от заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* [3, 4, 6]. Однако в этих работах не проведено детального изучения гуморального и клеточного звена противотуляремии иммунитета у мышей, вакцинированных дефектными по гену *iglC* штаммами.

Целью данной работы являлось изучение иммунобиологических свойств вариантов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 без одной и двух копий гена *iglC*.

### Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе использова-

ли штаммы из Государственной коллекции «ГКПМ-Оболensk»: вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; его нокаутные мутанты – *F. tularensis* 15/23-1 (с инактивированной одной копией гена *iglC*) и *F. tularensis* 15/23-2 (с инактивированными двумя копиями гена *iglC*); тест-заражающие вирулентные штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503 и *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu.

**Лабораторные животные.** В работе использовались инбредные мыши линии BALB/c обоего пола (ФИБХ Питомник «Пушино», МО, г. Пушино). Вес мышей составлял 18–20 г, возраст – 6–8 недель. Содержание и манипуляции с животными выполняли в виварии, соответствующем требованиям GAC (Good Animal Care) и протоколу № P03-20 комитета по биоэтике ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

**Условия культивирования.** Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37 °C на плотной (FTA) и жидкой (FTB) питательной среде. Состав

ФТА: 3,8 % эритрит-агар, 1 % высушенная кровь крупного рогатого скота, 1 % глюкоза, 0,05 % цистеин, 0,0025 % тиамин хлорид, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.), Состав ФТВ [2]: 2 % ферментативный гидролизат казеина, 1 % дрожжевой экстракт, 1,2 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 % глюкоза, 0,001 % цистеин, 0,001 %  $\text{FeCl}_2$ , pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). При необходимости в среду добавляли 100 мкг/мл полимиксина В.

**Вирулентность.** Мышам (по 5 в группе) вводили подкожно по 0,2 мл 10-кратных разведений бактериальной суспензии ( $5 \cdot 10^9$  КОЕ/мл) в забуференном физиологическом растворе, pH 7,4 (ЗФР), полученной из ночной агаровой культуры. За животными наблюдали в течение 28 дней. Погибших мышей вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Расчет величины  $\text{LD}_{50}$  проводили по методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

**Приживаемость штаммов *F. tularensis* в организме мышей.** Экспериментальных животных вакцинировали подкожно клетками исследуемых штаммов *F. tularensis* в дозе  $1 \cdot 10^2$  КОЕ для штаммов 15 и 15/23-1 и в дозе  $1 \cdot 10^6$  КОЕ для штамма 15/23-2. На 4, 7, 14-е и 21-е сутки проводили эвтаназию животных, селезенки гомогенизировали и суспендировали в 5 мл ЗФР. Из полученной взвеси готовили десятикратные разведения. Высевы проводили на плотную питательную среду и инкубировали при температуре 37 °С. Результаты учитывали через 72 ч.

**Протективность.** Оценку способности исследуемых штаммов защищать животных ( $\text{ED}_{50}$ ) от подкожного заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* проводили по количеству бактерий, защищающих 50 % вакцинированных мышей от заражения дозами 1000 DCL (Dosis certa letalis).

**Определение уровня синтеза гамма-интерферона спленоцитами иммунизированных мышей.** Мышей на 28-е сутки после иммунизации эвтаназировали ингаляцией  $\text{CO}_2$ . Стерильно вскрывали брюшную полость и забирали селезенку, гомогенизировали через капроновый фильтр в среде RPMI-1640 (Панэко, Россия). Суспензию спленоцитов дважды промывали в среде RPMI-1640, после каждой промывки клетки осаждали центрифугированием при 250 g в течение 10 мин. Отмытые клетки суспендировали до конечной концентрации  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл в питательной среде на основе RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамина, 5 мМ меркаптоэтанола, 20 мкМ Нерес. Для индукции синтеза гамма-интерферона в среду культивирования вносили ультразвуковой дезинтегратор (УЗД) суспензии клеток *F. tularensis* (концентрация суспензии –  $1 \cdot 10^8$  м.к./мл). Митоген конканавалин А (Sigma) в концентрации 5 мкг/мл применяли в качестве положительного контроля. Спленоциты культивировали при температуре 37 °С, 5 %  $\text{CO}_2$  и 100 % влажности в течение 72 ч. Затем из лунок отбирали супернатант и определяли в нем концентрацию гамма-интерферона иммуноферментным методом, используя наборы

фирмы eBioScience (Австрия), согласно инструкции производителя.

**Получение мышинных сывороток, специфичных к возбудителю туляремии.** Мышам вводили подкожно клетки штаммов *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 15/23-1 и *F. tularensis* 15/23-2. В разные сроки наблюдения животных эвтаназировали и проводили тотальный забор крови (от каждой мыши – отдельно). На следующий день сыворотки объединяли по группам, прогревали при температуре 55 °С в течение 30 мин для инактивации комплемента и определяли титр противотуляремийных антител с использованием УЗД клеток штамма *F. tularensis* 15.

**ИФА.** На 96-луночные планшеты фирмы Greiner Bio-One (Германия) средней сорбции адсорбировали УЗД *F. tularensis* (концентрация суспензии –  $1 \cdot 10^8$  м.к./мл) в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6. Адсорбцию антигенов проводили в течение ночи при температуре 4 °С. Для инактивации свободных центров связывания в лунки добавляли раствор 3 % сухого обезжиренного молока (Fluka, Швейцария) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Сыворотки титровали с шагом 1:2 и инкубировали с антигеном в течение 1 ч при температуре 37 °С. После удаления сыворотки и трехкратной отмытки карбонат-бикарбонатным буфером в лунки вносили раствор конъюгата козьих антимышинных поливалентных антител к иммуноглобулинам мыши (IgG, IgA, IgM) – пероксидаза хрена (Amersham, США) в рабочем разведении 1:10000 и инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С.

Ферментативную реакцию проводили с использованием в качестве хромогена *o*-фенилендиамина (ОФД) (4 мг/мл). Планшет инкубировали в течение 20 мин в темноте и реакцию останавливали внесением 0,1 мл 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность (ОД) в лунках измеряли при длине волны 492 нм. За титр антител принимали максимальное разведение сыворотки, в которой ОД хромогена превышало двойное значение фоновой оптической плотности.

**Оценка гуморальной пассивной защиты.** Чистым мышам (по 8 животных в группе) внутрибрюшинно вводили по 200 мкл сыворотки и через 24 ч животных заражали подкожно бактериальными суспензиями штаммов *F. tularensis* 15, *F. tularensis* 503 и *F. tularensis* Schu. За животными наблюдали в течение 21 дня. В качестве контроля использовали мышей, которым внутрибрюшинно вводили сыворотку, полученную от чистых животных.

## Результаты и обсуждение

Персистенцию бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* и его производных в организме экспериментальных мышей оценивали по концентрации туляремийного микроба в селезенках на 4, 7, 14-е и 21-е сутки после инфицирования (рис. 1).

Из данных рис. 1 следует, что наличие гена *iglC*

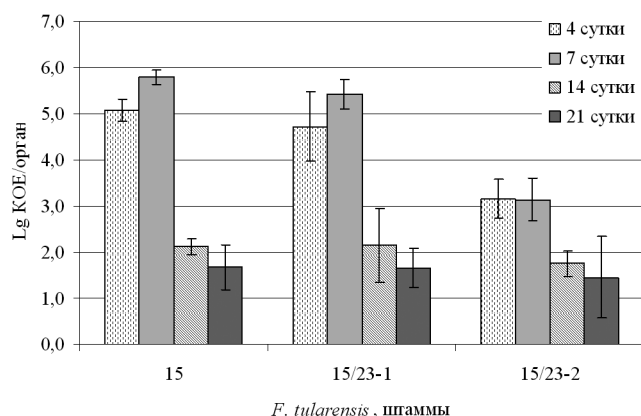


Рис. 1. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на способность к персистенции в организме мышей линии BALB/c. Результаты показаны как значение Lg КОЕ/орган с доверительным интервалом ( $p < 0,05$ )

позволяет штаммам *F. tularensis* 15 и 15/23-1, вводимым мышам в дозе  $1 \cdot 10^2$  КОЕ/мышь, не только сохранять жизнеспособность, но и размножаться в организме мышей в течение первых 7 сут. Количество бактерий штаммов 15 и 15/23-1 в селезенках на 14-е сутки уменьшалась в 1000 раз.

Модифицированный штамм *F. tularensis* без двух генов *iglC* даже при введении мышам бактериальных клеток в количестве  $1 \cdot 10^6$  КОЕ/мышь хотя и обнаруживался в организме животных вплоть до 21-х суток, но, видимо, не размножался.

У вакцинированных мышей была определена динамика нарастания концентрации антител к антигенам *F. tularensis*. Сыворотки были получены в период с 4-го по 28-й день после начала эксперимента и объединены по группам. Реципрокные титры антител в объединенных сыворотках различных групп мышей приведены на рис. 2, данные которого показывают, что иммунизация штаммом *F. tularensis* 15 (доза –  $1 \cdot 10^2$  КОЕ) приводила к более раннему (на 7-е сутки) появлению наибольшего уровня антител к суммарному антигену туляремиального микроба в титре 1:1200 по сравнению со штаммом *F. tularensis*

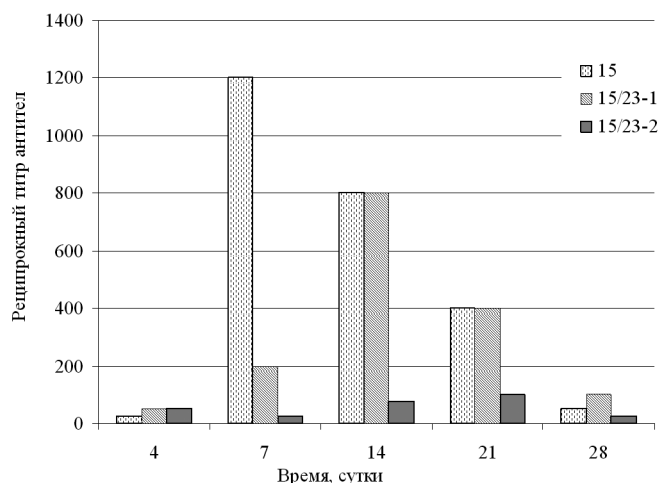


Рис. 2. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на динамику уровня индукции специфических иммуноглобулинов у вакцинированных мышей

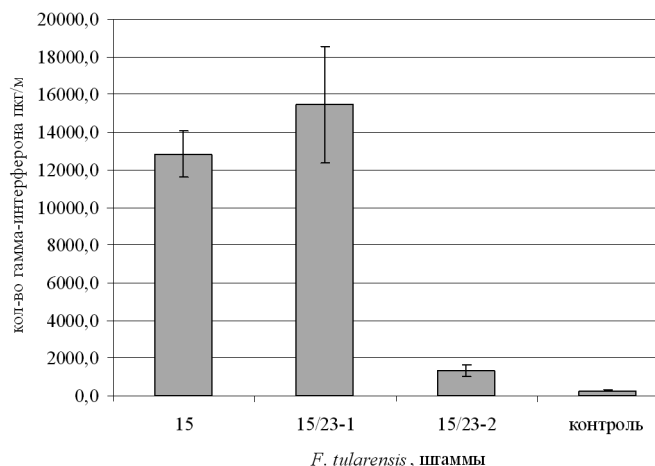


Рис. 3. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на индуцированный синтез гамма-интерферона спленоцитами мышей

15/23-1 (доза  $1 \cdot 10^2$  КОЕ), введение которого приводило к индукции наибольших значений титров антител 1:800 на 14-е сутки. Штамм *F. tularensis* 15/23-2 (доза  $1 \cdot 10^6$  КОЕ) индуцировал выработку слабого гуморального ответа – титры антител достигали наибольших значений 1:100 только на 21-е сутки.

Напряженность клеточного звена иммунитета у вакцинированных мышей оценивали по продукции гамма-интерферона спленоцитами в ответ на стимуляцию УЗД штамма *F. tularensis* 15 (рис. 3).

В группах мышей, вакцинированных штаммами *F. tularensis* 15 и 15/23-1 (дозы  $1 \cdot 10^2$  КОЕ), продукция гамма-интерферона превышала более чем в 10 раз продукцию гамма-интерферона спленоцитами, взятыми у мышей, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-2 (доза  $1 \cdot 10^6$  КОЕ). Это позволяет предполагать, что инактивация одной копии гена *iglC* не влияет на способность бактерий формировать спленоциты, активирующиеся при добавлении туляремиального антигена. В то же время отсутствие обеих копий гена *iglC* значительно снижает эту способность, что следует из низкого уровня синтеза гамма-интерферона. Величины  $LD_{50}$  и  $ED_{50}$  для мышей линии BALB/c исследуемых штаммов приведены в таблице.

Делеция одной копии гена в вакцинном штамме *F. tularensis* 15/23-1 при подкожном заражении мышей снижала вирулентность только в 10 раз, тогда как делеция обеих копий гена *iglC* делала штамм полностью авирулентным.

Вакцинный штамм без одной копии гена *iglC* защищал мышей от заражения вирулентными штаммами туляремиального микроба с эффективностью, характерной для родительского вакцинного штамма

Величины  $LD_{50}$  и  $ED_{50}$  на модели мышей линии BALB/c

| Штаммы <i>F. tularensis</i> | $LD_{50}$        | $ED_{50}$ для штамма <i>F. tularensis</i> 503 | $ED_{50}$ для штамма <i>F. tularensis</i> Schu |
|-----------------------------|------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 15 НИИЭГ                    | 79,0 (40÷110)    | 8,5 (1,8÷53,7)                                | 34,5 (13,8÷102,7)                              |
| 15/23-1                     | 794,0 (251÷3162) | 10,9 (2,8÷43,6)                               | 45,9 (18,8÷124,6)                              |
| 15/23-2                     | >10 <sup>9</sup> | Нет защиты                                    | Нет защиты                                     |



*F. tularensis* 15. Удаление обеих копий гена из вакцинного штамма приводило к исчезновению протективности, хотя наблюдалось удлинение средней продолжительности жизни (СПЖ) животных до 9,3 сут в случае заражения штаммом *F. tularensis* 503 и до 8,7 сут при заражении штаммом *F. tularensis* Schu по сравнению с контрольной группой (СПЖ – 5,6 и 5,2 сут соответственно).

Введение мышам сывороток, взятых через 49 сут от животных, иммунизированных как исходным штаммом *F. tularensis* 15 ( $3,5 \cdot 10^1$  КОЕ/мышь), так и его вариантами с одним ( $8 \cdot 10^1$  КОЕ/мышь) и двумя ( $1,3 \cdot 10^6$  КОЕ/мышь) инактивированными генами *iglC*, обеспечивало их стопроцентную защиту от последующего заражения 200 DCL штамма *F. tularensis* 15. Однако в случае заражения мышей, которым предварительно были введены иммунные сыворотки, вирулентными штаммами – 50 DCL *F. tularensis* 503 и 25 DCL *F. tularensis* Schu – имело место только увеличение СПЖ. В случае введения сывороток от животных, вакцинированных штаммом *F. tularensis* 15/23-2, эта величина составляла 8 и 7,14 сут соответственно, тогда как для животных, обработанных нормальной сывороткой СПЖ, равнялась 6,75 и 6,3 сут, а чистых животных – 6,0 и 5,8 сут соответственно.

Результаты проведенных нами экспериментов по оценке протективности вариантов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 без одной и двух копий генов *iglC* согласуются с высказанным ранее мнением о том, что для формирования протективного иммунитета необходимо размножение туляремии микроба в клетках иммунной системы [5]. Нами показано, что штамм *F. tularensis* 15 без двух копий генов *iglC* практически не способен к размножению в макрофагах, а также не способен индуцировать клеточный иммунитет и, как следствие, защищать животных от заражения вирулентными штаммами туляремии микроба. Введение высоких концентраций ( $1 \cdot 10^7$  КОЕ) бактерий штамма *F. tularensis* 15/23-2 мышам индуцировало формирование протективных специфических антител, которые позволяли животным выживать после заражения вакцинным штаммом, но не защищали их от природных изолятов туляремии микроба. Полученные результаты дополнительно подтверждают положение о ключевой роли клеточного иммунитета в защите от туляремийной инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 с.
2. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 4(102):66–7.
3. Conlan J.W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P.C.F., Wangxue C., House R.V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: Effects of host background and route of immunization. *Vaccine*. 2010; 28:1824–31.
4. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 222:273–80.
5. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
6. Twine S.M., Bystrom M., Chen W., Forsman M., Golovliov I.R., Johansson A., Kelly J., Lindgren H., Svensson K., Zingmark C., Conlan W., Sjöstedt A. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58 kDa protein is attenuated for virulence and an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(12):8345–52.

## References

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 58 p.
2. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khranov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 4(102):66–7.
3. Conlan J.W., Shen H., Golovliov I., Zingmark C., Oyston P.C.F., Wangxue C., House R.V., Sjöstedt A. Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: Effects of host background and route of immunization. *Vaccine*. 2010; 28:1824–31.
4. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 222:273–80.
5. Pechous R.D., McCarthy T.R., Zahrt T.C. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2009; 73(4):684–711.
6. Twine S.M., Bystrom M., Chen W., Forsman M., Golovliov I.R., Johansson A., Kelly J., Lindgren H., Svensson K., Zingmark C., Conlan W., Sjöstedt A. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58 kDa protein is attenuated for virulence and an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 2005; 73(12):8345–52.

## Authors:

Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

## Об авторах:

Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 15.08.13.

П.Ю.Попова, С.А.Бугоркова, Н.И.Микшис, А.П.Семакова, Ю.А.Попов, Т.Н.Щуковская

## ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У БИОМОДЕЛЕЙ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

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

Проведена оценка изменений в органах и тканях морских свинок в динамике иммуногенеза после однократной подкожной иммунизации протективным антигеном, выделенным из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>). Объектом гистологического исследования служили кусочки печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи из места введения препарата и органов лимфоидной системы – тимуса, селезенки, регионарных и отдаленных лимфатических узлов. Полутонкие парафиновые срезы исследуемого материала окрашивали раствором гематоксилина и эозина. Установлено, что наблюдаемые в первые 7 сут после иммунизации изменения обусловлены стресс-реакцией организма биомодели на введение препарата, бесследно проходящей в последующие сроки наблюдения. Выявлена функциональная активация клеток ретикулоэндотелиальной системы печени и органов центральной и периферической иммунной системы в форме нарастания гиперпластических процессов в период с 14-х по 27-е сутки, максимум которых приходился на 21-е сутки. Полученные данные подтверждают отсутствие выраженного повреждающего эффекта рекомбинантного протективного антигена на клетки и ткани макроорганизма и возможность его применения в качестве основного компонента химической сибиреязвенной вакцины.

*Ключевые слова:* сибирская язва, вакцина, протективный антиген, морфометрические исследования.

P.Yu.Popova, S.A.Bugorkova, N.I.Mikshis, A.P.Semakova, Yu.A.Popov, T.N.Shchukovskaya

## Pathomorphological Changes in Biomodels in Response to Recombinant Protective Anthrax Antigen Inoculation

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

Investigated have been the changes in organs and tissues of Guinea pigs, registered over immuno-genesis progression, after a single subcutaneous immunization with protective antigen, isolated from asporogenic recombinant *B. anthracis* 55 ΔTPA-1(Spo<sup>-</sup>) strain. Histological examination has been performed using liver, heart, kidney, adrenal, and skin fragments sampled from the site of inoculation, and organs of lymphoid system – thymus, spleen, regional and remote lymph glands. Semi-fine paraffin sections of the material under study have been stained with hematoxylin and eosin solution.

Established is the fact that changes, registered within 7 days after inoculation, are driven by stress-reaction of biomodels organism to the preparation administration, progressing without visible manifestations over the follow-up period of observation. Identified is the functional activation of cells of the liver reticuloendothelial system and organs of central and peripheral immune system by way of hyper-plastic process intensification within the period from 14<sup>th</sup> to 27<sup>th</sup> day, with an apex on the 21<sup>st</sup> one. The data obtained has substantiated the lack of an expressed damaging effect of the recombinant protective antigen on the cells and tissues of the macroorganism, as well as possibility of its application as one of the core components of the chemical anthrax vaccine.

Key words: anthrax, vaccine, protective antigen, morphometric investigations.

Иммунопрофилактика сибирской язвы является ключевым мероприятием, направленным на предупреждение возникновения и распространения инфекции. Основным компонентом существующих и конструируемых вакцин является высокоиммуногенная субъединица токсина *Bacillus anthracis* – протективный антиген [7, 12]. В большинстве зарубежных стран для вакцинации населения, имеющего высокий риск заражения возбудителем сибирской язвы, применяются лицензированные химические препараты. Американская вакцина Biothrax изготавливается из бесклеточного фильтрата бескапсульного токсигенного штамма *B. anthracis* V770-NP1-R. В Российской Федерации иммунизация против сибирской язвы проводится в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок с использованием живой аттенуированной сибиреязвенной вакцины. Существует также отечественная комбинированная

вакцина, состоящая из спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 и полученного из него протективного антигена. В качестве прототипа рекомбинантной химической сибиреязвенной вакцины в РосНИПЧИ «Микроб» был создан препарат, содержащий протективный антиген, выделенный из аспорогенного генно-инженерного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>). Ранее нами была изучена эффективность и иммуногенность препарата в экспериментах на различных лабораторных животных. Показано, что иммунитет, формирующийся при введении рекомбинантного протективного антигена, характеризуется высокими значениями титров специфических антител. Двукратная иммунизация протективным антигеном обеспечивает эффективную защиту экспериментальных животных от заражения диплоидным штаммом *B. anthracis* 71/12. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* при подкожном пути введения препарат не токсичен для мышей

линии BALB/c и морских свинок [5].

Цель данного исследования – охарактеризовать изменения в органах и тканях морских свинок, иммунизированных препаратом рекомбинантного протективного антигена, в динамике иммуногенеза.

### Материалы и методы

Исследования проводили на 18 морских свинках массой от 250 до 300 г. Биомodelей содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [3].

Протективный антиген выделяли из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>). Антиген очищали двухэтапной хроматографией [2]. Морских свинок, подкожно однократно иммунизированных 50 мкг препарата очищенного протективного антигена, умерщвляли (по 3 особи на срок) хлороформом через 1, 3, 7, 21 и 27 сут после иммунизации. Контролем служили интактные морские свинки. Для морфологического исследования были взяты кусочки печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи из места введения препарата, органов лимфоидной системы – тимуса, селезенки, регионарных (РЛУ) и отдаленных (ОЛУ) лимфатических узлов. Выполняли макрометрическое исследование, определяя массу и размеры органов подопытных животных. Гистологический материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Дальнейшую обработку проводили по стандартной методике, готовые полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином [1]. Гистологический материал просматривали в биологическом микроскопе Olympus CX31 с видеокамерой при увеличении в 40–200 раз. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситоморфометрической программы аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (версия 2.1.0.0), определяя количество клубочков в поле зрения среза почек, звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) в поле зрения среза печени, количество лимфатических фолликулов в лимфоидных органах, характеризуя их активность полуколичественным методом (в баллах от 0 до 3). За 0 баллов принимали отсутствие активности; 1 балл – слабо выраженная; 2 балла – умеренно выраженная; 3 балла – резко выраженная активность. Количество почечных телец (клубочков почек) в различном функциональном состоянии (полнокровие капиллярной сети, сморщенные клубочки, отек сосудистых петель) представляли в процентном отношении к клубочкам без видимых изменений.

### Результаты и обсуждение

Вакцинный процесс при иммунизации очищенным препаратом рекомбинантного протективного антигена моделировали на морских свинках, так как данный вид лабораторных животных широко при-

меняется для экспериментальных и доклинических характеристик разрабатываемых сибиреязвенных вакцин в зарубежных и отечественных исследованиях [4, 9, 10, 11]. Выбор иммунизирующей дозы, в 2 раза превышающей подобранную ранее экспериментальную дозу, обусловлен необходимостью оценить развитие возможных нежелательных реакций тканей и клеток макроорганизма.

По результатам исследования установлено, что подкожное введение рекомбинантного протективного антигена морским свинкам не вызывало гибели животных и не влияло на их общее состояние.

В месте введения препарата в первые сутки наблюдения отмечали незначительный отек подкожной клетчатки и очаговую инъекцию сосудов. При гистологическом исследовании на фоне умеренного отека и очагового полнокровия сосудов подкожной клетчатки выявляли небольшие участки лимфоцитарной инфильтрации дермы. К 3-м суткам после иммунизации изменений в месте введения не наблюдали, при гистологическом исследовании в тканях полностью исчезал экссудативно-инфильтративный компонент.

Общая стресс-реакция организма на введение испытуемого препарата заключалась в некотором снижении массы надпочечников в течение первых 3 сут наблюдения до  $(0,054 \pm 0,0100)$  г, в контроле –  $(0,095 \pm 0,04)$  г. При гистологическом исследовании отмечали умеренное расширение пучковой зоны с изменением ядерно-цитоплазматического соотношения у отдельных клеток, очаговое опустошение клеток клубочковой зоны и некоторое снижение феохромии мозгового вещества на фоне нормального соотношения коркового и мозгового вещества в органе. Изменения, характеризующие умеренное напряжение клеток, обеспечивающих синтез кортикостероидов, выброс минералокортикоидов на фоне незначительного «истощения» хромоаффинной системы, укладывались по объему, характеру, срокам их развития и угасания в картину стресс-реакции биомодели на вводимый препарат.

Со стороны паренхиматозных органов при макроскопическом исследовании за весь период наблюдения не отмечали грубых дистрофических изменений, инфильтративных процессов, резкого нарушения кровенаполнения сосудов. В период с 1-х по 7-е сутки при гистологическом исследовании регистрировали признаки умеренного функционального напряжения клеток паренхимы печени, почек, кардиомиоцитов на фоне очаговых явлений полнокровия сосудов.

В почках подопытных животных отдельные клетки эпителия извитых канальцев находились в состоянии гидропической дистрофии, в просвете дистальных канальцев обнаруживали клетки слущенного эпителия. У нескольких животных отмечали очаговую лимфоцитарную инфильтрацию стромы. Изменения со стороны гломерулярного аппарата характеризовались умеренным полнокровием капиллярных петель сосудистых клубочков почечных



телец (рис. 1). Количество почечных телец с полнокровием капилляров достигало у морских свинок 52 % (в контроле – 4–6 %) в 1-е сутки наблюдения, но постепенно снижалось к 7-м суткам и в дальнейшем не превышало 20 %. Описанные изменения гломерулярного аппарата не касались уменьшения количества функционально активных почечных телец в поле зрения среза. Во всех случаях этот показатель был даже несколько выше, чем у животных из группы интактного контроля и колебался от  $(7,9 \pm 3,2)$  до  $(6,4 \pm 2,38)$ , в контроле –  $(6,3 \pm 1,17)$ , на протяжении периода наблюдения.

В печени у лабораторных животных наблюдаемый в ранние сроки (1–3 сут) умеренный застой в системе циркуляции (внутридольковые синусоидальные гемокапилляры) и системе оттока (центральные вены) крови сочетался с функциональным напряжением светлых гепатоцитов центра печеночных долек, но к 7-м суткам функциональное состояние органа достоверно не отличалось от наблюдаемого у животных из группы интактного контроля. Интересной была реакция со стороны клеток Купфера (звездчатых ретикулоэндотелиоцитов), заключающаяся в их активации. Количество этих элементов увеличивалось в первые 7 сут в среднем в 3 раза и достигало  $(21,5 \pm 2,1)$ , а в последующие сроки составляло  $(13,0 \pm 1,29)$ , что превышало аналогичный показатель в группе интактного контроля  $(6,7 \pm 0,94)$  в 2 раза, свидетельствуя о функциональной активации ретикулоэндотелиальной системы.

Со стороны лимфоидных органов не отмечали угнетения их функции ни в одном случае. В ранние сроки (до 7-х суток) при макроскопическом исследовании не наблюдали резкой гипертрофии органов с выраженными проявлениями гиперплазии отдельных структур. Увеличение массы селезенки в 2 раза по отношению к аналогичному показателю у интактных животных и умеренную гиперплазию фолликулярных структур (появление зернистости) реги-

стрировали на 21-е сутки наблюдения. Изменения в регионарных лимфатических узлах у животных характеризовались планомерным увеличением массы органа в период с 3-х по 21-е сутки от  $(0,03 \pm 0,01)$  до  $(0,06 \pm 0,01)$  г с возвратом к значениям показателя у контрольных морских свинок на 27-е сутки –  $(0,025 \pm 0,005)$  г. Масса отдаленных лимфатических узлов также увеличивалась с 3-х по 27-е сутки от  $(0,035 \pm 0,005)$  до  $(0,045 \pm 0,01)$  г, данный показатель в 3 раза выше, чем у интактных животных  $(0,01 \pm 0)$  г.

В тимусе при гистологическом исследовании с 7-х по 27-е сутки со стороны лимфоидных элементов наблюдали умеренные гиперпластические процессы и относительную активацию митотической активности в мозговом веществе. Соотношение коркового и мозгового вещества оставалось нормальным.

Функциональное состояние органов периферической иммунной системы после введения животным протективного антигена, полученного из аспорогенного рекомбинантного штамма, укладывалось в картину иммуногенеза, что проявлялось последовательной активацией Т- и В-зон в них. В селезенке и лимфатических узлах у подопытных животных наблюдали умеренное нарастание пролиферативной активности от 1 до 3 баллов и изменение клеточного состава органов в период с 3-х по 27-е сутки. В целом реакция в лимфатических узлах заключалась в регистрации различной степени активации отдельных фолликулов (В-зон), появлении фолликулов со светлыми центрами, богатыми бластными формами клеток, увеличении количества митозов на фолликулах, наличии макрофагов, содержащих осколки ядер и умеренной гиперплазии паракортикальных (Т-) зон с преобладанием в них бластных форм клеток или смешанного клеточного состава (умеренное количество бластов, неактивированные лимфоциты и единичные зрелые плазматические клетки) начиная с 21-х суток (рис. 2). В мозговом веществе (мозговые тяжи) лимфатических узлов после 7-х

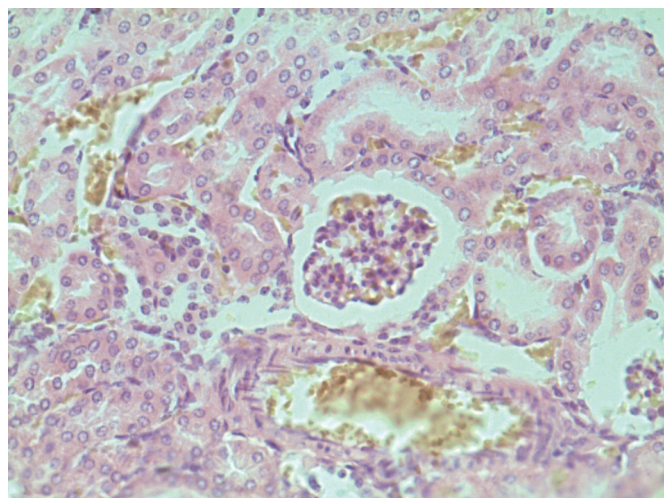


Рис. 1. Морская свинка. Почки. 1-е сутки после подкожного введения 50 мкг рекомбинантного протективного антигена. Очаговые дистрофические изменения эпителия извитых канальцев. Умеренное полнокровие капиллярных петель сосудистого клубочка почечного тельца. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 200$

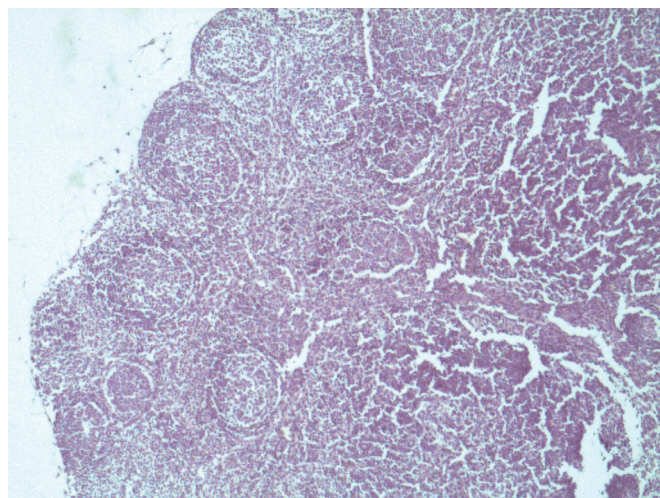


Рис. 2. Морская свинка. Регионарный лимфатический узел. 21-е сутки после подкожного введения 50 мкг рекомбинантного протективного антигена. Гиперпластические процессы в фолликулах и паракортикальных зонах. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение  $\times 40$

суток регистрировали появление незначительного количества эозинофильных лейкоцитов. В селезенке нарастание гиперпластической активности в Т- и В-зонах отмечали после 7-х суток. Количество функционально активных фолликулов в срезе органа увеличивалось к 27-м суткам до 20, в то время как в контроле обнаруживали до 8 неактивных фолликулов на срез. Начиная с 21-х суток у животных регистрировали появление в селезеночных тяжах умеренного количества эозинофильных лейкоцитов, что, вероятно, свидетельствовало о проявлениях аллергического порядка. Данный факт может быть обусловлен особенностями взаимодействия рекомбинантного протективного антигена с толл-подобными рецепторами врожденного иммунитета, так как известно, что в зависимости от дозы лиганда происходит стимуляция Th2-лимфоцитов, что ведет к развитию аллергического воспаления [8]. Важным подтверждением участия рецепторов врожденного иммунитета в развитии аллергии являются результаты опытов на Toll-дефицитных мышах [6], поэтому получение окончательного ответа на возникший вопрос составляет перспективу наших дальнейших исследований.

Таким образом, однократное подкожное введение морским свинкам препарата рекомбинантного протективного антигена в дозе 50 мкг не приводило к развитию грубых морфологических изменений, а наблюдаемые на микроскопическом уровне изменения проходили к 7-м суткам. По результатам оценки реакции иммунокомпетентных органов регистрировали умеренные проявления иммуногенеза к 21-м суткам наблюдения, что позволяет рекомендовать применение протективного антигена, полученного из аспорогенного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo<sup>-</sup>), в качестве основного компонента прототипа химической сибиреязвенной вакцины.

Работа выполнена по государственному контракту № 40-Д/1 от 29.07.12 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: ООО «Издательство СпецЛит»; 2010. 96 с.
2. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Шулепов Д.В., Новикова Л.В., Попов Ю.А., Щуковская Т.Н., Дроздов И.Г., Кутырев В.В. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2007; 3:15–21.
3. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная академия; 1996.
4. Основные требования к вакцинным штаммам сибиреязвенного микроба для иммунизации людей. Методические указания МУ 3.3.1.1112-02. М., 2002. 47 с.

5. 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. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):84–7.
6. Bashir M.E., Louie S., Shi H.N., Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J. Immunol.* 2004; 172:6978–87.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1):221–36.
8. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196(12):1645–51.
9. Fellows P., Linscott M., Ivins B., Pitt M., Rossi C., Gibbs P., Friedlander A. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine.* 2001; 19:3241–7.
10. Goossens P. Animal models of human anthrax: the quest for the Holy Grail. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):467–80.
11. Ivins B., Fellows P., Nelson G. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine.* 1994; 12(10): 872–4.
12. Scorpio A., Blank T., Day W., Chabot D. Anthrax vaccines: Pasteur to present. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:2237–48.

#### References

1. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamental Principles of Histological Technique]. St. Petersburg; 2010. 96 p.
2. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Shulepov D.V., Novikova L.V., Popov Yu.A., Shchukovskaya T.N., Drozdov I.G., Kutyrav V.V. [Immunogenicity of recombinant bacilli strains with cloned gene responsible for *Bacillus anthracis* protective antigen synthesis]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 3:15–21.
3. National Research Council. [Guidelines on care and use of laboratory animals]. Washington: National Academy; 1996.
4. [Basic requirements to anthrax microbe vaccine strains used for immunization of humans]. Methodological recommendations. MR 3.3.1.1112-02. M.; 2002. 47 p.
5. 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]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):84–7.
6. Bashir M.E., Louie S., Shi H.N., Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J. Immunol.* 2004; 172:6978–87.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1):221–36.
8. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196(12):1645–51.
9. Fellows P., Linscott M., Ivins B., Pitt M., Rossi C., Gibbs P., Friedlander A. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine.* 2001; 19:3241–7.
10. Goossens P. Animal models of human anthrax: the quest for the Holy Grail. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):467–80.
11. Ivins B., Fellows P., Nelson G. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine.* 1994; 12(10): 872–4.
12. Scorpio A., Blank T., Day W., Chabot D. Anthrax vaccines: Pasteur to present. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:2237–48.

#### Authors:

Popova P.Yu., Bugorkova S.A., Mikshis N.I., Semakova A.P., Popov Yu.A., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Попова П.Ю., Бугоркова С.А., Микшис Н.И., Семакова А.П., Попов Ю.А., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 23.09.13.



А.В.Матюхин<sup>1</sup>, А.Н.Матросов<sup>2</sup>, А.М.Поршаков<sup>2</sup>, А.А.Кузнецов<sup>2</sup>

# **МУХА-КРОВОСОСКА *ICOSTA ARDEAE* – РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ В ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА**

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова» РАН, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В сообщении приведены материалы о распространении мухи-кровососки *Icosta ardeae* в России и прилежащих странах. На основании анализа литературных данных, коллекционных материалов и результатов собственных исследований констатируется, что этот вид представлен в нашей фауне более широко, чем это предполагалось ранее. Эта муха паразитирует на 11 видах птиц из отрядов аистообразных, ржанкообразных, журавлеобразных и курообразных. Чаще всего *I. ardeae* встречалась на большой выпи – 43 % сборов, ИО 5,9. Высказано предположение о роли этого вида и других гиппобосцид в сохранении и распространении вируса Западного Нила. Изучение этой группы насекомых может помочь в выявлении механизмов распространения и укоренения природных очагов инфекционных болезней.

**Ключевые слова:** мухи-кровососки, переносчики возбудителей инфекционных болезней, лихорадка Западного Нила.

A.V.Matyukhin<sup>1</sup>, A.N.Matrosov<sup>2</sup>, A.M.Porshakov<sup>2</sup>, A.A.Kuznetsov<sup>2</sup>

## **Blood-Sucking Fly *Icosta ardeae* – Its Distribution and Probable Role in Circulation of West-Nile FeverVirus**

<sup>1</sup>A.N.Severtsov Institute for Problems of Ecology and Evolution, RAS, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Communication comprises materials on distribution of blood-sucking fly, *Icosta ardeae*, in the territory of the Russian Federation and bordering states. Based on the analysis of literature data, collection assets, and personal investigations assumed has been the fact that this species is more widely spread in the local fauna than it was anticipated earlier. The fly parasitizes on the birds of 11 species, orders - ciconiiformes (storks), shore (wading) birds, Gruiformes, and fowl-like birds (Galliformes). More often *I. ardeae* is seen among bitterns – 43 % of the findings, abundance index – 5,9. Therewith, put forward is the suggestion concerning the role of the species and other Hippoboscidae in the process of persistence and distribution of West-Nile fever virus. Studies of this group of insects can be of use for identification of mechanisms that benefit natural foci extension and development as regards various infectious diseases.

**Key words:** blood-sucking flies, vectors of infectious disease agents, West-Nile fever.

В последние два десятилетия во всем мире наблюдается активное расширение нозоареала лихорадки Западного Нила (ЛЗН) – особо опасного вирусного заболевания с трансмиссивным механизмом передачи. На территории Российской Федерации отмечается рост заболеваемости ЛЗН, неуклонно увеличивается число административных субъектов, где выявляются больные или обнаруживается циркуляция вируса Западного Нила (ВЗН) в популяциях животных [3, 5]. Носителями ВЗН выступают птицы околотовного и антропогенного комплексов, переносчиками – кровососущие членистоногие [2]. Высокие темпы распространения этого особо опасного заболевания требуют глубокого изучения условий его циркуляции в природных и антропогенных биоценозах. Предполагается, что одними из основных носителей вируса являются представители семейства цаплевых (Ciconiiformes, Ardeidae). На этих птицах паразитируют, наряду с иксодовыми и гамазовыми клещами, мухи-кровососки (Diptera,

Hippoboscidae), об эпизоотологическом значении которых известно очень мало [4]. На территории России и сопредельных стран наиболее часто на аистообразных встречается кровососка *Icosta ardeae* [1]. Эта муха широко распространена по всему старому свету: в центральной и южной Европе, на большей части юго- и юго-востока Азии, а также в Африке, на Мадагаскаре и островах Тихого океана. На американском континенте на птицах паразитирует кровососка *I. americana*, конспецифичная нашему виду *I. ardeae*. В последние годы американскими исследователями получены данные об активном участии *I. americana* в циркуляции ВЗН: сначала были зарегистрированы серологические находки маркеров вируса у этих кровососок, затем у них же нашли и самого возбудителя [6, 7]. В этой связи вполне логично предположить, что и мухи *I. ardeae* могут играть определенную роль в жизненном цикле ВЗН на территории Евразии.

Сведения о распространении кровососки *I. arde-*



ae в Российской Федерации и сопредельных странах достаточно скудны. По мнению Т.Р.Досжанова [1] эта муха в фауне Палеарктики является случайным элементом. Но более пристальное изучение имеющихся материалов по этому вопросу позволяет усомниться в таком утверждении. В нашем распоряжении имеются литературные данные о распространении *I. ardeae* и сведения о сборах этих кровососок, хранящихся в зоологических коллекциях музеев Московского государственного университета и Зоологического института РАН (Санкт-Петербург). Материал был добыт на территории России, Казахстана, Армении, Грузии и Азербайджана.

На основании анализа этих материалов можно заключить, что *I. ardeae* широко распространена на территории России и сопредельных стран. Эта кровососка была найдена на 11 видах птиц, относящихся к четырем отрядам: на восьми видах аистообразных (большая выпь, малая выпь, серая цапля, большая белая цапля, желтая цапля, кваква, караваяка, колпица), на одном виде ржанкообразных (лесной дупель), журавлеобразных (камышница) и курообразных (рябчик). Чаще всего муху обнаруживали на большой выпи: 9 сборов (43 %) – 53 кровососки. Реже находили ее на серой цапле: 2 сбора – 15 мух, и малой выпи: 2 сбора – 3 мухи, в то время как на остальных в видах птиц отмечали единичные находки кровососки.

В настоящее время проявляется устойчивая тенденция к увеличению уровня заболеваемости ЛЗН и расширению ареала вируса на территории нашей страны и за рубежом. В этой связи большое значение приобретают поиски носителей и переносчиков ВЗН, которые могут участвовать в устойчивой циркуляции вируса и регулярном заносе инфекции. При этом возможно также формирование вторичных природных очагов ЛЗН, связанных с переживанием возбудителя в организме кровососущих членистоногих в холодный период года. У *I. ardeae*, впрочем как и у других видов мух-кровососок, паразитирующих на птицах, развитие личинки происходит в теле самки, в связи с чем можно предположить, что вирус лихорадки Западного Нила может передаваться трансвариально и трансфазово. Специальные исследования этой группы насекомых (изучение фауны, распределения и численности кровососок, лабораторные исследования мух) могут пролить свет на решение проблемы природной очаговости ЛЗН и других арбовирусных инфекций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Досжанов Т.Н. Мухи-кровососки (Diptera, Hippoboscidae) Палеарктики. Алматы; 2003. 277 с.
2. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. *Вопр. вирусол.* 2000; 2:4–9.
3. Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Пашанина Т.П. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):10–2.
4. Матюхин А.В. Паразитологические исследования птиц: мухи-кровососки (Hippoboscidae) Восточной Европы. В кн.: Биоразнообразие и экология паразитов. *Труды центра паразитологии.* М.: Наука; 2010. Т. 46. С. 132–45.
5. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смолянский В.П., Антонов В.А., Мананков В.В., Погасий Н.И., Злепко А.В., Чайка А.Н., Крюкова Т.П., Савченко С.Т., Жуков К.В. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):38–41.
6. Farajollahi A., Crans V.J., Nickerson D., Bryant P., Wolf B., Glaser F., Andreadis T.G. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2005; 21(4):474–6.
7. Ganez A.Y., Baker I.K., Lindsay R., Dibbernardo A., McKeever K., Hunter B. West Nile virus outbreak in North American owls, Ontario. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 10(12):2135–42.

## References

1. Doszhanov T.N. [Blood-Sucking Flies (Diptera, Hippoboscidae) of Palearctic. Almaty; 2003. 277 p.
2. L'vov D.K. [West-Nile fever]. *Vopr. Virusol.* 2000; 2:4–9.
3. L'vov D.K., Savchenko S.T., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V., Pashanina T.P. [Epidemiological situation and prognostication of the West Nile fever morbidity in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):10–2.
4. Matyukhin A.V. [Parasitological Investigations of Birds: Blood-Sucking Flies (Hippoboscidae) of the Eastern Europe]. In: [Biodiversity and ecology of parasites. *Proc. Center Parazitol.*] M.: Nauka, 2010. Vol. 46. P. 132–45.
5. Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V., Smelyansky V.P., Antonov V.A., Manankov V.V., Pogasiy N.I., Zlepko A.V., Chaika A.N., Kryuchkova T.P., Savchenko S.T., Zhukov K.V. [Dissemination of the West Nile fever in the Russian Federation and in the world in 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):38–41.
6. Farajollahi A., Crans V.J., Nickerson D., Bryant P., Wolf B., Glaser F., Andreadis T.G. Detection of West Nile virus RNA from the louse fly *Icosta americana* (Diptera: Hippoboscidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2005; 21(4):474–6.
7. Ganez A.Y., Baker I.K., Lindsay R., Dibbernardo A., McKeever K., Hunter B. West Nile virus outbreak in North American owls, Ontario. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 10(12):2135–42.

## Authors:

Matyukhin A.V. A.N.Sevrtsov Institute for Problems of Ecology and Evolution. 33, Leninsky Av., Moscow, 119071, Russian Federation. E-mail: amatyukhin@rambler.ru

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

## Об авторах:

Матюхин А.В. Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН. Российская Федерация, 119071, Москва, Ленинский проспект, 33. E-mail: amatyukhin@rambler.ru

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

Поступила 30.10.12.

В.Г.Пушкарь, М.Я.Кулаков

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИММУНОСОРБЕНТОВ С МАГНИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Предложен композиционный магнитный иммуносорбент на основе вермикулита, позволяющий определять с высокой чувствительностью и специфичностью наличие возбудителя сапа в объектах внешней среды. Разработан вариант твердофазного магнитного хемилюминесцентного иммуноанализа проб, содержащих клетки возбудителя сапа. Чувствительность метода для определения клеток возбудителя сапа достигала  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл при сохранении высокой специфичности. Эксперименты по выявлению возбудителя сапа в пробах с садовой почвой позволяют рекомендовать использование композиционных магноиммуносорбентов при мониторинге объектов внешней среды на предмет контаминации различными микроорганизмами и для проведения индикации на зараженность возбудителями особо опасных инфекций.

*Ключевые слова:* магнитный иммуносорбентный хемилюминесцентный анализ.

V.G.Pushkar', M.Ya.Kulakov

## Improvement of Manufacturing Procedure as Regards Immunosorbents with Magnetic Properties for Chemiluminescent Assay

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Put forward is a composite magnetic vermiculite-based immunosorbent that allows for the detection of melioidosis agent in ambient environment objects, characterized by high sensitivity and specificity. Developed is an alternative variant of chemiluminescent enzyme-linked magnetic immunosorbent assay to analyze samples containing melioidosis agent cells. Sensitivity of the technique runs up to  $10^2$  –  $10^3$  mc/ml alongside with high specificity. Additionally, experimental works on melioidosis detection in soil samples has testified to the usage of the composite magnetic immunosorbents for ambient environment monitoring against contamination with various microorganisms and for the purpose of indication of particularly dangerous infection agents.

*Key words:* chemiluminescent enzyme-linked magnetic immunosorbent assay.

Для повышения достоверности и чувствительности различных методов иммуноанализа применяется предварительная концентрация материала в пробах (пробоподготовка). Использование магнитоуправляемых иммуносорбентов (МИС) в твердофазных методах иммуноанализа дает возможность одновременно провести специфическое концентрирование возбудителя и легко отмыть его от загрязнений, используя свойство этих материалов фиксироваться на поверхности в магнитном поле. Ранее нами была разработана технология приготовления магнитных полиакриламидных микрогранул в потоке газообразного азота и на их основе созданы тест-системы выявления антигенов возбудителей особо опасных инфекций различными методами [4, 7].

Целью данной работы стало повышение качества сорбента с магнитными свойствами, а также расширение ассортимента носителей для приготовления иммуносорбентов.

В работе был использован вспученный вермикулит марки 150 (ТУ 2111-001-67642096-2010), получаемый из высокогидратированной биотитовой слюды обжигом при 800–900 °С, который широко применяется в строительстве для повышения теплоизоляционных свойств различных конструкций. Он является сыпучим, легким, биологически стойким, негорючим, экологически чистым и достаточно дешевым

материалом (3000–4000 руб/м<sup>3</sup>). При необходимости его можно размельчить до требуемой степени дисперсности, что позволяет нормировать размеры частиц иммуносорбента. В качестве магнитного материала использовали мелкодисперсную безводную окись железа FeO (ГОСТ 4173-77).

В работе использовали взвеси 24-суточной агаровой культуры *Burkholderia mallei* 10230 и *Burkholderia cepacia* 423 из коллекционного центра ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ, убитые формалином. После контроля стерильности взвеси применяли в опытах для приготовления проб и иммунизации животных при получении иммунных сывороток.

Иммунизацию экспериментальных животных-продуцентов (кроликов и козлов) проводили многократно, циклами из четырех инъекций возрастающих доз антигена в смеси с адьювантом Фрейнда с интервалами в 6–7 дней. Цикл иммунизации повторяли через 3–4 недели. Иммуноглобулины получали из иммунных сывороток трехкратным переосаждением 20 % раствором полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000–7000.

Приготовление магнитного сорбента проводили по разработанной нами методике [6]: вермикулит размельчали до размеров частиц 5–50 мкм, смешивали 1,5 г вермикулита и 2 г магнитного порошка окиси железа, добавляли 10 мл насыщенного раство-

ра коллоидной серы в бензоле. Смесь выдерживали необходимое время и высушивали при температуре 20–25 °С под тягой без нагрева.

Определение оптимального времени инкубации в растворе коллоидной серы проводили по следующей методике: выдерживали 15, 30, 60 и более минут при температуре 20–25 °С и далее полученный сорбент суспендировали в 50 мл 3,5 % раствора декстрана Т-20 в течение 60 мин при температуре 20–25 °С, затем высушивали при температуре 100–110 °С в течение 30 мин. Препарат растирали в ступке или размалывали на мельнице и просеивали через сито с величиной ячеек 130 мкм.

К 200 мг полученного магнитного сорбента добавляли 8 мл 0,2 М раствора перйодата натрия (рН 7,2) и инкубировали на магнитной мешалке при температуре 20–25 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 10 мл 0,64 М раствора этиленгликоля, после чего инкубировали 1 ч при температуре 20–25 °С и промывали трижды 0,1 М раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,2).

К 200 мг активированного магнитного сорбента добавляли 0,5 мл сапных иммуноглобулинов с концентрацией белка 3–4 мг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере при рН 9,5. Взвесь инкубировали в течение 60 мин при температуре 20–25 °С. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок несколько раз промывали 0,15 М раствором хлорида натрия до 0 экстинкции на спектрофотометре. Готовили 10 % суспензию иммуносорбента в том же растворе. Определение специфической емкости проводили методом хемилюминесцентного анализа в нашей модификации.

В опытные и контрольные пробирки вносили по 0,05 мл 10 % суспензии приготовленных сапных магнитных иммуносорбентов, затем в опытные пробирки вносили по 0,05 мл взвеси клеток возбудителя сапа в концентрациях от  $10^7$  до  $10^2$  м.к./мл, а в контрольные пробирки – по 0,05 мл промывочного раствора. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Удаляли надосадок из пробирок и трижды отмывали промывочным раствором, используя для седиментации постоянный магнит. Во все пробирки вносили по 0,05 мл рабочего раствора конъюгата пероксидазы хрена со специфическими иммуноглобулинами, в который предварительно был добавлен бычий сывороточный альбумин из расчета 10 мкг на 1 мл. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин, удаляли надосадок из пробирок и отмывали промывочным раствором 5–6 раз. Во все пробирки вносили по 0,05 мл 1 % раствора люминола и по 0,05 мл перекиси водорода в разведении 1:1000 и проводили измерение на люминометре 1250 (LKB, Швеция). Специфическую емкость выражали в условных единицах (у.е.) – отношение уровня полезного сигнала при максимальном насыщении матрицы специфическим антигеном к уровню контроля. В качестве контроля использовали тот же иммуносорбент без его инкубации со специфическим антигеном. На всех этапах отделение им-

муносорбента из жидкости проводили методом седиментации при помощи постоянного магнита.

В результате выполнения работы нами был предложен способ приготовления магнитных иммуносорбентов на основе вермикулита с использованием серы.

При определении оптимального времени инкубации иммуносорбента в растворе коллоидной серы было установлено снижение его качественных характеристик при экспозиции 15 и 30 мин. Так, специфическая емкость иммуносорбента снижалась до 7 у.е., а чувствительность ухудшалась до  $10^4$  м.к./мл. Увеличение времени инкубации более 60 мин не изменяло характеристик иммуносорбента и поэтому оказалось нецелесообразным. Таким образом, оптимальное время инкубации матрицы в растворе коллоидной серы составило 60 мин.

Предложенные иммуносорбенты были использованы в модифицированном нами хемилюминесцентном методе, который позволил определять клетки сапного микроба в более низких концентрациях, чем в традиционном твердофазном иммуноферментном анализе с использованием полистироловых планшетов. Результаты измерений показали, что чувствительность описанного метода для определения клеток возбудителя сапа достигала  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл при сохранении высокой специфичности. Добавление в пробу суспензии садовой почвы (до 10 %) практически не влияло на результаты измерений. Соотношение уровня полезного сигнала к контрольному при насыщении матрицы гомологичным антигеном достигало 9–11 у.е.

Определение клеток сапного микроба описанным методом проводили трижды для каждой концентрации, и полученные результаты обрабатывали статистически. Сравнение с известными носителями для магнитного иммуноанализа позволило сделать вывод о том, что предложенные МИС обладают высокими иммунохимическими характеристиками как по чувствительности, так и по специфической емкости. Проведенные эксперименты по выявлению возбудителя сапа в пробах с садовой почвой позволяют рекомендовать их для практической работы по мониторингу объектов внешней среды на предмет контаминации различными микроорганизмами и для проведения индикации на зараженность возбудителями особо опасных инфекций.

Использование композиционных сорбентов повышает специфичность препаратов, тем самым повышая надежность и достоверность эпидемиологического обследования объектов внешней среды на содержание инфекционных агентов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций. При этом в 1,5–2 раза повышается уровень специфической активности по сравнению с ранее предложенными магнитными иммуносорбентами, описанными в литературе [3].

Перспективность выбранного направления подтверждается разработками других НИИ, в частности Ставропольским НИПЧИ, где успешно проводятся



научно-исследовательские работы по совершенствованию МИС и методик работы с ними в различных видах иммуноанализа, в том числе по мониторингу возбудителей опасных бактериальных и вирусных заболеваний в объектах внешней среды [1, 2]. Выступая в качестве твердой фазы, магнитные сорбенты нашли применение в иммунофлуоресцентном, иммуноферментном, радиоиммунном анализе, а также для селективного концентрирования материала в молекулярно-генетических (ПЦР) и других видах анализов [5].

Магнитоуправляемые иммуносорбенты, сохраняя возможность активного концентрирования материала, позволяют легко решить проблему их отделения из реакционных сред, сокращают время проведения иммунохимических анализов за счет эффективного перемешивания твердой фазы в переменном магнитном поле. Это, в свою очередь, открывает новые перспективы для использования средств современной автоматики, способной повысить достоверность и чувствительность твердофазных методов иммуноанализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко В.И., Львов Д.К., Жарникова И.В., Василенко Н.Ф., Дерябин П.Г., Левченко Н.В., Антоненко А.Д., Орлова Т.Н., Исаева Е.И., Ботиков А.Г., Таран А.В., Жарникова Т.В. Диагностическая тест-система для выявления вируса гриппа птиц А/Н5N1. Патент 2339694 РФ, опубл. 27.11.08 г. Бюл. № 33.
2. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Жданова Е.В., Жарникова Т.В. Афанасьева Е.Е., Орлова Т.Н., Ефременко Д.В., Афанасьев Н.Е., Лаврешин М.П., Левченко Н.В., Семирчева А.А., Курчева С.А., Бабий А.М. Разработка и применение иммобилизованных систем для экспресс-диагностики различных заболеваний. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2008; 2(22):180–4
3. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев В.И., Бинатова В.В. Способ получения иммуносорбента (варианты). Патент 2138813 РФ, опубл. 27.09.99 г. Бюл. № 21.
4. Климова И.М., Ефременко В.И., Пушкар В.Г. Магнитный

иммуноферментный анализ антигенов *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол.* 1989;7:62–6.

5. Левченко Н.В., Ефременко В.И. Экспресс-диагностика вируса гриппа птиц в объектах окружающей среды, содержащих патоген в низких концентрациях. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2011; 1(21): 46–9.

6. Пушкар В.Г., Тихонов Н.Г., Васильев В.П., Климова И.М. Способ получения иммуносорбента. Патент 2192013 РФ, опубл. 27.10.02 г. Бюл. № 30.

7. Пушкар В.Г., Ефременко В.И., Климова И.М., Гавенский С.Д., Трофимов Е.Н. Приготовление и применение магнитных сорбентов для изучения антигенов микроорганизмов. *Журн. микробиол. эпидемиол и иммунобиол.* 1985;12:30–5.

#### References

1. Efremenko V.I., L'vov D.K., Zharnikova I.V., Vasilenko N.F., Deryabin P.G., Levchenko N.V., Antonenko A.D., Orlova T.N., Isaeva E.I., Botikov A.G., Taran A.V., Zharnikova T.V. [Diagnostic test-system for avian flu virus (A/H5N1) detection]. RF Patent 2339694.
2. Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Efremenko V.I., Zhdanova E.V., Zharnikova T.V., Afanas'eva E.E., Orlova T.N., Efremenko D.V., Afanas'ev N.E., Lavreshin M.P., Levchenko N.V., Semircheva A.A., Kurcheva S.A., Babii A.M. [Development and implementation of immobilized systems for rapid express-diagnostics of various diseases]. *Vest. Ros. Voenno-Med. Akad.* 2008; 2(22): 180–4.
3. Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Efremenko V.I., Afanas'ev V.I., Binatova V.V. [Method of immunosorbent manufacturing (variants)]. RF Patent 2138813.
4. Klimova I.M., Efremenko V.I., Pushkar' V.G. [Magnetic immunosorbent analysis of *Yersinia pestis* antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1989; 7:62–6.
5. Levchenko N.V., Efremenko V.I. [Express-diagnostics of avian flu virus in ambient environment objects containing the pathogen in low amounts]. *Medit. Vestnik Severn. Kavkaza*. 2011; 1(21):46–9.
6. Pushkar' V.G., Tikhonov N.G., Vasil'ev V.P., Klimova I.M. [Method of immunosorbent production]. RF Patent 2192013.
7. Pushkar' V.G., Efremenko V.I., Klimova I.M., Gavensky S.D., Trofimov E.N. [Production and application of magnetic immunosorbents for studies of microorganism antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 12:30–5.

#### Authors:

Pushkar' V.G., Kulakov M.Ya. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

#### Об авторах:

Пушкар В.Г., Кулаков М.Я. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.10.13.

Редакционный совет и редакционная коллегия  
научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют

#### с 85-летием

**Адамова Алексея Константиновича** – доктора медицинских наук, профессора,  
главного научного сотрудника лаборатории патогенных вибрионов Российского  
научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

#### с 75-летием

**Попова Вячеслава Петровича** – зоолога высшей квалификационной категории  
эпидемиологического отдела Противочумного центра Роспотребнадзора

и желают им больших творческих успехов, здоровья и благополучия