

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 1968 году

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

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

Выпуск 4

2014

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
А.В.Осин, канд. биол. наук
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор
А.В.Топорков, докт. мед. наук
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор
С.А.Щербакоева, докт. биол. наук
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор

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

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», 2014

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

2014, 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 RAS,
Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Board

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

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 S.V., Doctor of Biological Science, Professor (Sergiev Possad)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Corresponding Member
of the RAS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
Kutyrev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Saratov)
Lvov D.K., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Motin V.L., Ph. D., Professor (Galveston, USA)
Onishchenko G.G., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Rakin A.V., Ph. D. (Munich, Germany)
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Skurnik M., Professor (Helsinki, Finland)

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. 2014. Вып. 4. 1–94

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

Подписано в печать 01.12.14. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,5. Гарнитура Таймс. Заказ 1496
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Попова А.Ю., Сафронов В.А., Магасуба Н.Ф., Уткин Д.В., Одинок Г.Н., Пьянков О.В., Сергеев А.С., Боднев С.А., Кабанов А.С., Куклев В.Е., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Никифоров К.А., Щербакова С.А., Терновой В.А., Агафонов А.П., Михеев В.Н., Кутырев В.В. Организация и проведение диагностических исследований на базе мобильного комплекса специализированной противозидемической бригады в Республике Гвинея в период эпидемии лихорадки Эбола в 2014 году

5

Эпидемиология

Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы

9

Кириллов В.Б., Кириллова С.Л., Борисевич С.В., Лукин Е.П., Грабарев П.А. Прогнозирование социально-экономического ущерба от вспышек инфекционных болезней на примере Крымской геморрагической лихорадки

17

Низоленто Л.Ф., Бачинский А.Г. Универсальная модель локальных эпидемий и ее использование для оценки ресурсной готовности Новосибирской области к отражению биотеррористической атаки

21

Носков А.К., Трушина Ю.Н., Туранов А.О., Адельшин Р.В., Хаснатинов М.А., Трухина А.Г., Андаев Е.И. Клинико-эпидемиологические особенности иксодовых клещевых боррелиозов в Забайкальском крае

25

Сунцов В.В., Сунцова Н.И., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Данг Туан Дат, Лыонг Тхи Мо, Слудский А.А., Куклев В.В., Тарасов М.А., Касьян И.А., Майоров Н.В., Астахова Т.С. Антропоургические очаги чумы Вьетнама: прошлое и настоящее

29

Микробиология, диагностика

Билько Е.А., Гаранина С.Б., Миронова Н.И., Яковлев С.А., Щербакова С.А. Результаты изучения генетической гетерогенности РНК-изолятов хантавирусов, выделенных на территории Саратовской области

36

Грачева И.В., Осин А.В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов

39

Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербакова С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов

43

Popova A.Yu., Safronov V.A., Magasuba N.F., Utkin D.V., Odinokov G.N., P'yankov O.V., Sergeev A.S., Bodnev, S.A., Kabanov A.S., Kuklev V.E., Lopatin A.A., Razdorsky A.S., Nikiforov K.A., Shcherbakova S.A., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Mikheev V.N., Kutyrev V.V. Management and Performance of Diagnostic Investigations on the Platform of the Specialized Anti-Epidemic Team Mobile Complex During EVD Epidemics in 2014 in the Republic of Guinea

Epidemiology

Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and Epizootiological Peculiarities of Plague Manifestations in the Gorno-Altai High-Mountain (Sailyugemsky) Natural Plague Focus

9

Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V., Lukin E.P., Grabarev P.A. Forecasting of the Socio-Economic Damage Resulting from Outbreaks of Infectious Diseases, by the Example of Crimean Hemorrhagic Fever

17

Nizolenko L.F., Bachinsky A.G. Universal Local Epidemic Model and Its Usage in the Assessment of Novosibirsk Region Resource Preparedness to a Bioterrorist Attack

21

Noskov A.K., Trushina Yu.N., Turanov A.O., Adel'shin R.V., Khasnatinov M.A., Trukhina A.G., Andaev E.I. Clinical-Epidemiological Peculiarities of the Tick-Borne Borrelioses Registered in the Trans-Baikal Territory

25

Suntsov V.V., Suntsova N.I., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Dang Tuan Dat, Lyong Thi Mo, Sludsky A.A., Kouklev E.V., Tarasov M.A., Kas'yan I.A., Mayorov N.V., Astakhova T.S. Anthropourgic Foci of Plague in Vietnam: Past and Present

29

Microbiology, Diagnostics

Bil'ko E.A., Garanina S.B., Mironova N.I., Yakovlev S.A., Shcherbakova S.A. Results of Studies of Genetic Heterogeneity in Hantavirus RNA-Isolates, Found in the Territory of the Saratov Region

36

Gracheva I.V., Osin A.V. Low-Temperature Conservation of Collection Cholera Vibrio Strains

39

Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglozin E.G., Kuklev V.E., Odinokov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of Laboratory Diagnostics and Molecular-Genetic Characterization of the Isolated Strains

43

Оглодин Е.Г., Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Определение геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов 52

Стовба Л.Ф., Лебедев В.Н., Петров А.А., Кулиш В.С., Борисевич С.В. Диагностика ближневосточного респираторного синдрома человека..... 56

Биотехнология, иммунология

Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Перепелица А.И., Еремин С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Волох О.А., Гаева А.В., Ливанова Л.Ф. Аппаратный метод обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины 61

Корсакова И.И., Храпова Н.П., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Макаров Н.С., Голосеев Ю.А. Использование иммуноблоттинга для изучения эпитопной направленности моноклональных антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза 65

Михайлов Л.М., Токарева Л.Е., Баранникова Н.Л., Балахоннов С.В. Сенсибилизирующие свойства антигенных препаратов из бруцелл в S- и L-формах 68

Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Сорбционные свойства полимерного энтеросорбента и его специфического модификанта в модельных растворах холерного токсина *in vitro* 71

Краткие сообщения

Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Тынянова В.И. Токсичность различных форм липополисахаридов *Yersinia pestis* для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозаминном 75

Куклев Е.В., Сафронов В.А., Лопатин А.А., Раздорский А.С. Разработка компьютерной программы «Эпидемический потенциал природных очагов чумы Российской Федерации» 78

Чернядьев А.В., Дудина Л.Г., Литвинцев С.Г., Черников В.П., Бывалов А.А. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия клеток *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* со специфическими бактериофагами..... 80

Ямборко А.В., Еремеева Ю.В. Детекция *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *Ixodes angustus* из Магаданской области 83

Информация

Резолюция XII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Вклад государств-участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» (25–26 ноября 2014 г., Российская Федерация, г. Саратов) 85

Решение Межведомственного совещания по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (27 ноября 2014 г., г. Саратов) 87

Правила для авторов 93

Информация ЗАО «Ламинарные системы» 94

Oglodin E.G., Odinokov G.N., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Identification of Genovariants of *Yersinia pestis* Strains Belonging to Main Subspecies Using PCR with Hybridization-Fluorescent Registration of Results 52

Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Kulish V.S., Borisevich S.V. Diagnostics of Human Middle-East Respiratory Syndrome 56

Biotechnology, Immunology

Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Perepelitsa A.I., Eremin S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Gaeva A.V., Livanova L.F. Hardware-Controlled Method of Desalting Antigen Components of Cholera Chemical Vaccine 61

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Zamarina T.V., Pimenova E.V., Makarov N.S., Goloseev Yu.A. Utilization of Immunoblotting in Studies of Epitope Targeting in Monoclonal Antibodies to Melioidosis Agent Antigen 200 kDa 65

Mikhailov L.M., Tokareva L.E., Barannikova N.L., Balakhonov S.V. Sensitizing Properties of Antigen Preparations Obtained from Brucella in S- and L-Forms 68

Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Sorption Properties of Polymeric Enterosorbent and Its Specific Modified Analogue in Simulated Cholera Toxin Solutions *in vitro* 71

Brief Communication

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bepalova I.A., Borodina T.N., Tynyanova V.I. Toxicity of Various Forms of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharides to D-Galactosamine Sensitized White Mice 75

Kouklev E.V., Safronov V.A., Lopatin A.A., Razdorsky A.S. Designing of the Software Program “Epidemic Potential of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation” 78

Chernyad'ev A.V., Dudina L.G., Litvinets S.G., Chernikov V.P., Byvalov A.A. Electron-Microscopic Investigation of Interactions between *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* Cells and Specific Bacteriophages 80

Yamborko A.V., Eremeeva Yu.V. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes angustus* Ticks Found in the Magadan Region 83

Information

Resolution of the 12th Inter-State Scientific-and-Practical Conference “Contribution of the CIS Member-States into the Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population under Current Conditions” (November 25–26, 2014, Saratov, Russian Federation) 85

Decision of the Interdepartmental Meeting on the Matters of Sanitary-and-Epidemiological Protection of the Territory of the Russian Federation 87

Instruction to Authors 93

Information from “ZAO Laminarnye Systemy” 94

А.Ю.Попова¹, В.А.Сафронов², Н.Ф.Магасуба³, Д.В.Уткин², Г.Н.Одинок², О.В.Пьянков⁴,
А.С.Сергеев⁴, С.А.Боднев⁴, А.С.Кабанов⁴, В.Е.Куклев², А.А.Лопатин², А.С.Раздорский²,
К.А.Никифоров², С.А.Щербакова², В.А.Терновой⁴, А.П.Агафонов⁴, В.Н.Михеев⁴, В.В.Кутырев²

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА БАЗЕ МОБИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БРИГАДЫ В РЕСПУБЛИКЕ ГВИНЕЯ В ПЕРИОД ЭПИДЕМИИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА В 2014 г.

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация; ³Национальный госпиталь тропических и инфекционных болезней «Донка», Конакри, Республика Гвинея; ⁴ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, п. Кольцово, Российская Федерация

Дана характеристика эпидемии БВВЭ, которая началась в Гвинее в декабре 2013 г. и в 2014 г. охватила страны западноафриканского региона. Приведены основания для направления СПЭБ Роспотребнадзора в Республику Гвинея, цель, задачи, характеристики мобильного комплекса и кадрового обеспечения экспедиции. Охарактеризованы основные этапы работы, включая интеграцию в международную систему ответных мер на эпидемию Эбола. Обозначены основные направления взаимодействия с министерством здравоохранения и международными организациями. Приведены результаты работы лабораторной базы по диагностике лихорадки Эбола и других опасных инфекционных болезней. Дана молекулярно-генетическая характеристика вируса Эбола.

Ключевые слова: эпидемия лихорадки Эбола, молекулярно-генетическая характеристика вируса Эбола, Западноафриканский регион, мобильный комплекс СПЭБ.

A.Yu.Popova¹, V.A.Safronov², N.F.Magasuba³, D.V.Utkin², G.N.Odinokov², O.V.P'yankov⁴, A.S.Sergeev⁴,
S.A.Bodnev⁴, A.S.Kabanov⁴, V.E.Kuklev², A.A.Lopatin², A.S.Razdorsky², K.A.Nikiforov², S.A.Shcherbakova²,
V.A.Ternovoy⁴, A.P.Agafonov⁴, V.N.Mikheev⁴, V.V.Kutyrev²

Management and Performance of Diagnostic Investigations on the Platform of the Specialized Anti-Epidemic Team Mobile Complex During EVD Epidemics in 2014 in the Republic of Guinea

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ³Tropical and Infectious Diseases Department, Hospital "Donka", Conakry, the Republic of Guinea; ⁴State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

Given is an account of the EVD epidemics that started in the Republic of Guinea in December, 2013 and spread over West African countries within 2014. Established have been the grounds for the Rospotrebnadzor SAET deployment in the Republic of Guinea, objectives, goals and stuffing of the mission, and mobile complex technical performance. Described are the key stages of the work, including the process of integration into the UNMEER. Outlined are priority areas of collaboration with the National Public Health Ministry and international partner organizations. Represented are the results of work on the Ebola fever and other dangerous infectious diseases diagnostics, carried out at the mobile facility. Provided is molecular-genetic characteristics of the Ebola virus.

Key words: Ebola fever epidemic, Ebola virus molecular and genetic characteristics, West-African Region, SAET Mobile Complex.

В настоящее время в ряде стран Западной Африки наблюдается самое масштабное в истории эпидемическое распространение опасной болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ). Впервые БВВЭ была заподозрена в Республике Гвинея еще в декабре 2013 г. в г. Мельянду (префектура Гекеду), а уже к марту 2014 г. произошло распространение на восемь районов республики и соседние страны (Либерия и Сьерра-Леоне), в связи с чем Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) уведомила о вспышке инфекционной болезни, характеризующейся лихорадкой, тяжелой диареей, рвотой и высокой летальностью. Вирусологические исследования подтвердили в качестве возбудителя болезни вирус вида *Zaire ebolavirus* (EBOV), причем полногеномное секвенирование и

филогенетический анализ показали, что EBOV, выделенный в Гвинее, образует отдельную ветвь по отношению к уже известным штаммам [3].

В связи с неуклонно ухудшающейся эпидемической обстановкой по БВВЭ в странах Западной Африки в 2014 г. и возникновением реальной угрозы распространения болезни за пределы Африканского континента ВОЗ 08.08.2014 г. объявила вспышку лихорадки Эбола чрезвычайной ситуацией (ЧС) в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [4]. Главам государств рекомендовано объявить ЧС на национальных территориях, что предусматривает меры по ограничению передвижения людей, вплоть до введения карантина.

Основными проблемами, обусловившими столь

масштабное распространение БВВЭ в странах Западной Африки, стали отсутствие средств лечения и профилактики, недостаточность национальных возможностей по оперативной диагностике, невозможность своевременной и полноценной реализации ограничительных мероприятий.

В соответствии с официальным обращением Гвинейской Республики к Российской Федерации об оказании помощи в борьбе с БВВЭ, на основании Поручения Правительства Российской Федерации от 07.08.2014 № СП-П12-5959 и во исполнение приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19.08.2014 г. группа специалистов и два лабораторных модуля мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) направлены спецбортом Ил-76 МЧС в Гвинейскую Республику, г. Конакри.

В группу специалистов СПЭБ включены 2 эпидемиолога и 2 бактериолога РосНИПЧИ «Микроб», 2 вирусолога ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», а также инженер и водитель (РосНИПЧИ «Микроб»).

На территории Национального госпиталя «Донка» развернуты штаб и лабораторная база, которые незамедлительно приступили к работе во взаимодействии с Министерством здравоохранения и общественной гигиены Гвинейской Республики и такими международными организациями как ВОЗ, ООН, Врачи без границ, Международный красный крест.

Основной целевой установкой явилось обеспечение безопасности личного состава и имущества СПЭБ. В соответствии с данной установкой обеспечено неукоснительное выполнение правил биологической безопасности при обращении с патогенными биологическими агентами и правил безопасного поведения в стране пребывания. Функционирование СПЭБ осуществлялось под постоянным контролем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при непосредственном участии Посольства (Консульства) Российской Федерации в Гвинее.

В задачи СПЭБ входило:

1. Проведение диагностических исследований материала от больных (трупов), подозрительных на БВВЭ и реконвалесцентов.
2. Консультирование и защита российских граждан, находящихся в Гвинее, от угроз, связанных с БВВЭ (включая помощь в дооснащении здравпунктов и изоляторов).
3. Оказание консультативно-методической помощи международным организациям и гвинейским специалистам по вопросам планирования и проведения мероприятий по локализации и ликвидации эпидемических очагов БВВЭ.

Материалы и методы

Лабораторная диагностика БВВЭ организована в двух лабораториях мобильного комплекса

СПЭБ на базе кузова-фургона и прицепа автомобиля «КАМАЗ», модифицированных с учетом особенностей конструкции бактериологической лаборатории и лаборатории индикации. Внутри кузов разделен на лабораторный блок, помещение для снятия верхней одежды, надевания рабочей одежды, душевую, тамбур-шлюз для снятия защитной одежды и технический отсек, изолированный от помещения лаборатории. Мобильный комплекс обеспечивает проведение работ с микроорганизмами I–II групп патогенности в соответствии с СП 1.3.3118-13 [1]. Мобильный комплекс оснащен современным оборудованием для проведения лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней.

В лаборатории индикации, оснащенной боксами биологической безопасности II и III класса, осуществляли разбор и подготовку проб к исследованию, обеззараживание проб для ПЦР, серологические исследования, обеззараживание и деструкцию отходов путем автоклавирования. В бактериологической лаборатории, оснащенной боксом биологической безопасности II класса и ПЦР-боксом, проводили выделение РНК из обеззараженного биологического материала и ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Для диагностики лихорадки Эбола использовали зарегистрированные ПЦР-тест-системы отечественного производства «Вектор-ПЦР_{РВ}-Эбола-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») и «АмплиСенс EBOVZair1-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис»). Тест-система «Вектор-ПЦР_{РВ}-Эбола-RG» направлена на выявление *L* гена филовирсов, кодирующего вирусную полимеразу, область амплификации тест-системы «АмплиСенс EBOVZair1-FL» расположена на участке гена нуклеопротеина (NP).

Первичную подготовку и обеззараживание проб для ПЦР-исследования проводили в индикационной лаборатории, в боксе биологической безопасности III класса в соответствии с МУ 1.3.2569-09 [2]. Последующие этапы ПЦР-анализа проводили в бактериологической лаборатории: этапы выделения РНК – в боксе биологической безопасности II класса, сбор реакционной смеси для обратной транскрипции и ПЦР – в ПЦР-боксе. Выделение РНК из исследуемых образцов осуществляли с использованием «Комплекта реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (РУ ФСР 2008/03147) производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Обратную транскрипцию РНК и амплификацию кДНК проводили на программируемом амплификаторе роторного типа с гибридационно-флуоресцентной детекцией специфических продуктов амплификации – Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение

В течение трех месяцев работы (с 26.08.2014 г. по 26.11.2014 г.) исследовано 479 проб клинического

Таблица 1

Распределение исследуемых проб по видам материала

Вид материала	Наличие РНК вируса Эбола		Всего
	РНК вируса Эбола «+»	РНК вируса Эбола «-»	
кровь	19 (14,3)*	25 (7,3)	44 (9,2)
смыв	11 (8,3)	16 (4,6)	27 (5,6)
сыворотка	103 (77,4)	305 (88,1)	408 (85,2)
Итого	133 (100)	346 (100)	479 (100)

*В скобках – процент.

материала (сыворотка, кровь) от лиц с подозрением на БВВЭ и материал от трупов (кровь, смывы из ротовой полости). РНК вируса Эбола обнаружена в 133 пробах, что составило 27,8 % от всего исследуемого материала (табл. 1).

Результаты оценки качества лабораторной диагностики зашифрованных образцов, поступавших в первоначальный период валидации в лаборатории МК СПЭБ из референс-лаборатории Института Пастера (Дакар) и лаборатории геморрагических лихорадок в Гвинее, показали высокую чувствительность и специфичность российских тест-систем, что позволило включить МК СПЭБ Роспотребнадзора в систему международного реагирования как самостоятельную единицу.

Для дифференциальной диагностики с другими опасными инфекционными болезнями, имеющими сходные симптомы с лихорадкой Эбола, 334 пробы исследовано на выявление генетических маркеров возбудителей лихорадки Марбург, желтой лихорадки, лихорадки Ласса, лихорадки денге, лихорадки Западного Нила, Крымской геморрагической лихорадки и лептоспироза с использованием отечественных тест-систем производства Синтол («ОМ-Скрин-Эбола/Марбург-РВ», «РС-ЖЛ», «РС-ЛАС») и ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора («АмплиСенс Dengue virus type-FL», «АмплиСенс WNV-FL», «АмплиСенс CCHF-FL», «АмплиСенс Leptospira-FL»). В результате проведенных исследований РНК вирусов Марбург, желтой лихорадки, вирусов Ласса, лихорадки Денге, Западного Нила, Крымской-Конго геморрагической лихорадки и возбудителя лептоспироза не обнаружена. Это согласуется с данными ВОЗ, в соответствии с которыми случаи заболевания лихорадкой Ласса в Гвинее не были отмечены с 2002 г., желтой лихорадки – с 2011 г.

Параллельно проводился мониторинг социально значимых инфекций: гепатитов А, В, С и ВИЧ с использованием тест-систем «АмплиСенс HAV-FL» и «АмплиСенс HCV/HBV/HIV-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Всего исследовано 280 проб на наличие РНК вируса гепатитов А, С, вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), вируса иммунодефицита человека типа 2 (ВИЧ-2), ДНК вируса гепатита В.

В результате исследования 280 проб:

- РНК вируса гепатита А не обнаружена, в связи с тем, что больные с клиническими проявлениями ге-

патита А были исключены из исследуемой выборки на этапе постановки клинического диагноза (материал не вошел в исследование);

- РНК вируса гепатита С обнаружена в 1 пробе, что составило 0,4 %;

- РНК ВИЧ-1 обнаружена в 17 пробах (6,1 %), из них в 4 (23,5 %) отмечены коинфекция ВИЧ-1 и гепатита В, в 1 пробе (5,9 %) – коинфекция ВИЧ-1, гепатита В и вируса Эбола;

- РНК ВИЧ-2 не обнаружена;

- ДНК гепатита В обнаружена в 66 пробах (23,6 %). Причем в 35 пробах (53,0 %) обнаружена и РНК вируса Эбола, что может свидетельствовать о наличии суперинфекции или коинфекции, в 31 пробе (47,0 %) – РНК вируса Эбола не обнаружена.

Вопрос о наличии сопряженности двух маркеров требует дальнейшего изучения и расширения выборки исследуемых проб. Наличие коинфекции может усугублять течение болезни [4, 6]. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Высокий уровень выявления генетических маркеров гепатита В согласуется с данными ВОЗ о распространенности гепатита В в странах Западной Африки. Большинство жителей этих регионов приобретают инфекцию гепатита В в детстве, а от 5 до 10 % взрослого населения имеют хроническую инфекцию. В распространении вируса гепатита В может играть роль ритуал скарификации кожи у подростков с использованием нестерильных инструментов [6].

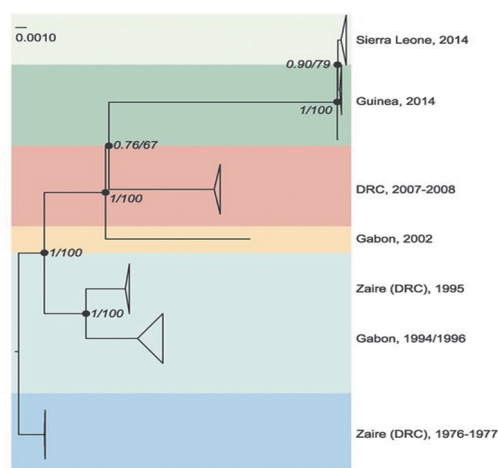
Штаммы вируса Эбола, являющиеся причиной текущей вспышки, вероятно, имеют общего предка со штаммом, вызвавшим вспышку в 1976 г. Обнаружено, что линия, вызвавшая настоящую вспышку, произошла от варианта центральноафриканского вируса около 10 лет назад [5]. Выявлено более 395 генетических замен, отличающих геном вируса лихорадки Эбола 2014 г. от геномов вирусов, вызвавших предыдущие вспышки заболевания (рис. 1).

При анализе 100 полногеномных нуклеотидных последовательностей вируса Эбола, депонированных в базе данных NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, США) установлено, что варианты вируса, выявленные в ходе вспышки БВВЭ

Таблица 2

Распределение исследуемых проб по видам выявленных генетических маркеров

Маркеры				Количество положительных проб (в скобках %)
РНК вируса Эбола	ДНК гепатита В	РНК гепатита С	РНК ВИЧ-1	
+	+	+	-	1 (0,4)
+	+	-	-	35 (12,5)
+	-	-	-	44 (15,8)
-	+	-	-	26 (9,4)
-	+	-	+	4 (1,4)
-	-	-	+	12 (4,3)
-	-	+	-	1 (0,4)
-	-	-	-	156 (55,8)
Итого				280 (100)



Филогенетические связи штаммов вирусов Эбола [5]

в Западной Африке в 2014 г., делятся на две подгруппы, отличающиеся наличием четырех сцепленных точечных мутаций в позициях 800 н. (ген NP), 8928 (ген VP30), 15963 и 17142 н. (ген L). Мутация в позиции 800 н. приводит к замене аминокислот Arg→Cys, остальные три мутации влияющие на аминокислотные последовательности вирусных белков не оказывают. Представители первой группы выделены в городах Гекеду и Кисидугу (Республика Гвинея) и в г. Кенема (Сьерра-Леоне); представители второй группы выделены в г. Кенема (Сьерра-Леоне). Внутри данных подгрупп установлена 100 % генетическая стабильность вариантов.

Налажено эффективное сотрудничество с Министерством Здравоохранения и международными организациями, что позволило валидировать и интегрировать МК СПЭБ Роспотребнадзора в общую систему борьбы с лихорадкой Эбола в Западной Африке.

За три месяца работы было исследовано 479 проб клинического материала и получены новые научные данные об особенностях генома циркулирующих штаммов вируса Эбола и возможной корреляции гепатита В и БВВЭ.

Продолжающаяся практическая работа СПЭБ Роспотребнадзора на международном уровне уже получила общественное признание и высокую оценку руководства Гвинеи в связи с существенным вкладом в борьбу с эпидемией БВВЭ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118-13.
2. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09.
3. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., Soropogui B., Sow M.S., Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371:1418–25.

4. Bald I., Camara A., Baldé O., Magassouba N.F., Bah M.S., Makané A., Gamy E.P. Malaria and HIV infection: clinical and biological aspects at Donka National Hospital in Conakry, Guinea. *Med. Trop. (Mars)*. 2010; 70(4):349–52.
5. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnio M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Boichicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheffelin J.S., Lander E.S., Hapci C., Gevao S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014; 345(6202):1369–72.
6. Ranjbar R., Davari A., Izadi M., Jonaidi N., Alavian S.M. HIV/HSV Co-Infections: Epidemiology, Natural History, and Treatment: A Review Article. *Iran Red. Crescent. Med. J.* 2011; 13(12):855–62.

References

1. [Safety of works with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity (hazard). Sanitary regulations]. SR 1.3.3118-13.
2. [Management of the laboratories using methods of nucleic acid amplification while working with the materials containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity. Methodological regulations]. MR 1.3.2569-09.
3. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., Soropogui B., Sow M.S., Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371:1418–25.
4. Bald I., Camara A., Baldé O., Magassouba N.F., Bah M.S., Makané A., Gamy E.P. Malaria and HIV infection: clinical and biological aspects at Donka National Hospital in Conakry, Guinea. *Med. Trop. (Mars)*. 2010; 70(4):349–52.
5. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S., Park D.J., Kanneh L., Jalloh S., Momoh M., Fullah M., Dudas G., Wohl S., Moses L.M., Yozwiak N.L., Winnicki S., Matranga C.B., Malboeuf C.M., Qu J., Gladden A.D., Schaffner S.F., Yang X., Jiang P.P., Nekoui M., Colubri A., Coomber M.R., Fonnio M., Moigboi A., Gbakie M., Kamara F.K., Tucker V., Konuwa E., Saffa S., Sellu J., Jalloh A.A., Kovoma A., Koninga J., Mustapha I., Kargbo K., Foday M., Yillah M., Kanneh F., Robert W., Massally J.L., Chapman S.B., Boichicchio J., Murphy C., Nusbaum C., Young S., Birren B.W., Grant D.S., Scheffelin J.S., Lander E.S., Hapci C., Gevao S.M., Gnirke A., Rambaut A., Garry R.F., Khan S.H., Sabeti P.C. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014; 345(6202):1369–72.
6. Ranjbar R., Davari A., Izadi M., Jonaidi N., Alavian S.M. HIV/HSV Co-Infections: Epidemiology, Natural History, and Treatment: A Review Article. *Iran Red. Crescent. Med. J.* 2011; 13(12):855–62.

Authors:

Popova A.Yu. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russian Federation.

Safronov V.A., Utkin D.V., Odinov G.N., Kuklev V.E., Lopatin A.A., Razdorsky A.S., Nikiforov K.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusapi@microbe.ru

Magassouba N.F. Tropical and Infectious Diseases Department, "Donka" Hospital. Conakry, Republic of Guinea.

P'yankov O.V., Sergeev A.S., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Mikheev V.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва, Российская Федерация. Сафронов В.А., Уткин Д.В., Одинов Г.Н., Куклев В.Е., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Никифоров К.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusapi@microbe.ru

Магасуба Н.Ф. Национальный госпиталь тропических и инфекционных болезней «Донка». Конакри, Республика Гвинея.

Пьянков О.В., Сергеев А.С., Боднев С.А., Кабанов А.С., Терновой В.А., Агафонов А.П., Михеев В.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 25.11.14.

УДК 616.98:579.842.22

В.В.Кутырев¹, А.Ю.Попова², Е.Б.Ежлова², Ю.В.Демина², Н.Д.Пакскина², Л.В.Щучинов³,
Е.П.Михайлов⁴, А.И.Мищенко⁴, Е.Н.Рождественский⁴, Г.Х.Базарова⁴, А.В.Денисов⁴, И.Н.Шарова¹,
Н.В.Попов¹, А.А.Кузнецов¹

**ЗАБОЛЕВАНИЕ ЧЕЛОВЕКА ЧУМОЙ
В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ В 2014 г.
СООБЩЕНИЕ 1. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ПРОЯВЛЕНИЙ ЧУМЫ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ (САЙЛЮГЕМСКОМ)
ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ**

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ³Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁴ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Впервые с открытия в 1961 г. Горно-Алтайского высокогорного природного очага, зарегистрирован случай заражения чумой человека. Заражение имело место вследствие разделки серого сурка, добытого на одном из стойких эпизоотических участков природного очага чумы. В результате проведенного комплекса противоэпидемических мероприятий, включавших лечение больного, выявление, изоляцию и лечение контактировавших с больным человеком и зараженным сурком, изъятие у населения и уничтожение тушек сурков, добытых в результате охотопромысла, проведение мер специфической и неспецифической профилактики, эпидемический очаг чумы был локализован и ликвидирован. Впервые получены доказательства одновременной циркуляции штаммов подвидов *Y. pestis* ssp. *pestis* и *Y. pestis* ssp. *altaica* в зоне совместных поселений монгольской пищухи, длиннохвостого суслика и серого сурка. Отмечена необходимость пересмотра тактики эпизоотологического мониторинга чумы для очаговых территорий, где зарегистрирована циркуляция разных подвидов *Y. pestis*.

Ключевые слова: Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы, эпидемический очаг, специфическая и неспецифическая профилактика, основной подвид *Yersinia pestis* ssp. *pestis*, серый сурок, охотопромысел.

V.V.Kutyrev¹, A.Yu.Popova², E.B.Ezhlova², Yu.V.Demina², N.D.Pakskina², L.V.Shchuchinov³, E.P.Mikhailov⁴,
A.I.Mishchenko⁴, E.N.Rozhdestvensky⁴, G.Kh.Bazarova⁴, A.V.Denisov⁴, I.N.Sharova¹, N.V.Popov¹,
A.A.Kuznetsov¹

**Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014.
Communication 1. Epidemiological and Epizootiological Peculiarities of Plague Manifestations
in the Gorno-Altai High-Mountain (Sailyugemsky) Natural Plague Focus**

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ³Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁴Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation

For the first time ever since the discovery of the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 1961, registered has been a case of human plague infection. It occurred in the consequence of the grey marmot cutting that was caught in the territory of one of the persistent epizootic regions of the natural plague focus. The outbreak was localized and eliminated following complex anti-epidemic measures, including medical treatment of the patient; identification, isolation and management of the contact persons, both to the patient and marmot; withdrawal and disposal of marmots' carcasses, obtained during unauthorized commercial hunting; specific and non-specific prophylaxis of the disease. Also for the first time ever received have been the evidences of concurrent circulation of the strains, subspecies *Y. pestis* ssp. *pestis* and *Y. pestis* ssp. *altaica* in the regions of cohabitation of Pallas' pika (*Ochotona pallasi*), Siberian souslik (*Citellus undulatus*), and grey marmot. Specified is the necessity to reconsider the tactics of epizootiological plague monitoring in enzootic territories where circulation of various *Y. pestis* subspecies is registered.

Key words: Gorno-Altai high-mountain natural focus of plague, epidemic focus, specific and non-specific prophylaxis, main subspecies *Yersinia pestis* ssp. *pestis*, grey marmot, hunting.

В сентябре 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге зарегистрирован первый случай заражения чумой человека. Больной А. 46 лет, поступил в Кош-Агачскую ЦРБ 9 сентября 2014 г. с диагнозом «Подмышечный лимфаденит

слева», 12 сентября по результатам индикации методами экспресс-диагностики (ПЦР, МФА) ему был поставлен предварительный, а затем на основании выделения культуры возбудителя чумы и выявления сероконверсии окончательный диагноз – «Бубонная

чума». В результате проведенного комплекса противоэпидемических мероприятий, включавших лечение больного, выявление, изоляцию и лечение контактировавших с больным человеком и зараженным сурком, изъятие у населения и уничтожение тушек сурков, добытых в результате охотопромысла, проведение мер специфической и неспецифической профилактики, эпидемический очаг чумы был локализован и ликвидирован.

Выделенный от больного штамм чумного микроба относится к основному подвиду *Yersinia pestis ssp. pestis*. Данная эпидемическая ситуация, типичная для монгольской части Сайлюгемского очага чумы [1], оказалась необычной с научной и практической точек зрения для его российской части, поскольку заражение чумой человека произошло в условиях одновременной циркуляции чумного микроба основного и неосновного подвидов.

Цель настоящей работы – проведение анализа эколого-эпизоотологической и эпидемиологической обстановки, явившейся предтечей первого случая чумы у человека в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге. При подготовке сообщения использованы архивные материалы ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», литературные источники и данные отчетной и первичной документации ФКУЗ «Алтайская противочумная станция».

Эколого-эпидемиологическая характеристика энзоотичных по чуме территорий Горного Алтая

Горно-Алтайский высокогорный природный очаг расположен на северной окраине Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы и является северной частью Сайлюгемского природного очага чумы, действующего на территории Монгольской Народной Республики (МНР) [5]. В орографически единой системе Горного Алтая энзоотия чумы впервые установлена на южных склонах хребта Сайлюгем (1955) в границах МНР. Позднее, в пределах России, эпизоотии чумы выявлены на северных склонах хребта Сайлюгем (1961) в Республике Алтай и в горном массиве Монгун-Тайга (1964) на территории Республики Тыва [3]. В географических пределах Горного Алтая энзоотия чумы обеспечивается циркуляцией 3 подвидов *Yersinia pestis* – *ssp. pestis* (Республика Тыва, МНР), *ssp. altaica* (Республика Алтай, МНР) и *ssp. ulegeica* (МНР) [1, 9]. В 2012 г. на территории Республики Алтай в долине р. Уландрык впервые выявлен штамм основного подвида *Y. pestis* 1454 от трупа длиннохвостого суслика (Уландрыкский участок очаговости, ур. Большие Сары-Гобо) [4]. На севере Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы расположен также Забайкальский степной природный очаг, занимающий территорию междуречья Онон и Аргунь в степях Даурии [12].

В границах Российской Федерации на энзоотич-

ных по чуме территориях Горного Алтая (Республики Алтай и Республики Тыва) заболеваний людей в 1961–2013 гг. не зарегистрировано [2]. Напротив, в Забайкалье на протяжении второй половины XIX и начала XX века неоднократно регистрировали чумные вспышки (с 1863 до 1930 год). Источником инфекции, за редкими исключениями, являлся монгольский сурок или тарбаган – *Marmota sibirica*, от которого возбудитель чумы впервые выделен здесь в 1911 г. [5, 12]. Последний случай заболевания чумой человека (ловец эпидотряда) в Забайкалье зарегистрирован в 1960 г. в районе озера Зун-Торей.

В природных очагах чумы Монгольского Алтая и Хангая в 1955–2013 гг. заболевания людей регистрировали неоднократно. Только в 1994–2003 гг. здесь выявлено 56 случаев заболеваний чумой, отмечено семь вспышек, в которые были вовлечены по 2–5 чел. За последние 10 лет вспышки не зарегистрированы [1]. Вместе с тем в 2004–2013 гг. на территории 13 сомонов 9 аймаков Монголии имели место 13 случаев заболевания человека чумой. Источниками заражения людей являлись, в основном, сурки (69,2 %) и их эктопаразиты (30,7 %). Пик заболеваемости отмечался в сентябре, совпадая с периодом наиболее активного охотопромысла монгольского и серого сурков [11].

Все это подтверждает большую современную эпидемиологическую значимость сурков, прямой контакт с которыми наиболее часто служит причиной заражения человека на всей северной части Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы. Однако в связи с тем, что во второй половине XX века под влиянием антропогенных (профилактические мероприятия, браконьерство) и климатических факторов произошло многократное сокращение площади поселений и численности сурков: монгольского – *M. sibirica* и серого или алтайского – *M. baibacina* [12], эпидемиологическая настороженность к этим промысловым видам значительно снизилась. Хотя риск заражения человека чумой при прямом контакте с больным сурком сохранился, в первую очередь, на территориях, где зарегистрирована циркуляция основного подвида *Y. pestis*.

В настоящее время монгольский сурок широко распространен в горных и высокогорных ландшафтах Республики Тыва, Забайкалья, МНР, Внутренней Монголии, Северо-Восточного Китая [13]. Причем на территории Тувинского горного природного очага в последнее десятилетие плотность поселений тарбагана значительно возросла, в том числе в зоне развития эпизоотий чумы [14]. Подчеркнем, что в 80-х годах прошлого столетия здесь регистрировали единичные находки переболевших (1978 г. – ур. Кара-Хову, Кара-Бельдырский участок очаговости) и зараженных (1984 г. – ур. Кызыл-Хая, Барлыкский участок очаговости) монгольских сурков. На территории Забайкальского очага чумы поселения тарбагана сохранились лишь на ограниченных разрозненных участках, преимущественно в гористой труднодо-

ступной местности и за линией пограничных инженерных сооружений, расположенных вдоль границы с Китаем и Монголией. Наиболее высокая плотность зверьков до 1,5–2,0 жилых нор на 1 га отмечена на территории Олдондинского заказника на площади 51 тыс. га вблизи населенных пунктов Акурай, Усть-Озерное и Курунзулай. Поселения монгольского сурка выявлены в окрестностях сел Кутугай, Шаранча, Маньково. Здесь он встречается в количестве 0,1–1,5 особи на 1 га на участках, где проводятся охранные мероприятия.

Серый или алтайский сурок (*M. baibacina*) также является фоновым видом в районах западного Забайкалья, в Республике Алтай, Республике Тыва и Северо-Западной Монголии [6, 13]. При этом в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы его поселения широко распространены на северном склоне хребта Сайлюгем (Уландрыкский участок очаговости) и в отрогах Южно-Чуйского хребта (Тархатинский участок очаговости), т.е. на территории, где ежегодно регистрируют развитие эпизоотий чумы [7, 8]. Однако в период 1961–2013 гг. зарегистрированы только единичные случаи заражения серого сурка циркулирующим здесь подвидом *Y. pestis* ssp. *altaica*. Последнее послужило основной причиной значительного снижения эпизоотологического контроля сохранившихся поселений сурка на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. После выявления в 2012 г. штамма основного подвида *Y. pestis* 1454 на территории Уландрыкского участка очаговости (ур. Большие Сары-Гобо) [4], т.е. в зоне широкого распространения совместных поселений серого сурка и длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*), возникли основания для пересмотра тактики эпизоотологического обследования очаговых территорий. В связи с этим в 2013–2014 гг. Алтайской противочумной станцией проведены дополнительные летние обследования приграничных территорий с МНР и Республикой Тыва. Особо подчеркнем, что вероятность широкого распространения штаммов основного подвида *Y. pestis* в высокогорных популяциях алтайского сурка нашла косвенное подтверждение при обострении эпизоотологической и эпидемиологической ситуации в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы в 2014 г.

Напомним, что вплоть до 2014 г. эпидемический потенциал Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы оценивался как невысокий. В 1961–2011 гг. здесь была зарегистрирована циркуляция только штаммов подвида *Yersinia pestis* ssp. *altaica*, характеризующихся избирательной вирулентностью к фоновым видам зайцеобразных и грызунов. При этом подавляющее число культур выделено от монгольских пищух (*Ochotona pricei*) и их эктопаразитов [2, 8]. На энзоотичной по чуме территории средняя плотность населения – 1 чел. на 1 кв. км. В основном население сосредоточено в районном центре с. Кош-Агач и 13 сельских населенных пунктах. Основное

занятие населения – отгонное животноводство. На эпизоотических участках проживают от 2,5 до 3 тыс. человек. Среди факторов риска отметим распространение поселений основного носителя – монгольской пищухи – до жилых построек с. Жана-Аул и районного центра с. Кош-Агач. В 2011 г. в нем отловлена серопозитивная домовая мышь (*Mus musculus*), что указывает на вовлечение в эпизоотический процесс синантропных грызунов. Имеет место лицензионный и браконьерский промысел серого сурка в высокогорных районах. Блохи синантропных грызунов в жилищах человека отсутствуют, а миграционная активность блох грызунов и зайцеобразных в природных биотопах невелика. В 1961–2013 гг., несмотря на наличие постоянного риска заражения подвидом *Yersinia pestis* ssp. *altaica*, здесь сохранялось эпидемиологическое благополучие по чуме. Однако после событий 2012–2014 гг. стало очевидным, что в связи с выделением здесь штаммов основного подвида *Y. pestis* потенциальная эпидемическая опасность территорий Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы значительно возросла, и в настоящее время наибольшую эпидемическую опасность представляют непосредственные контакты человека с природно-очаговыми комплексами, в первую очередь, с больными сурками и сусликами.

*Мероприятия, направленные на локализацию
и ликвидацию эпидемического очага чумы
в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге
в 2014 г.*

9 сентября 2014 г. в Кош-Агачскую центральную районную больницу доставлен больной А. 46 лет, житель с. Мухор-Тархата Кош-Агачского района Республики Алтай, который был госпитализирован в хирургическое отделение с диагнозом «Подмышечный лимфаденит слева». Заболел остро, во второй половине дня 8 сентября 2014 г. появилась боль и отечность в левой подмышечной впадине. В дальнейшем беспокоили озноб, сильная головная боль, температура до 40 °С, болезненность в подмышечной впадине резко усилилась. Вечером 9 сентября 2014 г. в состоянии, близком к тяжелому, больной был доставлен в больницу. При поступлении: температура была 38,5 °С, ЧСС – 82 удара в мин, АД – 90/60 мм. рт. столба. Кожные покровы – чистые. Дыхание везикулярное, хрипов нет. Язык обложен белым налетом. Стул в норме. В левой подмышечной впадине болезненное образование размером 2,5×3 см без четкой границы, флюктуации нет. Проведена пункция, гноя не обнаружено. Назначено антибактериальное лечение цефтриаксоном (1,0×2 раза в/в струйно), анальгин в/м, димедрол в/м. 11 сентября 2014 г. в связи с тем, что состояние больного не улучшилось назначен ципролет (200,0 в/в капельно), спиртовое обтирание.

12 сентября 2014 г. врач-инфекционист Кош-Агачской ЦРБ поставила предварительный диагноз

«Подмышечный лимфаденит не ясной этиологии слева. Туляремия, бубонная форма? Чума, бубонная форма?». Дополнительно больному был назначен амикацин в/м по 1,0×2 раза в сутки. Установлено, что больной работал кочегаром ФАП, 31 августа 2014 г. участвовал в разделке сурка, добытого на одном из стойких эпизоотических участков природного очага чумы в ур. Сербисту, и поранил палец на левой руке. 18 сентября 2014 г. с высева со среды накопления (бульон с посевом пунктата бубона) выделена культура *Y. pestis* ssp. *pestis* от больного. По результатам лабораторных исследований на основании выделения культуры от больного и ее идентификации подтвержден клинический диагноз – «Бубонная чума». При проведении эпидемиологического расследования из холодильника на дому у больного специалистами Ташантинского эпидотряда Алтайской противочумной станции изъяты три тушки сурков, от одного из них из подчелюстного лимфатического узла также выделена культура *Y. pestis* ssp. *pestis* [10].

В соответствии с Постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Алтай от 19.09.2014 г. № 18 «О проведении дополнительных профилактических мероприятий в природном очаге чумы в Кош-Агачском районе» проведен необходимый комплекс санитарно-профилактических противочумных мероприятий.

Выявлено 52 чел., контактировавших с больным и с инфицированным мясом сурка: 24 медицинских работника, 16 больных, находившихся на лечении в хирургическом отделении, 12 жителей с. Мухор-Тархата. Тесный контакт первого порядка имели 11 жителей села, из которых 5 чел. (1 хирург, 1 медсестра, 1 лаборант, 2 хирургических больных, находившихся в одной палате с больным чумой) были изолированы в отдельных помещениях хирургического отделения, остальные 6 чел. – по месту проживания. За домами работниками администрации с. Мухор-Тархата было установлено наблюдение с целью предупреждения выхода контактировавших и входа к ним посторонних лиц. Все 11 контактных первого порядка обследованы на чуму (результат исследования – отрицательный), за ними установлено медицинское наблюдение и проведено профилактическое лечение. Еще 41 чел. находился под медицинским наблюдением по месту жительства с правом выхода на работу. Все получали профилактическое лечение. С целью выявления больных в с. Мухор-Тархата проводились ежедневные подворные обходы. По истечении 7 дней с момента объявления очага случаев заболеваний с подозрением на чуму среди контактных не выявлено.

В очагах проведена текущая и заключительная дезинфекция препаратом «ДП-2» 0,5 % общей площадью 49,5 тыс. кв.м. Обследовано на наличие грызунов и блох с. Мухор-Тархата на общей площади 41 тыс. кв.м. В селе проведена поселковая дератизация препаратом «Бродифакум» 0,25 % на площади 41 тыс. кв.м и поселковая дезинсекция препаратом «Абсолют» на площади 6900 кв.м. Обработаны туа-

леты и выгребные ямы сухим гипохлоритом кальция в 205 дворах. Проведена дератизация и дезинсекция стоянок животноводов препаратами «Бродифакум» 0,25 % и «Абсолют» на площади 4200 кв.м. Вокруг 2 зимних стоянок на участке Сербисту (Себистей) созданы буферные зоны общей площадью 0,2 кв.км путем глубокой dustации нор препаратом «Абсолют». Кроме того, зоогруппами Алтайской противочумной станции проведена экстренная поселковая дератизация в селах Ташанта, Жана-Аул, Ортолык, Теленгит-Сортогой, Старый Бельтир на общей площади 248,65 тыс. кв.м.

Специалистами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай» и его Кош-Агачского филиала проведена сплошная дератизация сел Кош-Агач, Кокоря, Тобелер, Чаган-Узун, Новый Бельтир на общей площади 290,3 тыс. кв.м.

Проведено эпизоотологическое обследование 14 участков: Сербисту (Себистей), Кок-Озек, Средине Ирбисту, Низ и Средине Тархаты, Вершина Больших Шибет, Средине Уландрыка, Правый берег Чаган-Бургаз, Центральная и Восточная части Курайского хребта, Средине Елангаша, Междуречье, Чуйская степь, Юстыт общей площадью 2754,9 кв.км.

Издано распоряжение администрации МО «Кош-Агачский район» за № 299 от 17.09.2014 г. п. 1 «О запрете охоты на сурков на эпизоотических участках». Пунктом 2 данного распоряжения запрещен выпас верблюдов, вывоз сена и фуража и других санитарно-опасных грузов с эпизоотических участков (по данным БУ РА «Кош-Агачская РайСББЖ» по состоянию на 01.07.2014 г. на территории района содержится 389 голов верблюдов). В целях профилактики чумы проведен визуальный осмотр 131 верблюда, принадлежащих ООО КФХ «Амат» Мухор-Тархатинского сельского поселения, больных и подозрительных животных не выявлено. Выпас этих верблюдов (КФХ «Амат») осуществляется в ур. Тоо-Кышту в 20 км от эпизоотического участка Сербисту. За выпасающимися верблюдами установлено ветеринарное наблюдение, случаев их заболеваний с подозрением на чуму не зарегистрировано. Проведена профилактическая дезинфекция животноводческих помещений, принадлежащих административной территории Мухор-Тархатинского сельского поселения, обработан 21 объект общей площадью 4 тыс. кв.м, в том числе ООО КФХ «Амат» (общей площадью 300 кв.м). Дезинфекция проведена методом струйного опрыскивания 1 % раствором препарата «ГАН» с использованием спецавтомшины ДУК.

Наряду с мерами неспецифической профилактики, проведены профилактические прививки живой чумной вакциной контингентам высокого риска заражения в плановом порядке и по эпидемическим показаниям. Учитывая, что население Кош-Агачского района проживает на территории природного очага чумы, ежегодно Постановлением Главного государственного санитарного врача по Республике Алтай определяются контингенты, подлежащие иммуниза-

ции против чумы. В Кош-Агачском районе проживает 18318 чел. Население с. Мухор-Тархата – 840 чел., из них 240 детей. В течение марта–апреля 2014 г. привито против чумы накожным методом 648 чел., из них жителей населенных пунктов Кош-Агачского района 600 чел. (медработники – 71, работники образования – 21, животноводы – 237, сотрудники ветеринарной службы – 26, неработающие – 245), сотрудников противочумной станции – 48 чел.

В связи со сложившейся ситуацией в сентябре 2014 г. Постановлением Главного государственного санитарного врача по Республики Алтай от 19.09.2014 г. № 18 были определены дополнительные контингенты высокого риска для проведения вакцинации по эпидемическим показаниям в количестве 926 чел., в том числе: 51 медицинский работник, 397 животноводов, 220 охотников, 14 ветеринарных работников, 6 полицейских, 9 сотрудников лесхоза, 39 работников общеобразовательных учреждений, 10 детей до 14 лет, 181 житель сел Теленгит-Сортогой – 23 чел., Тобелер – 45, Чаган-Узун – 15, Ортолык – 6) Кош-Агач – 76, Курай – 3, Кызыл-Таш – 13. Вакцинация завершена 02.10.2014 г. Проведен обучающий семинар по клинике, эпидемиологии, профилактике чумы с

медицинским персоналом района. В с. Мухор-Тархата проведено 260 бесед, роздано 300 листовок, прочитана лекция по профилактике чумы.

В результате целенаправленного поиска при эпизоотологическом обследовании Тархатинского участка очаговости установлены места регистрации чумного микроба, представленные на рис. 1. В сентябре 2014 г. в ур. Сербисту в секторе 134508142(36) точка 5 (координаты: 49° 48' 49" с.ш., 088° 26' 29" в.д. – 2012 м н.у.м.) от блох *Paradoxopsyllus scorodumovi* и *Paramonopsyllus scalonae*, собранных из входов нор монгольской пищухи, выделены 2 культуры *Y. pestis* ssp. *altaica* [10]. На этом же участке в секторе 134508141(36) на точке 6 (координаты: 49° 47' 50" с.ш., 088° 21' 40" в.д. – 2221 м. н.у.м.) были добыты 6 серопозитивных плоскочерепных полевок. В секторе 134508141(36) на точке 7 (координаты: 49° 47' 13" с.ш., 088° 19' 32" в.д. – 2413 м н.у.м.) добыты серопозитивные зверьки: 1 длиннохвостый суслик и 1 монгольская пищуха. На смежной территории ур. Средине Ирбисту в секторе 134508123(36) точка 8 (координаты: 49° 50' 19" с.ш., 088° 22' 18" в.д. – 2085 м. н.у.м.), от блох *P. scorodumovi*, собранных с монгольской пищухи, получена 1 культура *Y. pestis* ssp. *altaica*. В ур. Кок-Озек в секторе

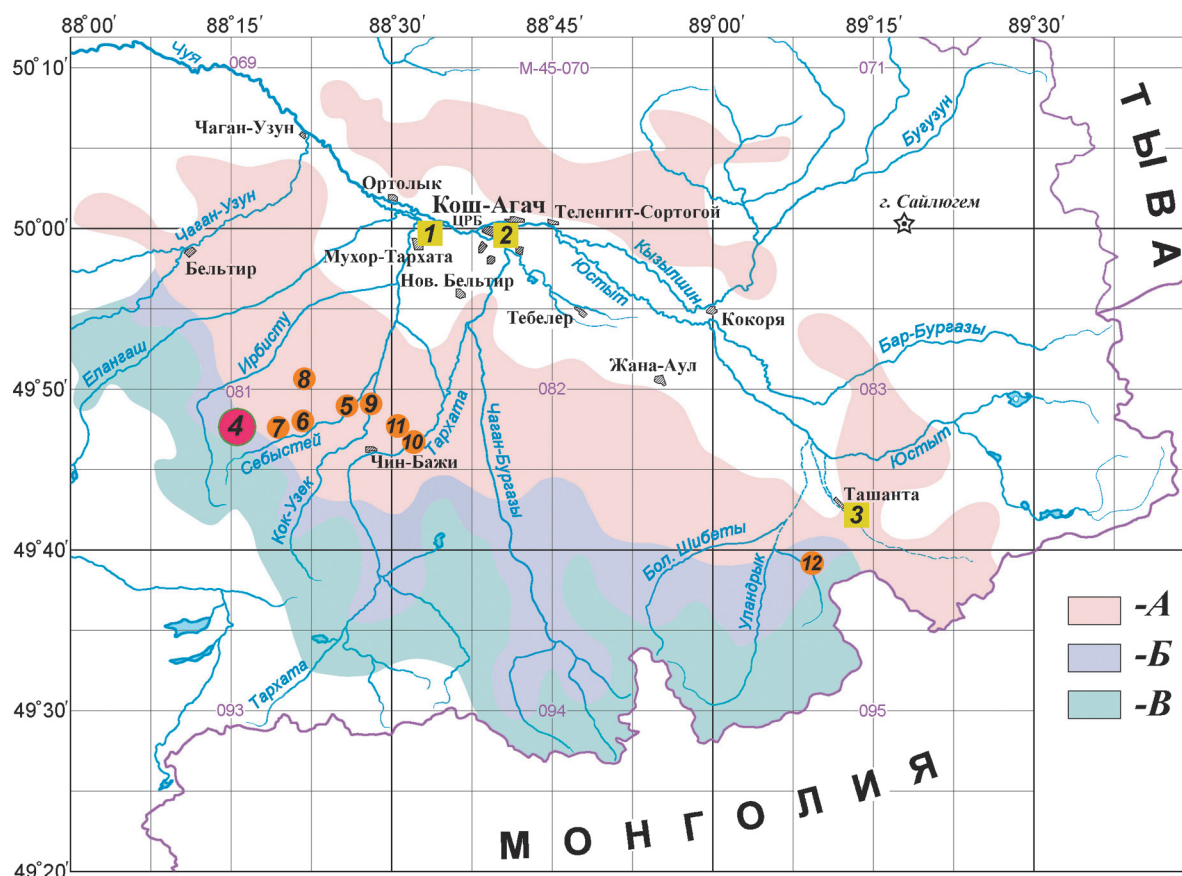


Рис. 1. Пространственная характеристика эпизоотологической и эпидемиологической обстановки на территории Тархатинского участка очаговости Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в осенний период 2014 г.:

1 – с. Мухор-Тархата, где проживает больной А.; 2 – п. Кош-Агач, куда в ЦРБ был доставлен больной А.; 3 – дислокация Ташантинского эпидотряда ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора (с. Ташанта); 4 – эпизоотический участок Сербисту, где в 2014 г. добыты серый сурик, от которого произошло заражение человека; серый сурик, от которого была выделена культура основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* (изъят из холодильника); 5–12 – точки сбора мелких млекопитающих и их блох, от которых получены штаммы чумного микроба или положительные серологические реакции (описания в тексте). А – зона абсолютного преобладания поселений монгольской пищухи; Б – зона совмещения поселений монгольской пищухи, длиннохвостого суслика и серого сурика; В – зона совмещения поселений серого сурика и длиннохвостого суслика

134508142(36) на точке 9 (координаты: 49° 48' 51" с.ш., 088° 28' 00" в.д. – 2008 м н.у.м.), выявлены 2 серопозитивные монгольские пищухи. В апреле 2014 г. в ур. Низ Тархаты в секторе 134508231(36) на точке 10 (координаты: 49° 46' 59" с.ш., 088° 31' 49" в.д. – 2390 м н.у.м.), расположенной восточнее выявленных в сентябре эпизоотических участков Сербисту и Кок-Озек, от блох *Amphalius runatus*, собранных с монгольской пищухи, получена 1 культура *Y. pestis* ssp. *altaica* (рис. 1), а в сентябре в этом же секторе (точка 11) добыта серопозитивная монгольская пищуха, т.е. эпизоотия чумы с апреля по сентябрь протекала среди монгольских пищух и плоскочерепных полевков с вовлечением длиннохвостых сусликов. Кроме того, в июне 2012 г. в ур. Большие Сары Гобо в секторе 134509512(36) точка 12 (координаты: 49° 39' 09" с.ш., 089° 09' 33" в.д.) от трупа длиннохвостого суслика впервые выделен штамм *Y. pestis* ssp. *pestis* 1454 (рис. 1). Рамки и шифры секторов на рисунке и в тексте указаны в соответствии с новыми требованиями. Таким образом, впервые получены доказательства одновременной циркуляции штаммов подвидов *Y. pestis* ssp. *pestis* и *Y. pestis* ssp. *altaica* в зоне совместных поселений монгольской пищухи, длиннохвостого суслика и серого сурка в ур. Сербисту.

Анализ результатов лабораторного исследования полевых материалов позволяет считать, что эпизоотия среди серых сурков в ур. Сербисту протекала в летний период (см. рис. 1, точка 4). Из 7 экз. исследованных серых сурков, добытых в 2014 г. в данном урочище, от одного получена культура основ-

ного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis*, другой – послужил источником заражения человека (также штаммом основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis*). Последнее свидетельствует о том, что в высокогорных ландшафтах штаммы основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* циркулируют преимущественно на участках плотно заселенных серым сурком. Подчеркнем, что распространение и численность носителей и переносчиков чумы на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы во многом определяется вертикальной поясностью растительного покрова [7]. В условиях пересеченного высокогорного рельефа отдельные поселения сурков в горно-степных и горно-тундровых ландшафтах значительно обособлены, что обуславливает микроочаговый характер проявлений чумы. На стыках горных и высокогорных ландшафтов сохраняется весьма высокая вероятность передачи штаммов основного подвида *Y. pestis*, в первую очередь, длиннохвостому суслику, поселения которого встречаются здесь до высоты 2900 м н.у.м. В пределах высот от 1750 до 2600 м н.у.м., где доминирующее положение в многовидовых сообществах грызунов и зайцеобразных занимает монгольская пищуха (оптимальная зона обитания – от 1950–2400 м н.у.м.), циркулируют штаммы подвида *Y. pestis* ssp. *altaica*. Основные закономерности распространения монгольской пищухи, длиннохвостого суслика и серого сурка по высотным поясам центральной части Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в зоне эпизоотии чумы 2014 г. показаны на рис. 2.

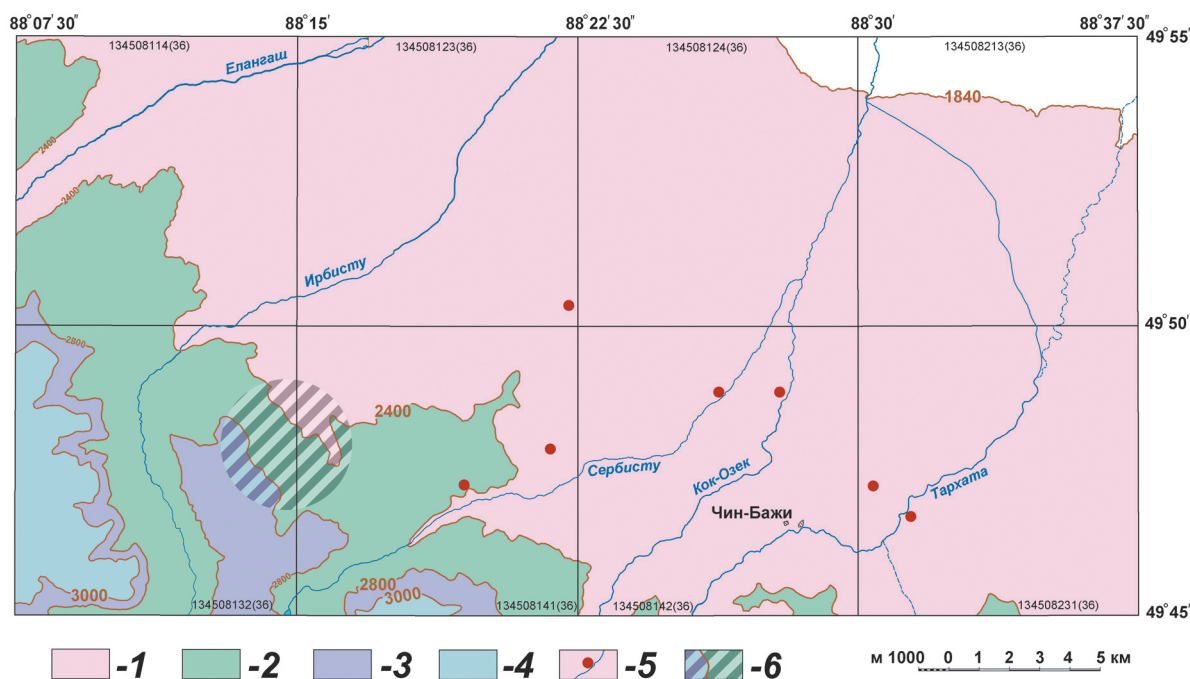


Рис. 2. Приуроченность поселений носителей возбудителя чумы к высотным поясам Горно-Алтайского высокогорного очага:

1 – зона преобладания поселений монгольской пищухи (1750–2600 м н.у.м.); 2 – зона преобладания поселений длиннохвостого суслика и серого сурка (2200–2900 м н.у.м.); 3 – зона распространения поселений сурка и суслика без поселений пищухи (2800–3000 м н.у.м.); 4 – зона разреженных поселений серого сурка (выше 3000 м н.у.м.); 5 – места сбора млекопитающих и блох, от которых выделен возбудитель чумы *Y. pestis* ssp. *altaica* или зарегистрированы серопозитивные зверьки в апреле–сентябре 2014 г.; 6 – предполагаемый район распространения основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* на участке Сербисту

В связи с заражением чумой человека в 2014 г. и выделением штаммов основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* от серого сурка (*M. baibacina*), добытого в ур. Сербисту, на Тархатинском участке очаговости территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага, необходимо внести ряд корректив в организацию эпидемиологического надзора за чумой в очаге. В частности, следует значительно усилить контроль состояния популяций серого сурка и длиннохвостого суслика. Полученные в 2012–2014 гг. факты выявления циркуляции штаммов основного подвида *Y. pestis* ssp. *pestis* среди серых сурков (2014 г. в ур. Сербисту, Тархатинский участок очаговости) и длиннохвостых сусликов (2012 г. в ур. Сары-Гобо, Уландрыкский участок очаговости) на территориях, удаленных друг от друга на расстоянии 50 км и более, позволяют предполагать широкое распространение штаммов основного подвида чумного микроба в высокогорных районах Горно-Алтайского природного очага чумы. При этом следует учитывать вероятность постоянной циркуляции штаммов основного подвида чумного микроба среди серых сурков в высокогорных районах Алтая, как это имеет место на смежных территориях МНР. Однако направленного поиска микроочагов чумы в поселениях серых сурков на участках северных склонов хребта Сайлюгем и отрогов Южно-Чуйского хребта, где в 2012–2014 гг. были выделены штаммы основного подвида чумного микроба, в последние десятилетия не проводилось.

В целях усиления работы по обеспечению эпидемиологического благополучия населения необходимо пересмотреть тактику эпизоотологического мониторинга чумы, регламентированную требованиями нормативно-методического документа МУ 3.1.3.2355-08 «Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации», для очаговых территорий, где зарегистрирована циркуляция разных подвидов *Y. pestis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адъяасурэн Э., Цэрэнноров Д., Мягмар Ж., Ганхуяг Ц., Отгонбаяр Д., Баяр Ц., Вержуцкий Д.Б., Ганболд Д., Балахонов С.В. Современная ситуация в природных очагах чумы Монголии. *Дальневосточный журн. инф. патол.* 2014; 25:22–5.
2. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Иннокентьева Т.И. Эпидемиологическая оценка современного состояния природных очагов чумы в Сибири. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2010; 2:34–7.
3. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Чипанин Е.В., Шестопалов М.Ю., Иннокентьева Т.И., Попков А.Ф., Михайлов Е.П., Ооржак Л.М., Вахрушева З.П., Агапов В.А. Современное состояние природных очагов чумы Сибири. *Журн. инф. патол.* 2009; 16(3):16–20.
4. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивченко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:60–4.
5. Голубинский Е.П., Жовтый И.Ф., Лемешева Л.Б. О чуме в Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та; 1987. 243 с.
6. Ешелкин И.И., Михайлов Е.П. К вопросу о гостальности Горно-Алтайского природного очага чумы. *Журн. инф. патол.*

2009; 16(3):111–2.

7. Кирьянов Г.И. Распределение грызунов и зайцеобразных по биотопам высокогорной части Горного Алтая и прилегающих районов Монголии. *Изв. Вост.-Сиб. отд. геогр. общества СССР.* Иркутск, 1971; 68:118–23.

8. 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; 4:13–8.

9. Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Караваева Т.Б. Совершенствование типизации природных очагов чумы на основе эколого-генетического анализа *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 5:107–11.

10. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербаклова С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в горно-алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетические характеристики выделенных штаммов. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:43–51.

11. Никитин А.Я., Марамонович А.С., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Базанова Л.П., Балахонов С.В., Воронова Г.А., Окунев Л.П. Эпизоотологическая характеристика природных очагов чумы Монголии в связи с разработкой мер защиты от завоза и распространения инфекции на территории России. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 2:28–33.

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

13. Павлинов И.Я., Крускоп С.В., Варшавский А.А., Борисенко А.В. Наземные звери России. Справочник-определитель. Москва; 2002. 488 с.

14. Попков А.Ф., Вержуцкий 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; 2:33–6.

References

1. Adyaasuren E., Tserennorov D., Myagmar Zh., Ganhuyag Ts., Otgonbayar D., Bayar Ts., Verzhutsky D.B., Ganbold D., Balakhonov S.V. [Current epidemiological situation in the plague foci of Mongolia]. *Dal'nevost. Zh. Infek. Patol.* 2014; 25:22–5.
2. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Innokent'eva T.I. [Epidemiological assessment of the current state of the natural plague foci in Siberia]. *Epidemiol. Vaksinnoprol.* 2010; 2:34–7.
3. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Chipanin E.V., Shestopalov M.Yu., Innokent'eva T.I., Popkov A.F., Mikhailov E.P., Oorzhak L.M., Vakhrusheva Z.P., Agapov V.A. [Current state of the natural plague foci in Siberia]. *Zh. Infek. Patol.* 2009; 16(3):16–20.
4. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivchenko N.I., Rozhdetsvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–4.
5. Golubinsky E.P., Zhovty I.F., Lemesheva L.B. [Regarding the Plague in Siberia]. *Irktusk*; 1987. 243 p.
6. Eshelkin I.I., Mikhailov E.P. [On the matters of host-specificity of Gorno-Altai natural plague focus]. *Zh. Infek. Patol.* 2009; 16(3):11–2.
7. Kir'yanov G.I. [Dissemination and distribution of rodents and lagomorphs in biotopes of the high-mountain part of the Gorny Altai and adjacent Mongolian regions]. *Izvestiya Vost.-Sibir. Otdeleniya Geogr. Obshchestva SSSR.* 1971; 68:118–23.
8. 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; 4:13–8.
9. Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Karavaeva T.B. [Development of the process of natural plague foci typization based on the ecological-genetic analysis of *Yersinia pestis*]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2013; 5:107–11.
10. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakschina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdetsvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kuleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odiokov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of Laboratory Diagnostics and Molecular-Genetic Characterization of the Isolated Strains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:43–51.
11. Nikitin A.Ya., Maramovich A.S., Kossilko S.A., Innokent'eva T.I., Bazanova L.P., Balakhonov S.V., Voronova G.A., Okunev L.P. [Epizootologic

characterization of plague natural foci in Mongolia in connection with designation of protection measures from import and dissemination of the infection into the Russian territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 2:28–33.

12. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

13. Pavlinov I.Ya., Krusko S.V., Varshavsky A.A., Borisenko A.V. [Terrestrial Animals of Russia. Reference-Guide]. Moscow, 2002. 488 p.

14. Popkov A.F., Verzhootsky D.B., Korzoon V.M., Innokentieva T.I., Chipanin E.V., Verzhin 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 focality in Siberia carried out in 2001–2005]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 2:33–6.

Authors:

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

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russian Federation.

Shchuchinov L.V. Rosпотребнадзор Administration in the Republic of Altai, Gorno-Altaysk, Russian Federation.

Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altaysk, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Об авторах:

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

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва, Российская Федерация.

Щучинов Л.В. Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай. Горно-Алтайск, Российская Федерация.

Михайлов Е.П., Миценко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Поступила 26.11.2014

В.Б.Кириллов, С.Л.Кириллова, С.В.Борисевич, Е.П.Лукин,
П.А.Габарев

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОГО УЩЕРБА ОТ ВСПЫШЕК ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА ПРИМЕРЕ КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад,
Российская Федерация

Целью исследований являлась разработка метода прогнозирования социально-экономического ущерба от вспышек инфекционных болезней с помощью индекса DALY на примере Крымской геморрагической лихорадки. Разработанный экспертами Всемирной организации здравоохранения индекс DALY был адаптирован для Российской Федерации с учетом величины валового внутреннего продукта и распределения возрастного состава населения. Изложен порядок прогнозирования социального ущерба от вспышки инфекционного заболевания, измеренного в суммарном количестве потерянных лет полноценной жизни, и экономического ущерба в результате уменьшения валового внутреннего продукта. Предложенный метод может быть использован для прогнозирования социально-экономического ущерба от вспышек инфекционных болезней и оценки эффективности противоэпидемических и лечебных мероприятий. Проведена оценка экономического и социального ущерба от вспышек Крымской геморрагической лихорадки в Южном Федеральном округе с учетом данных о заболеваемости за период с 1999 по 2010 год. Основной экономический ущерб обусловлен потерями трудовых ресурсов в результате летальных исходов заболевания. Метод прогнозирования социально-экономического ущерба от вспышки инфекционной болезни с использованием индекса DALY на территории Российской Федерации реализован впервые.

Ключевые слова: социально-экономический ущерб, прогнозирование, индекс DALY, Крымская геморрагическая лихорадка.

V.B.Kirillov, S.L.Kirillova, S.V.Borisevich, E.P.Lukin, P.A.Grabarev

Forecasting of the Socio-Economic Damage Resulting from Outbreaks of Infectious Diseases, by the Example of Crimean Hemorrhagic Fever

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

Objective of the study was to develop a method of assessment and forecasting of socio-economic damage inflicted by the outbreaks of infectious diseases using DALY index by the example of Crimean hemorrhagic fever. WHO expert-designed DALY index was adapted for use in the territory of the Russian Federation with due account of GDP values and age distribution among the population. Put forward was a scheme for prognostication of a possible social damage caused by infectious disease outbreak, expressed in the aggregate number of wasted years of productive life and economic loss resulted from GDP decrement. The method developed can be used for forecasting of socio-economic damage inflicted by the outbreaks of infectious diseases and evaluation of effectiveness as regards anti-epidemic and therapeutic interventions. Carried out has been assessment of economic and social losses which resulted from outbreaks of Crimean hemorrhagic fever in the Southern Federal District of Russia inclusive of the data on morbidity rates over the period of 1999–2010. Major economic damage is factored by the labor forces loss consequent to fatal cases of infection. Such a method of prognostication based on DALY index has been implemented in the territory of the Russian Federation for the first time ever.

Key words: socio-economic damage, forecasting, DALY index, Crimean hemorrhagic fever.

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) по эпидемическим проявлениям в настоящее время актуальна для южных регионов европейской части Российской Федерации (РФ). Общее число зарегистрированных случаев за весь период изучения КГЛ (1943–2012 гг.) составило более 7930, из них 2180 (27,5 %) – в РФ, 1469 (18,5 %) – на территории сопредельных государств [1]. С 1999 по 2010 год в Южном Федеральном округе (ЮФО) РФ зарегистрировано 1402 больных КГЛ, из них у 63 (4,5 %) заболевание закончилось летальным исходом. Регистрация новых очагов, активные миграционные процессы с высоким риском заноса возбудителя на неэндемичные территории усиливают остроту проблемы [2, 4].

Население страны формирует самый важный ее ресурс, являясь основой будущего экономическо-

го роста и научно-технического развития. Вспышки и эпидемии инфекционных болезней приводят к утрате трудовых ресурсов и снижению показателей социально-экономического развития субъектов РФ и страны в целом.

В настоящее время в соответствии с принятыми методиками социально-экономические потери измеряют затратами на компенсацию и проведение мероприятий вследствие гибели, травмирования и заболевания персонала и третьих лиц. При этом затраты, связанные с гибелью персонала, как правило, состоят из расходов по выплате пособий в случае смерти кормильца и на погребение погибших. Затраты, связанные с травмированием и заболеваниями персонала, определяют путем суммирования расходов на выплату пособий по временной нетрудоспособно-

сти, пенсий лицам, ставшими инвалидами и расходов на медицинскую, социальную и профессиональную реабилитацию пострадавшего. Кроме того, при определении социально-экономического ущерба нередко учитывают возмещение морального вреда как пострадавшим, так и их родственникам [3, 5].

Потери от убыли трудовых ресурсов в производственной деятельности в результате гибели одного человека $\Pi_{\text{в.т.р.}}$ рекомендуется определять по формуле 1.

$$\Pi_{\text{в.т.р.}} = H_T \cdot T_{\text{р.д.}}, \quad (1)$$

где H_T – доля прибыли, недоданная одним работающим, руб./день; $T_{\text{р.д.}}$ – потеря рабочих дней в результате гибели одного работающего, принимаемая равной 6000 дней. Показатель H_T определяют исходя из удельных показателей национального (регионального) дохода по данной отрасли промышленности с учетом средней заработной платы на предприятии [5].

Показатели, использованные в формуле 1 при прогнозировании экономического ущерба от возможных чрезвычайных ситуаций, обусловленных вспышками инфекционных болезней, можно определить весьма приблизительно. Меняющийся уровень инфляции, изменения законодательства о размере и порядке выплат пособий по временной нетрудоспособности, отличия в величине пособий в разных хозяйствующих субъектах РФ делают расчеты еще менее точными. Результаты оценки потерь, выполненные разными экспертами, могут оказаться несопоставимыми, т.к. будут учитывать разные наборы показателей.

С помощью разработанной в Центральном НИИ эпидемиологии автоматизированной информационно-аналитической системы расчета показателей экономической значимости инфекционных болезней, использующей их многочисленные экономические характеристики, можно определить экономический ущерб в расчете на один средневзвешенный случай заболевания для значимых в РФ нозоформ. Однако данный методический подход, признанный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и прошедший длительную апробацию, не позволяет прогнозировать ущерб от таких последствий заболевания, как инвалидизация и летальный исход [9, 10].

Специалистами ВОЗ разработан индекс DALY (Disability-Adjusted Life Years), который дает возможность рассчитать потери полноценных лет жизни вследствие временной нетрудоспособности, инвалидности или преждевременной смерти. Величина социально-экономического ущерба вследствие болезни, рассчитанная в зависимости от возраста человека, оценивается количеством утраченных полноценных лет жизни и снижением валового внутреннего продукта (ВВП) в результате преждевременной смерти человека, потери трудоспособности во время болезни и последующей инвалидизации [6, 7, 9].

Целью исследований являлась разработка метода прогнозирования социально-экономического

ущерба от вспышек инфекционных болезней с помощью индекса DALY на примере КГЛ.

Материалы и методы

Потерянные годы полноценной жизни вследствие гибели оценивали с помощью индекса ID (индекс DALY), имеющего размерность (человек/лет). Индекс DALY рассчитывали по формуле 2 [7, 8, 9].

$$ID = -\frac{D \cdot C \cdot e^{-\beta a}}{(\beta + r)^2} \cdot [e^{-(\beta + r)L} \cdot (1 + (\beta + r) \cdot (L + a)) - (1 + (\beta + r) \cdot a)], \quad (2)$$

где D – степень потери здоровья, измеряемая в долях (0 – при отсутствии потери, от 0,1 до 0,9 – при частичной потере здоровья, 1 – при летальном исходе); C – константа, полученная специалистами ВОЗ из экспертных оценок, определявших функцию ценности года жизни, равная 0,162243; β – скорость убывания ценности года жизни, выражаемая в долях от 1, получена специалистами ВОЗ из экспертных оценок, определявших функцию ценности года жизни; r – дисконтная ставка, используемая специалистами ВОЗ для приведения ценности лет жизни к настоящему моменту времени, равная 0,03; a – возраст, в котором происходит утрата здоровья, в годах; L – число лет жизни, утрачиваемых в результате одного случая болезни или смерти.

Для определения количества лет жизни, утрачиваемых в результате одного случая болезни или смерти, использовали данные о средних сроках дожития, рассчитанных относительно показателей ожидаемой продолжительности жизни жителей РФ при рождении, с пятилетним возрастным интервалом (таблица).

В РФ средняя продолжительность жизни у мужчин составляет 61,8 лет, у женщин – 74,2 лет [8]. Так

Распределение населения РФ по возрастным группам и средние сроки дожития

Возрастная группа, лет	Средний возраст, лет	Доля населения	Средний срок дожития, лет
0–4	2	0,054	66,7
5–9	7	0,047	62,7
10–14	12	0,048	58,6
15–19	17	0,065	54,6
20–24	22	0,088	50,6
25–29	27	0,084	46,5
30–34	32	0,075	42,5
35–39	37	0,069	38,5
40–44	42	0,066	34,4
45–49	47	0,082	30,4
50–54	52	0,079	26,4
55–59	57	0,068	22,3
60–64	62	0,041	18,3
65–69	67	0,039	14,3
70 и более	75	0,095	7,8

как количество мужчин и женщин в большинстве возрастных групп (кроме лиц старше 60 лет) отличается незначительно, при расчетах сделано допущение, что средняя продолжительность жизни жителей РФ составляет 68,0 лет.

Исходными данными для прогнозирования социально-экономического ущерба являлось количество заболевших, выздоровевших после болезни, погибших от болезни. Было принято допущение, что все пострадавшие распределены по возрастным группам пропорционально численности возрастных групп.

Оценку потерь здоровья в результате гибели ID_1 производили по формуле 3.

$$ID_1 = \sum_{i=1}^{kl} NLet_i \cdot IDLet_i, \quad (3)$$

где $IDLet_i$ – индекс DALY для i -й возрастной группы, рассчитываемый по формуле 2. Значение $D = 1$. Средний срок дожития L для i -й возрастной группы и ее долю от населения РФ выбирали из таблицы; $NLet_i$ – численность погибших от болезни в i -й возрастной группе; kl – количество возрастных интервалов.

Потерю здоровья ID_2 в результате болезни, завершившейся полным выздоровлением, вычисляли по формуле 4.

$$ID_2 = Ldis \cdot Ndis, \quad (4)$$

где $Ldis$ – средняя длительность заболевания, лет. С учетом всех форм заболевания по степени тяжести и длительно сохраняющейся после выписки из госпиталя астенизации, средняя длительность заболевания КГЛ принята равной 0,088 года (32 сут); $Ndis$ – количество людей, у которых заболевание завершится полным выздоровлением.

Поскольку отдаленные осложнения у переболевших КГЛ неврологического характера в клинической практике не зарегистрированы, потери в результате вспышки болезни рассчитывали как сумму потерь здоровья от гибели больных и потерь от случаев болезни, завершившихся полным выздоровлением.

Социальный ущерб в результате болезни оценивали количеством утраченных лет полноценной жизни по формуле 5.

$$ID_0 = ID_1 + ID_2. \quad (5)$$

Оценку экономического ущерба в результате болезни производили по формуле 6.

$$U = (ID_1 + ID_2) \cdot C_1 + N_{ob} \cdot C_{Dis}, \quad (6)$$

где U – экономический ущерб от вспышки болезни, руб.; $N_{ob} = Ndis + NLet_i$, чел.; C_1 – валовой национальный продукт (ВВП) на душу населения, который в РФ в 2011 г. составил 381,8 тыс. руб. [8]; C_{Dis} – экономический ущерб от геморрагических ли-

хорадок в расчете на один средневзвешенный случай заболевания в РФ, рассчитанный в ценах 2011 г. с учетом инфляции по данным, публикуемым на сайте Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, составил около 86,0 тыс. руб. [8, 10, 11].

Результаты и обсуждение

Рассмотрим результаты прогнозирования ущерба с использованием индекса DALY на примере вспышек КГЛ в ЮФО.

В период с 1999 по 2010 год в ЮФО заболело КГЛ 1402 человека, из них погибло 63 [2]. Экономический ущерб в ценах 2011 г. составил 663,7 млн руб., в том числе на лечение – 120,6 млн руб., от снижения трудовых ресурсов в результате гибели больных – 543,1 млн руб. Таким образом, основной экономический ущерб обусловлен потерей трудовых ресурсов в результате летальных исходов заболевания.

В период 1999–2006 гг., когда при лечении 158 больных была использована только симптоматическая терапия, направленная на коррекцию основных системных и органических нарушений, без использования рибавирина, летальность составила 11,4 %. При лечении 268 больных использовали противовирусный препарат рибавирин, летальность составила 1,5 %. Снижение уровня летальности с 11,4 до 1,5 % в результате применения рибавирина предотвратило гибель 27 человек. Социальный эффект от применения рибавирина – это предотвращенные потери 600 чел./лет.

Достоинством предложенного подхода является тот факт, что прогнозирование ущерба с помощью индекса DALY не требует сбора большого количества статистических данных. Недостатком следует признать приблизительность получаемых результатов в денежном выражении, обусловленную использованием в расчетах средних величин (ВВП на душу населения, экономический ущерб от заболевания в расчете на один средневзвешенный случай), которые необходимо ежегодно корректировать с учетом уровня инфляции. Однако рекомендованные в настоящее время методики тоже дают приблизительные оценки социально-экономического ущерба, т.к. в них приняты следующие допущения: средний возраст и количество лет продуктивной трудовой деятельности одинаковы для всех пострадавших; мужчины старше 60 и женщины старше 55 лет не дают вклад в национальный доход [3, 5].

Предложенный метод может быть использован для оценки экономического эффекта от проведения противоэпидемических и лечебных мероприятий для предотвращения или ликвидации вспышек и эпидемий инфекционных болезней. Для этого необходимы данные о длительности заболевания до полного выздоровления и летальности в результате болезни. Для оценки ущерба от длительных осложнений в результате болезни, приводящих к временному или

пожизненному снижению трудоспособности человека, в формуле 5 необходимо подставить значение коэффициента D, характеризующего степень потери здоровья, и значение длительности осложнений L.

Таким образом, применение индекса DALY позволяет оценивать социально-экономический ущерб от вспышек инфекционных болезней (социальный ущерб – количеством потерянных лет полноценной жизни, экономический ущерб – в денежном выражении), а также прогнозировать возможный экономический эффект от проведения противоэпидемических и лечебных мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко А.М., Трусова И.Н. Заболеваемость Крымской геморрагической лихорадкой в странах Европы, Африки и Азии (1943–2012 гг.). *Эпидемиол. и инф. бол.* 2013; 5:46–9.
2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Харченко Т.В., Ермаков А.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по Крымской геморрагической лихорадке на юге России в 2010 г. и прогноз на 2011 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):13–5.
3. Единая межведомственная методика оценки ущерба от чрезвычайных ситуаций техногенного, природного и террористического характера, а также классификации и учета чрезвычайных ситуаций. М.: ФГУ ВНИИ ГОЧС (ФЦ); 2004. 57 с.
4. Лукин Е.П., Грабаров П.А., Кириллова С.Л., Кириллов В.Б. Возможные пути распространения возбудителя Крымской-Конго геморрагической лихорадки за пределы эндемичных очагов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 4:110–1.
5. Методические рекомендации по оценке ущерба от аварий на опасных производственных объектах. РД 03-496-02. 25 с.
6. Морев М.В., Любов Е.Б. Социально-экономический ущерб вследствие смертности населения от самоубийств. *Экономические и социальные перемены: факты, тенденции, прогноз.* 2011; 6(18):119–30.
7. Ревич Б.А., Сидоренко В.Н. Методика оценки экономического ущерба здоровью населения от загрязнения атмосферного воздуха. Пособие по региональной экологической политике. М.; 2006. 42 с.
8. Россия в цифрах. 2012: Краткий статистический сборник. М.: Росстат; 2012. 573 с.
9. Шаханина И.Л. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 120–36.
10. Шаханина И.Л., Осипова Л.А., Радута О.И. Экономический анализ в практике санитарно-эпидемиологической службы. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2001; 3:58–60.
11. Экономический ущерб от инфекционных болезней в Российской Федерации. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. URL: <http://old.rosпотребнадзор.ru/activity/immunoprof/> (дата обращения 01.12.11).

References

1. Butenko A.M., Trusova I.N. [Morbidity rates for Crimean hemorrhagic fever in European, African and Asian countries (1943–2012)]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2013; 5:46–9.
2. Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Tokhov Yu.M., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A., Kharchenko T.V., Ermakov A.V., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in the South of Russia in 2010 and prognosis for the year of 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):13–5.
3. [Unified Interagency Method of Assessment of the Damage Inflicted by Man-Caused Emergency Situations, Natural Disasters, and Terroristic Acts, as well as Method of Classification and Registration of Emergency Situations]. М.; 2004. 57 p.
4. Lukin E.P., Grabarev P.A., Kirillova S.L., Kirillov V.B. [Possible ways of CCHF agent dissemination beyond the boundaries of endemic foci]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 4:110–1.
5. [Methodological recommendations on evaluation of the damage resulting from accidents at hazardous industrial facilities]. Regulatory Document 03-496-02. 25 p.
6. Morev M.V., Lyubov E.B. [Socio-economic damage in view of suicide mortality rates among the population]. *Econom. Sotsial. Peremeny: Fakty, Tendentsii, Prognoz.* 2011; 6(18):119–30.
7. Revich B.A., Sidorenko V.N. [Method of evaluation of economic damage to public health, caused by air pollution. Guidelines on Environment Policy in the Region]. М.; 2006. 42 p.
8. [Statistics across Russia. 2012: Statistic Digest]. М.: Rosstat; 2012. 573 p.
9. Shakhaniina I.L. [Economic benefit from preventive vaccination]. In: [Vaccines and Vaccination: National Guidelines]. М.: GEOTAR Media; 2011. P. 120–36.
10. Shakhaniina I.L., Osipova L.A., Raduto O.I. [Economic analysis in the work of Sanitary-Epidemiological Service]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2001; 3:58–60.
11. [Economic damage inflicted by infectious diseases in the territory of the Russian Federation. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare] (cited 01.12.11). Available from: <http://old.rosпотребнадзор.ru/activity/immunoprof/>

Authors:

Kirillov V.B., Kirillova S.L., Borisevich S.V., Lukin E.P., Grabarev P.A. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defence. Sergiev Possad, Russian Federation.

Об авторах:

Кириллов В.Б., Кириллова С.Л., Борисевич С.В., Лукин Е.П., Грабаров П.А. «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 19.02.14.

Л.Ф.Низоленко, А.Г.Бачинский

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕСУРСНОЙ ГОТОВНОСТИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ
К ОТРАЖЕНИЮ БИОТЕРРОРИСТИЧЕСКОЙ АТАКИ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово,
Российская Федерация*

Цель данной публикации – на примере Новосибирской области проиллюстрировать возможность исследования обеспеченности города/региона ресурсами, необходимыми для противодействия масштабным эпидемиям острых инфекционных заболеваний, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций, таких как натуральная оспа, сибирская язва, чума, геморрагические лихорадки Эбола, Марбург, Ласса, Крымская-Конго. Исследование проводится с помощью разработанной в ГНЦ ВБ «Вектор» универсальной модели локальных, то есть развивающихся в замкнутой популяции, эпидемий/высышек. Результаты моделирования динамики эпидемий позволяют предположить, что в случае массового заражения населения Новосибирской области, ее ресурсов достаточно для борьбы со вспышками туляремии, сибирской язвы, лихорадок Марбург и Крымской-Конго. Для борьбы с эпидемиями оспы, чумы, лихорадок Эбола и Ласса потребуется широкомасштабная федеральная поддержка.

Ключевые слова: эпидемия, особо опасные инфекции, математическая модель, меры противодействия.

L.F.Nizolenko, A.G.Bachinsky

Universal Local Epidemic Model and Its Usage in the Assessment of Novosibirsk Region Resource Preparedness to a Bioterrorist Attack*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation*

Objective of the study is to substantiate the possibility to assess local/regional resource capacity needed for a large-scale epidemic response as concerns emerging infectious diseases caused by pathogenic agents of particularly dangerous infections, such as smallpox, anthrax, plague, and Ebola, Marburg, Lassa, Crimean-Congo fevers. Investigations are conducted using a designed at the SRC VB "Vector" universal local epidemic/outbreak (developing within a closed population) model. The results of epidemic dynamics modeling suggest that in case of mass infection of the population in the Novosibirsk Region its resources are well sufficient for tularemia, anthrax, and Marburg and Crimean-Congo fever outbreak control. Response measures for smallpox, plague, Ebola and Lassa fever epidemic control will require additional large-scale federal support.

Key words: epidemic, particularly dangerous infections, mathematical model, response measures.

Материалы и методы

В ГНЦ ВБ «Вектор» разработана универсальная модель, описывающая развитие вспышек и эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных [5] инфекций. Подробное описание модели и данные о ее верификации опубликованы ранее [1, 2, 7]. Модель реализована в виде компьютерной программы, снабженной WEB-интерфейсом, и размещена на сервере (<http://vector.nsc.ru:81>, а также на сайте <http://vector-epimod.ru>).

Важнейшим показателем, определяющим развитие эпидемий, является коэффициент репродукции возбудителя (среднее число инфицируемых от одного больного, R_0), который зависит от многих факторов, таких как контагиозность возбудителя, плотность популяции (число контактов больного), длительность инфекционного периода и т.д. Так, несмотря на высокую контагиозность возбудителя чумы, инфекционный период этого заболевания составляет считанные дни и даже часы [8], и в результате значение R_0 для него задается достаточно низким (таблица). В случае лихорадки Крымская-Конго (ККГЛ), передающейся через укусы клещей либо контакта с кровью

больного, этот показатель установлен еще ниже. Для других геморрагических лихорадок R_0 значительно выше именно из-за продолжительности инфекционного периода. Для туляремии и сибирской язвы, при которых прямая передача от человека к человеку отсутствует, этот коэффициент принят равным нулю.

Для всех инфекций число исходно инфицированных задается равным 500 (массовая террористическая атака). Все они поступают в популяцию в начале латентной стадии заболевания. Кроме того, зараженной оказывается некоторая территория, на которой люди могут инфицироваться и позднее. То есть в начальный момент времени возникает дополнительный внешний источник инфекции, вызывающий заражение 50 человек в сутки, активность которого самопроизвольно (без мер противодействия) снижается на 10 % в сутки.

Остальные условия моделирования реализуют сценарии, которые можно назвать умеренно оптимистическими, а именно: комплекс противоэпидемических мероприятий (ПЭМ) развертывается в минимальные разумные сроки [2, 7]; при целесообразности массовой вакцинации, она также проводится весьма оперативно: сразу после получения лабора-

торного подтверждения диагноза, в течение 5 дней может вакцинироваться до 80 % населения; имеется ряд ресурсных ограничений (численности медперсонала, мест изоляции больных, контактных и подозрительных, числа пунктов массовой вакцинации и числа вакцинируемых в каждом из пунктов в день, а также запаса лекарств и вакцины).

Параметры при моделировании соответствуют условиям Новосибирской области: население – 2665911; доля городского населения – 77 % [6]; число медицинских работников, занятых в ликвидации эпидемии – 2130; число мест строгой изоляции – 905; число мест в провизорных госпиталях – 2450; число мест в изоляторах для контактных – 1060 [3]. Расчеты проводились на интервале 100 дней с момента появления в популяции первично инфицированных лиц.

Результаты и обсуждение

Моделирование проводилось для следующих двух вариантов развития событий:

- После введения жесткого режима ПЭМ снимаются все ресурсные ограничения, поскольку предполагается, что эпидемия становится чрезвычайной ситуацией и требует полной мобилизации сил. Так что недостающие места для изоляции больных и контактных организуются на базе имеющихся в регионе медицинских учреждений, а также за счет развертывания полевых госпиталей. Недостающие материальные ресурсы и квалифицированный персонал доставляются из соседних регионов.

- Ресурсные ограничения не снимаются до конца расчетов, то есть внешняя помощь и мобилизация дополнительных ресурсов отсутствует.

Исходные значения коэффициента R_0 определялись для условий высокой плотности населения, то есть городской популяции. Поскольку доля городского населения в Новосибирской области по имеющимся данным составляет 77 %, параметр R_0 при моделировании заменялся параметром $R_N = R_0 \cdot 0,77$.

Влияние обеспеченности ресурсами определялось тем, наступало ли их серьезное истощение к моменту реализации жесткого режима ПЭМ, когда для первого варианта снимаются все ресурсные ограничения.

Как видно из данных таблицы, ресурсов Новосибирской области достаточно для реализации первых двух этапов противодействия эпидемиям всех инфекций кроме натуральной оспы. Дефицит мест изоляции заболевших и лиц, подозрительных на соответствующее заболевание, возникает за 2–4 дня до начала ПЭМЗ и не успевает оказать значительного влияния на развитие эпидемии. Однако для ряда инфекций к моменту развертывания третьего этапа ПЭМ ресурсы региона оказываются полностью исчерпанными. Если в случаях вспышек заболеваний, для которых вероятность передачи непосредственно от человека к человеку низка или отсутствует совсем (туляремия, сибирская язва и лихорадка Марбург и

Крымская-Конго) недостаток ресурсов не сказывается на развитии и последствиях эпидемии, то для других инфекций дефицит оказывается фатальным. В случаях оспы и чумы без снятия ресурсных ограничений эпидемии затухают просто из-за истощения чувствительных лиц в популяции (таблица), для лихорадки Ласса вспышка активно развивается и к со- тому дню расчетов, а для лихорадки Эбола она хоть и заканчивается, но инфицированных оказывается почти в полтора раза больше.

Чтобы выявить какие из ресурсов оказывают наибольшее влияние на эффективность борьбы со вспышками этих заболеваний, для каждого из них рассчитан еще ряд сценариев, при которых объем одного или нескольких ресурсов с первого дня был задан очень большим, так, чтобы дефицита по нему не возникало на всем протяжении расчетов. Прочие же ресурсы соответствовали ситуации в Новосибирской области. Сравнивалось количество инфицированных за весь период моделирования.

В случае с эпидемией чумы определяющей для противодействия оказалась возможность оперативно изолировать контактных лиц (при наличии неограниченного числа медицинских бригад для их поиска и мест изоляции инфицировано оказалось всего 7716 человек). Изоляция больных даже в случае, когда для ее осуществления хватало как мест, так и медбригад, хотя и обеспечивала заметное снижение количества инфицированных, но число их достигало 47141. Разница объясняется тем, что в модели для чумы принята по умолчанию очень высокая скорость инфицирования контактных: 40 %. Изоляция подозрительных на динамику вспышки влияла незначительно.

В борьбе с эпидемией оспы наиболее важным выглядит наличие достаточного числа мест изоляции больных, но лишь при условии, что изоляция будет проводиться оперативно (одновременное отсутствие дефицита по числу медицинских бригад). При этом число инфицированных снижалось почти на два порядка и составляло 14471 человек. Если же беспрепятственно и оперативно изолировались еще и контактные, число инфицированных составляло 8304 и оказывалось даже ниже, чем приведенное в таблице для случая, когда ресурсные ограничения снимаются после введения режима ПЭМЗ. Возможность изоляции подозрительных не оказывала существенного влияния на развитие эпидемии. Сценарий, в котором количество мест изоляции и численность медперсонала соответствовали условиям Новосибирской области, но оперативно проводилась массовая вакцинация 80 % населения, также обеспечивал значительное, хотя и не столь радикальное улучшение ситуации – инфицировано оказывалось 48380 человек. Таким образом, учитывая разницу в материальных затратах на содержание мест изоляции и вакцинацию, именно массовая вакцинация по-прежнему остается оптимальной мерой противодействия эпидемии натуральной оспы (конечно, при наличии за-

Результаты моделирования вспышек особо опасных инфекций в Новосибирской области

Результаты моделирования	Заболевание							
	Оспа	Чума	Туляремия	Сибирская язва	Геморрагические лихорадки			
					ККГЛ	Ласса	Марбург	Эбола
Среднее число инфицируемых от одного больного (R_N)	6,1	2,3	0	0	0,6	7,7	7,7	2,3
День начала ПЭМ1/ ПЭМ2/ ПЭМ3	17/22/27	3/5/10	5/10/15	4/9/14	17/22/27	15/20/25	18/23/28	10/15/20
День начала массовой вакцинации	22	Нет	10	9	Нет	Нет	Нет	Нет
День возникновения дефицита								
мест изоляции больных	23	13	Нет	Нет	24	32	Нет	19
мест изоляции подозрительных	21	37	11	10	24	21	24	17
мест изоляции контактных	22	7	Нет	Нет	Нет	21	Нет	Нет
медбригад	22	10	11	9	Нет	20	Нет	19
пунктов вакцинации	22	Нет	10	9	Нет	Нет	24	Нет
вакцины	25	Нет	13	12	Нет	Нет	Нет	Нет
лекарств	27	22	Нет	Нет	25	31	Нет	24
Ресурсные ограничения снимаются после введения жесткого режима ПЭМ								
Инфицировано	10804	6880	766	745	2252	6388	978	2666
Умерли	1755	5772	31	304	649	724	177	1619
Дней карантина	58	61	0	0	0	67	35	68
Ресурсные ограничения сохраняются после введения жесткого режима ПЭМ								
Инфицировано	1096755*	2659414*	766	745	2255	399578	987	3080
Умерли	64087	2505465	32	305	649	27582	179	2372
Дней карантина	73**	90**	0	0	0	75**	45	72

*Эпидемия заканчивается только после того, как число чувствительных лиц в популяции исчерпано.

**Карантин не снят к сотовому дню расчетов.

пасов вакцины).

Для геморрагических лихорадок возможность быстро (число медбригад) и беспрепятственно (число мест изоляции) изолировать заболевших также является решающим фактором. В случае лихорадки Эбола отсутствие ограничений только по этим двум показателям приводило к полному завершению вспышки и снятию карантина еще до конца расчетов. Инфицировано оказывалось 2654 человека. В случае лихорадки Ласса при тех же условиях к сотовому дню вспышка была также подавлена. Общее число инфицированных составляло 6025, а возможность беспрепятственно изолировать еще и контактных лиц снижала число инфицированных еще примерно на 1000. Возможность изоляции подозрительных, как и прежде, на развитие эпидемий влияла незначительно. Таким образом, эта мера при противодействии массовой вспышке заболеваний служит скорее отрицательным фактором, оттягивающим на себя людские и материальные ресурсы.

Результаты моделирования позволяют предположить, что в случае массового инфицирования, при условии своевременного осуществления комплекса противоэпидемических мероприятий, ресурсов Новосибирской области достаточно для осуществления борьбы со вспышками сибирской язвы, туляремии, лихорадок Марбург и Крымской-Конго. Для борьбы с эпидемиями оспы, чумы, лихорадок Эбола и Ласса дополнительные ресурсы жизненно необходимы. В случае эпидемии чумы решающим факто-

ром оказывается возможность оперативной изоляции контактных лиц, а для оспы и геморрагических лихорадок – изоляция заболевших. Во всех случаях необходимым условием для успешного противодействия является также наличие квалифицированного персонала и медицинских бригад для поиска больных и контактных.

Естественно, все рассуждения справедливы с точностью до набора параметров модели, которые пользователь – специалист в области эпидемиологии – может редактировать по своему усмотрению.

Работа частично поддержана из средств федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации 2009–2014 гг.».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бачинский А.Г. Математическая модель локальной эпидемии натуральной оспы с учетом мер противодействия и ресурсных ограничений. В кн.: 30 лет после ликвидации оспы: исследования продолжаются. Кольцово: Информ-Экспресс; 2010. С. 253–80.
2. Бачинский А.Г., Низоленько Л.Ф. Универсальная модель локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:44–7.
3. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения Новосибирской области в 2012 году». URL: <http://54.rosпотребнадзор.ru/documen/> (дата обращения 30.10.2013).
4. Низоленько Л.Ф., Бачинский А.Г. Определение влияния фактора изоляции при моделировании развития эпидемии натуральной оспы в мегаполисе. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 113:29–32.
5. Онищенко Г.Г., Шапошников А.А., Субботин В.Г., Простакишин Г.П., Аветисов Г.М. Обеспечение биологической, химической и радиационной безопасности при террористиче-

ских актах. М.: «МП Гигиена»; 2005. 431 с.

6. Окончательные итоги Всероссийской переписи населения 2010 года. URL: http://www.perepis-2010.ru/results_of_the_census/results-inform.php (дата обращения 30.10.2013).

7. Bachinsky A.G., Nizolenko L.Ph. A Universal Model for Predicting Dynamics of the Epidemics Caused by Special Pathogens. *BioMed Research International*. 2013, Article ID 467078, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/467078.

8. Kool J.L. Risk of person-to-person transmission of pneumonic plague. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40:1166–72.

References

1. Bachinsky A.G. [Mathematical smallpox local epidemic model with due account of response plan and resource limitations]. In: [30 Years after Smallpox Eradication: Investigations Continue]. Kol'tsovo: Inform-Express. 2010. P. 253–80.

2. Bachinsky A.G., Nizolenko L.F. [Universal model of local epidemics development, caused by particularly dangerous infection agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:44–7.

3. State Report on “Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population in the Novosibirsk Region in 2012” [cited 30.10.2013]. URL: <http://54.rospotrebnadzor.ru/documen/>.

4. Nizolenko L.F., Bachinsky A.G. [Evaluation of the Effect of Isolation in the Modeling of Smallpox Epidemic Development in Megacity]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3:29–32.

5. Onishchenko G.G., Shaposhnikov A.A., Subbotin V.G., Prostakishin G.P., Avetisov G.M. [Provision of Biological, Chemical, and Radiological Safety in Case of Bioterrorist Attacks]. М.: “МП Гигиена”; 2005. 431 p.

6. [Final Data on the National Population Census, 2010] (cited 30.10.2013). URL: http://www.perepis-2010.ru/results_of_the_census/results-inform.php.

7. Bachinsky A.G., Nizolenko L.Ph. A Universal Model for Predicting Dynamics of the Epidemics Caused by Special Pathogens. *BioMed Research International*. 2013, Article ID 467078, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/467078.

8. Kool J.L. Risk of person-to-person transmission of pneumonic plague. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40:1166–72.

Authors:

Nizolenko L.F., Bachinsky A.G. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 04.03.14.

А.К.Носков¹, Ю.Н.Трушина¹, А.О.Туранов², Р.В.Адельшин¹, М.А.Хаснатинов³, А.Г.Трухина¹,
Е.И.Андаев¹

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае», Чита, Российская Федерация; ³ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Российская Федерация

Комплексный анализ материалов по эпидемиологии и клинике иксодовых клещевых боррелиозов на территории Забайкальского края за десятилетний период (2003–2012 гг.) показал, что в регионе наблюдается четкая тенденция к росту заболеваемости. Определены неблагополучные по данному заболеванию районы. Наибольшая заболеваемость отмечается в мае–июле среди взрослых мужчин с преобладанием эритемных форм ИКБ. По результатам молекулярно-генетического исследования иксодовых клещей впервые на территории Дульдургинского района установлена циркуляция патогенных для человека видов рода *Borrelia* – *Borrelia garinii*, *B. afzelii*.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, заболеваемость.

A.K.Noskov¹, Yu.N.Trushina¹, A.O.Turanov², R.V.Adel'shin¹, M.A.Khasnatinov³,
A.G.Trukhina¹, E.I.Andayev¹

Clinical-Epidemiological Peculiarities of the Tick-Borne Borrelioses Registered in the Trans-Baikal Territory

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; ²Center of Hygiene and Epidemiology in the Trans-Baikal Territory, Chita, Russian Federation; ³Research Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

Complex analysis of the data on epidemiology and clinical picture of the tick-borne borrelioses in the territory of the Trans-Baikal Region over the last decade since 2003 to 2012 has demonstrated that there is a distinct upward tendency as concerns its morbidity rates. Spotted have been the potentially hazardous, as regards the infection, areas. Highest incidence rates are registered between May–July among adult men, and erythema form of the disease prevails. Based on the results of molecular-genetic investigation of Ixodidae ticks, for the first time ever in the territory of the Dul'durginsk Region identified has been circulation of *Borrelia garinii*, and *B. afzelii*, pathogenic for humans bacterial species of *Borrelia* genus.

Key words: tick-borne borreliosis, morbidity.

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – группа трансмиссивных природно-очаговых инфекционных заболеваний, вызываемых боррелиями, относящимися к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato* и передающихся иксодовыми клещами. Актуальность и необходимость всестороннего изучения ИКБ обуславливаются их широким распространением и высоким уровнем заболеваемости населения. В России ИКБ доминируют среди всех природно-очаговых и зоонозных болезней, ассоциированных с иксодовыми клещами¹. По данным официальной статистики в Российской Федерации ежегодно регистрируется от 6,8 до 9,6 тыс. случаев заболевания людей. С 1992 г. уровень заболеваемости ИКБ имеет устойчивую тенденцию к росту: интенсивные показатели за последние 10 лет колебались от 4,47 (в 2004 г.) до 6,82 (в 2009 г.) на 100 тыс. населения.

Целью данной работы является определение особенностей клинко-эпидемиологических проявлений ИКБ в Забайкальском крае.

¹Коренберг Э.И. Инфекции группы Лайм-боррелиоза – иксодовые клещевые боррелиозы в России. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1996, 3:14–8.

Материалы и методы

Анализ эпидемиологической ситуации, клинических форм и тяжести течения ИКБ проведен на основании материалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае», представленных в Референс-центр по мониторингу за природно-очаковыми болезнями бактериальной и вирусной этиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», включающие сведения о заболеваемости по муниципальным районам Забайкальского края, клинических формах болезни, возрастных группах заболевших и др. Для проведения эпидемиологического анализа использованы 228 карт эпидемиологического обследования больного за период 2003–2012 гг.

Исследовано 227 экземпляров иксодовых клещей *Ixodes persulcatus* и 120 – рода *Dermacentor*, собранных в весенне-летний период 2011–2012 гг. с растений на фланелевый флаг в Дульдургинском, Оловянинском и Борзинском районах Забайкальского края. Для выделения нуклеиновых кислот и последующей реак-

ции обратной транскрипции использованы комплекты реагентов «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-Л» вариант 50 соответственно (Амплисенс, Москва). Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использован набор реагентов «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi* sensu lato-FL» на выявление 16S рНК *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto). Детекция продуктов амплификации осуществлялась с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора «АЛА – 1/4». Затем с положительными пробами была проведена ПЦР с оригинальными праймерами, фланкирующими фрагмент гена 16S рНК длиной 508 п.н. Нуклеотидную последовательность полученных ПЦР-продуктов устанавливали с помощью набора реактивов ABI Prism Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit на секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Редактирование и анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BioEdit v. 7.0.5.3. Идентификацию вида боррелий проводили на основе филогенетического анализа фрагментов гена 16S rRNA методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), модель Jukes-Cantor, программа MEGA 5.

Результаты и обсуждение

Забайкальский край является одной из эндемичных по ИКБ территорий Сибирского федерального округа (СФО). В последнее десятилетие (2003–2012 гг.) в крае сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка по ИКБ, обусловленная ростом заболеваемости населения: темп прироста ($T_{\text{пр}}$) составил 16,9 % (рисунок).

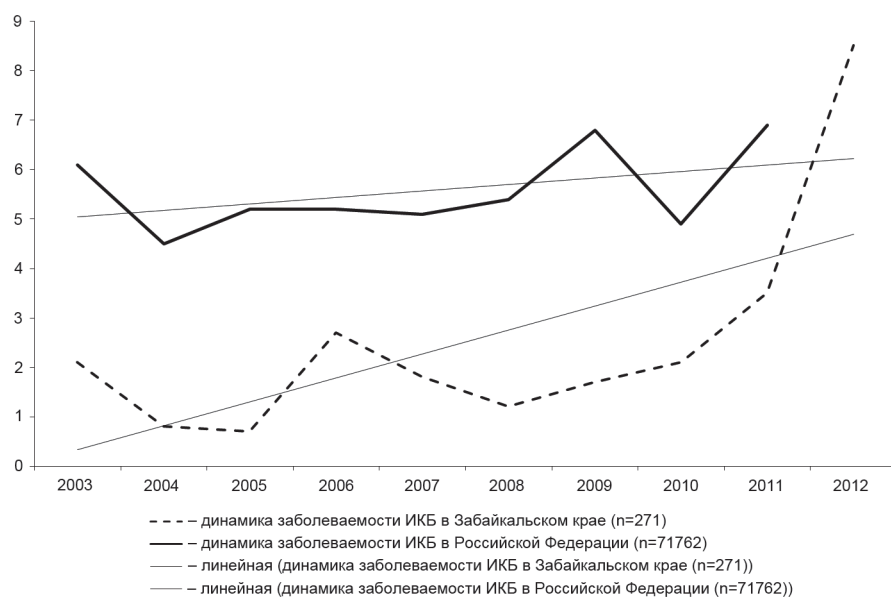
Официальная регистрация ИКБ в Забайкальском крае (до 2008 г. – Читинская область) введена с 1995 г. Лабораторное подтверждение диагноза ИКБ проводится с 1999 г. в лабораториях ФКУЗ «Читинская противочумная станция» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае».

Для проведения оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа с целью своевременного принятия управленческих решений, направленных на профилактику ИКБ, нами была создана ежегодно пополняемая электронная база данных «ГИС. Заболеваемость иксодовыми клещевыми боррелиозами в Забайкальском крае» на основе стандартной программной оболочки Microsoft Office Access, 2007. В базу данных внесены сведения за 2001–2012 гг., включающие отдельными блоками общие данные о пострадавшем; эпидемиологические характеристики заболевания; информацию, характеризующую клиническое течение болезни.

В период 2003–2012 гг. в крае зарегистрирован 271 случай заболевания ИКБ. Ежегодно в рассматриваемый период регистрировалось от 8 (2004 г.) до 95 (2012 г.) случаев с интенсивными показателями 0,8–8,5 ‰ соответственно, средний уровень заболеваемости составил 2,6 ‰, в год максимального подъема – 8,5 ‰.

В течение анализируемого периода заболеваемость распределялась неравномерно. В первой половине (2003–2007 гг.) зарегистрировано $(31,4 \pm 5,03)$ % всех случаев ($n=85$, 1,4 ‰). Во второй половине (2008–2012 гг.) наблюдался рост заболеваемости и расширение ареала ИКБ в Забайкальском крае. В этот период заболело 186 человек, что составило $(68,6 \pm 3,4)$ %, средний интенсивный показатель – 3,7 ‰. Рост заболеваемости, по нашему мнению, связан с совершенствованием диагностики ИКБ по клинко-эпидемиологическим данным и внедрением в повседневную практику современных методов лабораторных исследований.

В 2003–2012 гг. заболеваемость ИКБ в отдельные годы проявлялась в 4–17 эндемичных по этому заболеванию районах края. Заболеваемость ИКБ не регистрировалась в Александрово-Заводском, Забайкальском, Каларском, Калганском, Краснокаменском, Нерчинско-Заводском, Ононском и Дульдургинском районах. Возможно это связано с гипо-



Многолетняя динамика заболеваемости ИКБ в Российской Федерации и Забайкальском крае в 2003–2012 гг. (‰)

**Заболеемость населения Забайкальского края
иксодовыми клещевыми боррелиозами
по муниципальным районам в период 2003–2012 гг.**

Административная территория	Количество заболевших		Показатель заболеваемости, ‰	Число лет регистрации ИКБ
	Всего, абс.	%±m		
Акшинский район	3	1,2±6,03	2,7	1
Балейский район	3	1,2±6,03	2,0	3
Борзинский район	3	1,2±6,03	0,8	2
Газимуро-Заводский район	18	6,6±5,9	18,8	6
Карымский район	7	2,6±5,9	1,9	4
Красночикойский район	25	9,2±5,8	11,8	4
Кыринский район	1	0,4±6,1	0,6	1
Могочинский район	5	1,8±6,01	1,9	3
Нерчинский район	1	0,4±6,1	0,3	1
Оловянинский район	8	2,9±5,9	1,7	5
Петровск-Забайкальский район	21	7,7±5,8	7,2	10
Приаргунский район	2	0,7±6,1	0,8	2
Сретенский район	2	0,7±6,1	0,7	2
Тунгиро-Олекминский район	1	0,4±6,1	6,2	2
Тунгокоченский район	5	1,8±6,01	3,5	3
Улетовский район	3	1,2±6,03	1,4	3
Хилокский район	2	0,7±6,1	0,6	2
Чернышевский район	1	0,4±6,1	0,3	2
Читинский район	30	11,1±5,7	4,9	10
Шелопугинский район	2	0,7±6,1	2,1	1
Шилкинский район	6	2,2±6,0	1,3	2
Агинский район	6	2,2±6,0	1,9	4
Могойтуйский район	5	1,8±6,01	1,8	2
г. Чита	111	40,9±4,7	3,6	10
Всего по Забайкальскому краю	271	100,0	2,6	

Примечание: выделены районы со стабильно высокими показателями заболеваемости.

диагностикой, обусловленной низкой настороженностью медицинского персонала в отношении ИКБ и недостаточной подготовкой сотрудников лабораторий этих муниципальных районов.

Для ретроспективного анализа за десятилетний период с целью выявления основных особенностей ИКБ в Забайкальском крае нами были выбраны административные территории (5 муниципальных образований) со стабильно высоким количеством больных. В оставшихся районах регистрировалась спорадическая заболеваемость ИКБ с проявлениями от одного до пяти случаев за десятилетие, не оказывающая существенного влияния на интенсивность течения эпидемического процесса в крае (таблица).

Анализируя многолетнюю (2003–2012 гг.) заболеваемость ИКБ в Забайкальском крае, необходимо отметить, что на Читинский (краевой центр) приходилось (40,9±4,7) % (111 случаев) от всех случаев. В Чите, Читинском, Красночикойском, Петровск-Забайкальском и Газимуро-Заводском районах зарегистрировано (75,6±3,1) % (205) от всех случаев ИКБ.

Следует учесть, что в Чите на базе травматоло-

гических пунктов функционируют два кабинета профилактики клещевых инфекций, где круглосуточно осуществляется оказание медицинской помощи. В эпидемический сезон пострадавшим от присасывания клещей лицам проводится снятие клеща, при наличии показаний – введение противоклещевого иммуноглобулина (профилактика клещевого энцефалита). В ходе информационно-разъяснительной работы рекомендуется незамедлительное обращение за медицинской помощью в случае появления симптомов болезни. Кроме того, в краевом центре располагаются основные клиники инфекционного профиля, в которых работает высококвалифицированный медицинский персонал, консультацию сложных случаев проводят сотрудники кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия». Лаборатории краевого центра оснащены современным оборудованием, специалисты имеют практический опыт лабораторной диагностики ИКБ.

Читинский, Красночикойский, Петровск-Забайкальский и Газимуро-Заводской районы традиционно являются неблагополучными по природно-очаговым болезням, ассоциированным с иксодовыми клещами, вследствие чего клинико-эпидемиологическая и лабораторная диагностика этой группы заболеваний, в том числе ИКБ, на данных территориях имеет первостепенное значение. Таким образом, если предположить, что в Чите, Читинском, Красночикойском, Петровск-Забайкальском и Газимуро-Заводском районах края заболеваемость ИКБ сформирована за счет высокой выявляемости и настороженности населения, то в остальных районах фактическая заболеваемость, скорее всего, выше официальной. Отсюда следует, что основное количество ИКБ в районах со спорадической заболеваемостью может не диагностироваться и протекать под «маской» других болезней, имеющих сходную клиническую картину.

Основное количество заболевших ИКБ в анализируемой выборке отмечалось в мае–июле (75,6±3,7 %). Пик заболеваемости пришелся на май и июнь, когда было зарегистрировано (28,9±6,4) и (26,2±6,6) % случаев соответственно. Наибольшему риску заражения подвергались люди в возрасте от 18 до 60 лет и старше – (89,1±2,4) %. По возрастным группам существенных отличий не выявлено, однако следует отметить, что более высокая заболеваемость регистрировалась среди лиц 50–59 (22,7±8,5 %), 18–29 (20,5±6,7 %) и 40–49 (18,8±6,8 %) лет. Мужское население (66,5±4,4 %) болело значительно чаще женского – (33,5±6,1) %. Заболеваемость городского населения (64,8±4,5 %) почти в два раза превышала заболеваемость сельского – (35,2±6,1) %, причем среди городского населения чаще болели жители краевого центра – (89,5±3,03) %, из которых (57,8±6,4) % – неработающее население, пенсионеры, учащиеся школ, предприниматели, студенты и лица, профессиональная деятельность которых связана с энергообеспечением края. Эти категории городского насе-

ления, равно как и сельские жители, активно посещают природные биотопы в доступной отдаленности от мест проживания с целью сбора дикоросов, сельскохозяйственных работ на приусадебных участках, отдыха в лесных массивах, на открытых водоемах и по роду профессиональной деятельности. Природные биотопы с бытовыми целями посещало подавляющее большинство ($96,1 \pm 1,5$ %) заболевших ИКБ, и лишь немногие (3,9 %) связывали свое заболевание с профессиональной деятельностью. Дети в возрасте от 0 до 6 лет заболевали в ($1,1 \pm 7,5$ %) случаев, их заражения связывались с присасыванием клещей на территориях дачных кооперативов и приусадебных участков частного жилого сектора (100 %).

Большинство больных – ($98,2 \pm 1,03$ %) – связывали свое заболевание с присасыванием клещей и только три человека (1,8 %) отрицали этот факт. Следует отметить, что в ($29,5 \pm 6,3$ %) случаев нападения клещей происходили на территориях населенных пунктов в местах постоянного проживания заболевших, вследствие чего можно высказать предположение о наличии в них антропоургических очагов ИКБ, что, в свою очередь, требует дальнейшего изучения. Кроме того, 6,8 % людей заболели после присасывания клещей на эндемичных территориях других субъектов РФ (республики Бурятия (9) и Хакасия (1), Хабаровский край (1) и Иркутская область (1)).

Длительность инкубационного периода варьировала от нескольких часов до 58 суток. Группировка выборки показала, что у ($34,7 \pm 6,1$ %) больных инкубационный период длился от 7 до 13 суток, у ($31,8 \pm 6,2$ %) – до 6 сут, у ($18,2 \pm 6,8$ %) – от 14 до 20 суток. Более 21 сут инкубационный период длился в ($7,9 \pm 7,2$ %) случаев. Статистических различий между тяжестью течения болезни, локализацией единичных присасываний клещей и длительностью инкубационного периода не выявлено. Статистически достоверно ($P < 0,05$; $t = 3,34$; $df = 154$) установлено, что продолжительность инкубационного периода от нескольких часов до 6 дней вероятнее при множественных укусах клещами ($63,6 \pm 14,5$ %), чем при единичных ($28,5 \pm 3,8$ %) любой локализации.

По клиническому течению в крае за анализируемый период преобладала эритемная форма болезни – ($70,5 \pm 4,1$ %), безэритемная встречалась в ($28,9 \pm 6,4$ %). По тяжести течения болезни средняя степень диагностировалась в ($65,9 \pm 4,4$ %); легкая – в ($33,5 \pm 6,1$ %) случаев; тяжелая – не регистриро-

валась. В 6 ($3,4 \pm 7,4$ %) случаях зарегистрирована микст-инфекция: клещевой вирусный энцефалит и ИКБ, при этом заболевание протекало со средней степенью тяжести в 4 (66,7 %) случаях, по одному случаю (по 16,7 %) зарегистрировано тяжелое и легкое течение.

При исследовании в ПЦР иксодовых клещей ДНК боррелий выявлена у 10 % особей *Ixodes persulcatus*, собранных на территории Национального парка «Алханай» (Дульдургинский район). Анализ фрагмента гена 16S рРНК показал, что на территории этого района циркулируют два патогенных для человека вида боррелий – *B. garinii*, *B. afzelii*.

Таким образом, в период 2003–2012 гг. на территории Забайкальского края, являющейся эндемичной по ИКБ, регистрировался рост заболеваемости среди населения с темпом прироста 16,9 %. Наиболее неблагополучными являлись Читинский, Красночикойский, Петровск-Забайкальский, Газимуро-Заводский муниципальные районы и г. Чита. Основное количество заболевших отмечалось в мае-июле среди людей в возрасте от 18 до 60 лет и старше, мужчин, городских жителей, неработающих, пенсионеров, учащихся школ, предпринимателей, студентов и лиц, профессиональная деятельность которых связана с энергообеспечением края. По клиническому течению преобладали эритемные формы болезни. Впервые установлено генетическое разнообразие боррелий на территории Дульдургинского района и показана зараженность клещей *Ixodes persulcatus* патогенными для человека видами рода *Borrelia* – *B. garinii*, *B. afzelii*.

Authors:

Noskov A.K., Trushina Yu.N., Adel'shin R.V., Trukhina A.G., Andaev E.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Turanov A.O. Center of Hygiene and Epidemiology in the Trans-Baikal Territory. Chita, Russian Federation.

Khasnatinov M.A. Research Center of Family Health and Human Reproduction Problems. Irkutsk, Russian Federation.

Об авторах:

Носков А.К., Трушина Ю.Н., Адельшин Р.В., Трухина А.Г., Андаев Е.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Туранов А.О. Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае. Чита, Российская Федерация.

Хаснатинов М.А. Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека. Иркутск, Российская Федерация.

Поступила 03.06.13.

В.В.Сунцов¹, Н.И.Сунцова³, А.Н.Матросов², А.А.Кузнецов², Данг Туан Дат⁴, Лыонг Тхи Мо³,
А.А.Слудский², Е.В.Куклев², М.А.Тарасов², И.А.Касьян², Н.В.Майоров², Т.С.Астахова⁵

АНТРОПОУРГИЧЕСКИЕ ОЧАГИ ЧУМЫ ВЬЕТНАМА: ПРОШЛОЕ И НАСТОЯЩЕЕ

¹ФБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова», Москва, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Российско-Вьетнамский тропический центр, Хошимин, Вьетнам; ⁴Институт гигиены и эпидемиологии Тайнгуен, Буонматхуот, Вьетнам; ⁵Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

В обзоре приведены результаты эколого-эпизоотологических и эпидемиологических исследований по чуме на территории Социалистической Республики Вьетнам в 1989–2012 гг. Изучена структура эпизоотической триады носитель-переносчик-возбудитель. В условиях влажного субэкваториального климата существование природных очагов чумы в зоне тропических лесов или саванн маловероятно. Основным носителем возбудителя на плато Тайнгуен является синантропная малая крыса *Rattus exulans*. На дикоживущих крысах рода *Rattus*, мышах и бандикотах нет специализированных блох, а численность прочих видов низка. Из эффективных переносчиков чумы известны лишь 2 вида блох рода *Xenopsylla*. *X. vexabilis* (переносчик только в бывших природных очагах на Гавайских островах) – узкоареальный вид, паразитирующий на дикоживущей малой белозубой крысе *Berylmys berdmorei* только в сухой сезон, на синантропных грызунах не встречается. *X. cheopis* – многочисленный космополитный вид африканского происхождения, паразитирующий круглогодично на крысах и насекомых в населенных пунктах, в природных биотопах не встречается. Показано, что все компоненты паразитарной системы чумы относятся к интродуцированным видам. Сделан вывод, что очаги чумы во Вьетнаме являются антропоургическими, имеют исключительно антропогенное происхождение. Заболевания чумой людей в стране отмечали с 1898 по 2002 год. Наиболее стойкие очаги длительно функционировали на территории низкогорного плато Тайнгуен. Несмотря на снижение эпизоотической активности очагов на территориях бывших эндемичных по чуме провинций в современный период необходимо продолжение эпизоотологического мониторинга.

Ключевые слова: антропоургический очаг чумы, носители и переносчики возбудителя чумы, эпизоотологический мониторинг.

V.V.Suntsov¹, N.I.Suntsova³, A.N.Matrosov², A.A.Kuznetsov², Dang Tuan Dat⁴, Lyong Thi Mo³, A.A.Sludsky²,
E.V.Kouklev², M.A.Tarasov², I.A.Kas'yan², N.V.Mayorov², T.S.Astakhova⁵

Anthropourgic Foci of Plague in Vietnam: Past and Present

¹A.N Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Moscow, Russian Federation; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ³Russian-Vietnamese Tropical Center, Ho Chi Minh City, Vietnam; ⁴Thai Nguyen Institute of Hygiene and Epidemiology, Buôn Ma Thuột, Vietnam; ⁵Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

The review contains the results of ecological-epizootiological and epidemiological investigations of plague in the territory of the Socialist Republic of Vietnam in 1989–2012. Studied has been the structure of epizootic triad – carrier-vector-pathogen. There is a low probability of plague foci occurrence in zones of tropical forests and savanna under the conditions of humid subequatorial climate. Main plague agent carrier on the Thai Nguyen Plateau is the synanthropic little rat, *Rattus exulans*. Specialized fleas species are absent on wild-living rats *Rattus* genus, as well as mice, and bandicoots, and the abundance of other species is small. It has been demonstrated that all the elements of the parasitic plague system are classified as introduced species. Thereupon it is inferred that plague foci in Vietnam are anthropourgic and are of anthropogenic origin solely. Plague cases in humans across the territory of the country were registered between 1898 and 2002. The most persistent ones functioned on the Thai Nguyen Plateau. Although epizootic activity of the foci in territory of the former endemic provinces has decreased, it is necessary to continue epizootiological monitoring further on in the modern period.

Key words: anthropourgic focus of plague, plague agent carriers and vectors, epizootiological monitoring.

Третья пандемия чумы началась в Юго-Восточной Азии в Гонконге и Кантоне в 1894 г., охватив к концу XIX – началу XX веков более 80 крупнейших морских и речных портов мира, и во многих странах проникла вглубь континентов [23]. Из Гонконга возбудитель чумы с синантропными крысами, как полагают, морским путем проник на территорию Вьетнама: в 1898 г. сначала в г. Нячанг, а в 1906 г. – в Сокчанг в дельте Меконга и Сайгон [32]. Далее, к 1921 г. заболевшие люди стали встречаться по всей территории

страны, вплоть до северной границы с Китаем. В 1943 г. возбудитель проник вглубь страны на плато Тайнгуен. В основном регистрировали заболевания бубонной формы, но в 1911, 1915, 1925 и 1965 гг. возникли вспышки легочной чумы [24, 36].

Открытие в 1894 г. возбудителя чумы А.Иерсином положило начало фундаментальным исследованиям этой инфекции. В 1896 г. крупные вспышки заболеваний чумой были зарегистрированы в Индии. Это потребовало объединения усилий ученых всего

мира: была создана международная Индийская комиссия. Ее выводы о связи чумы с синантропными крысами, бандикотами и паразитирующей на них блохой *Xenopsylla cheopis* имели большое научное и практическое значение, обозначив основные направления борьбы с этой опасной инфекцией [37]. Позднее, с середины XX века, истоки третьей пандемии стали связывать с природными очагами чумы на Индостанском полуострове, где возбудитель циркулирует в естественных условиях в популяциях индийской песчанки *Tatera indica* и паразитирующей на ней блохи *X. astia* [1, 6, 12, 19, 35].

На территории Вьетнама чуму с некоторыми перерывами регистрировали с 1898 по 2002 год [26]. При этом чередовались годы выявления единичных sporadических заболеваний с периодами групповой и вспышечной заболеваемости (до нескольких тысяч больных). Самый высокий уровень заболеваемости отмечен во время и после американской оккупации юга страны – в 1965–1979 гг., когда был зарегистрирован 70891 случай (90 % от всей заболеваемости в мире). В последующий период уровень заболеваемости снизился: в 1980–1989 гг. число заболевших составило 1548 человек. Столь длительные сроки эпидемических проявлений чумы, регулярность заражения людей поставили вопрос об их причинах. Стали подозревать наличие на территории Вьетнама природных очагов и заражение людей при контакте с дикими животными [1, 2, 7, 30].

В хронологии распространения чумы во Вьетнаме прослеживается ее завоз в портовые города (1898–1960 гг.), распространение вдоль морского побережья (1960–1989 гг.) с последующим закреплением в глубинных районах страны (1964–2002 гг.) [23, 36]. Проникновение возбудителя в сельские провинции, расположенные на низкогорном плато Тайнгуен, привело к его стойкому укоренению в этом регионе. Больные чумой регулярно регистрировались здесь на протяжении 38 лет, в то время как остальная территория была свободной от чумы [31, 32]. Большинство заболеваний протекало в бубонной форме. В результате комплексных исследований эпизоотологии и эпидемиологии этой болезни в 1989–2012 гг. на базе Российско-Вьетнамского Тропического центра получены данные о функционировании антропоургических очагов во Вьетнаме, отсутствии здесь первичных природных очагов чумы и невозможности ее вторичного укоренения в естественных биоценозах [15, 16].

Материалы и методы

Исследования очагов чумы на территории Вьетнама провели в 1989–2012 гг. зоологическими, эпизоотологическими, бактериологическими, иммунологическими и эпидемиологическими методами. Основной объем работ был выполнен на территории плато Тайнгуен, где высокую заболеваемость людей чумой длительное время регистрировали в 4 провин-

циях: Контум, Залай, Даклак и Ламдонг (рис. 1). При сборе эпидемиологических данных, помимо собственных наблюдений, использовали официальные сведения о заболеваемости людей, литературные и архивные источники.

Всего за период работ было накоплено 62230 ловушко-суток, отловлено 6932 мелких млекопитающих 32 видов и собрано 6252 блохи 42 видов. Мелких млекопитающих ловили сетчатыми живоловками с приманкой: маниоком, бататом, вяленой рыбой или хлебом с растительным маслом. Блох собирали при очесе грызунов и насекомых, а в домах также в кюветы с водой и на клеевые листы. В лабораторных условиях на чуму исследовали 1532 диких и 3096 синантропных мелких млекопитающих, преимущественно крыс.

Для бактериологического исследования носителей делали мазки со срезов печени и селезенки на поверхность агаровых пластинок в чашках Петри. Добытых блох растирали в ступке, полученные эмульсии рассевали на агаровые пластинки. Использовали селективные питательные среды французского производства (Agar Brain Heart Infusion, Cat. № 64174, Diagnostics Pasteur, Deoxycholate Agar 1 %, Cat. № 64424, Bouillon Brain Heart infusion, Cat. № 64014). Для идентификации выросших ко-

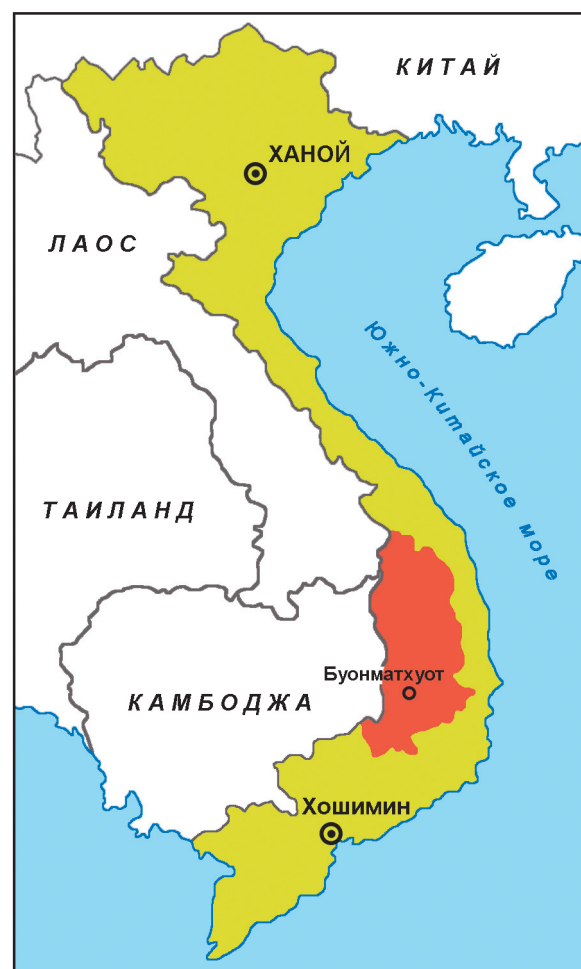


Рис. 1. Район исследований в очагах чумы на плато Тайнгуен во Вьетнаме в 1989–2012 гг.

лоний использовали световой микроскоп, колонии просматривали в проходящем свете. При серологическом исследовании крови мелких млекопитающих для поиска антител к возбудителю чумы применяли методы РПГА и РНАГ.

В начальный период были проведены исследования фауны и экологии потенциальных носителей и переносчиков в природных биотопах тропических лесов и саванн в южном Вьетнаме, где возбудитель чумы не обнаружен [16, 20]. В последующие годы внимание было сосредоточено на населенных пунктах, где отмечались эпизоотии чумы в популяциях синантропных крыс и болели люди [4, 5]. Изучали фауну, динамику численности, распределение и подвижность мелких млекопитающих и их блох, количественные параметры эпизоотического процесса, вопросы эпидемиологии чумы в населенных пунктах на плато Тайнгуен [8, 9, 11, 13, 21].

Результаты и обсуждение

Общая площадь Вьетнама составляет 331,2 тыс. кв.км, а численность населения – 90,6 млн человек. Административно страна делится на 62 провинции. Средняя плотность населения – 273,4 чел./кв.км, большая его часть (70 %) – сельские жители.

Данные исследования проводили в южных провинциях в границах системы горных плато Тайнгуен, располагающейся между 11 и 15° северной широты вдоль границ с Камбоджей и Лаосом полосой с севера на юг 130 на 400 км, общей площадью 56 тыс. кв. км. Основной объем работ выполнен в провинции Даклак, характеризующейся субэкваториальным климатом с ярко выраженным сухим периодом продолжительностью до 6 месяцев [3]. Наиболее плотно населен развитый в хозяйственном отношении юг плато, где в некоторых уездах плотность населения достигает 130–180 чел./кв.км. Большинство населения проживает в сельской местности. Коренные народности здесь представлены индонезийской группой: зарай, эдэ, тямы и мыонги. В 1980–2000 гг. наблюдался значительный приток населения с севера (преимущественно вьетов), что привело к возникновению и росту населенных пунктов, а общая численность населения удвоилась. В этот период здесь преобладали поселки с ветхими деревянными жилыми строениями. Постройки с прилегающими земляными участками изобиловали синантропными грызунами и кровососущими членистоногими-паразитами.

Штаммы возбудителя чумы, выделенные на территории Вьетнама в указанный период, относят к биоварианту *Yersinia pestis orientalis*, который в естественной природе циркулирует на Индостанском полуострове. Они не ферментируют глицерин и обладают нитрифицирующей способностью. У всех штаммов стойко сохраняются такие свойства, как способность ферментировать глюкозу, галактозу, арабинозу, мальтозу, фруктозу, манит и не разлагать лактозу, са-

харазу и рамнозу (в течение первых 2 сут), не образовывать индол и сероводород [27, 33]. Патогенность штаммов, выделенных из разных районов Тайнгуен, варьировала: LD₅₀ для белых мышей составляла от 10² до 10⁶, для морских свинок – 10⁶ КОЕ [25, 28]. В их плазмидном составе присутствуют 3 типичные плазмиды pPst, pCad и pFra [22]. При изучении молекулярно-генетической структуры штаммов, выделенных во Вьетнаме до 1956 и после 1963 гг. было выявлено, что они относятся к разным риботипам – E и G [25], на основании чего можно предполагать наличие нескольких эпидемических этапов заноса и распространения инфекции.

Фауна диких млекопитающих южного Вьетнама представлена лесными и саванными видами [10]. Мелких млекопитающих – специализированных землероев – немного и численность их невелика [30]. В период исследований было отловлено 32 вида мелких млекопитающих. В сборах из лесов и саванн представлены зверьки 24 видов, численность которых составила 6,8 % попадания в ловушки (ПЛ). Преобладала рыжая колючая крыса *Maxomys surifer* (индекс доминирования ИД 62,7 %), относительно высока доля черной *Rattus rattus* (ИД 11,7 %) и малой белозубой *Berylmys berdmorei* (ИД 6,4 %) крыс. В агрокультурной зоне отловлено 11 видов, но численность их здесь была невысокой – 4,2 % ПЛ. Доминировали 3 вида: *R. rattus* (ИД 26,7 %), мыши *Mus cervicular* (19,0 %) и *M. caroli* (ИД 18,1 %). В населенных пунктах отмечено 8 видов мелких млекопитающих, средняя численность составила 13,7 % ПЛ. Доминировали малая *R. exulans* (ИД 62,6 %), гималайская *R. nitidus* (ИД 20,3 %) и черная *R. rattus* (ИД 10,3 %) крысы.

В 1990–2002 гг. возбудитель чумы или антитела к нему обнаружены на плато Тайнгуен в популяциях синантропных крыс *R. exulans* и *R. nitidus*. Численность этих грызунов на очаговых участках в деревнях и небольших поселках плато Тайнгуен составила 15,3 % ПЛ. Численность фоновых лесных видов – *M. surifer* иногда достигала 33,6 % ПЛ, но какой-либо связи их с возбудителем чумы не выявлено.

Со всех осмотренных мелких млекопитающих собрали 4761 блоху, относящихся к 42 видам. Подавляющее число видов блох, обнаруженных на млекопитающих во Вьетнаме, относится к малочисленным, редким или даже экзотическим видам. Это позволяет сделать вывод об отсутствии во влажных тропиках Вьетнама природных очагов чумы. Численность некоторых видов дикоживущих крыс находится на высоком уровне, но блохи на них отсутствуют или крайне малочисленны [14, 20]. В сборах преобладали два вида: *X. cheopis* (ИД 62,2 %) и *X. vexabilis* (ИД 34,3 %). *X. cheopis*, которую именуют восточной, крысиной, домовою блохой, имеет афротропическое происхождение. Ее первичный хозяин (нильская травяная мышь *Arvicanthis niloticus*) относится к африканским Muridae. *X. vexabilis* – эндемик Индокитая – является специфическим паразитом ма-

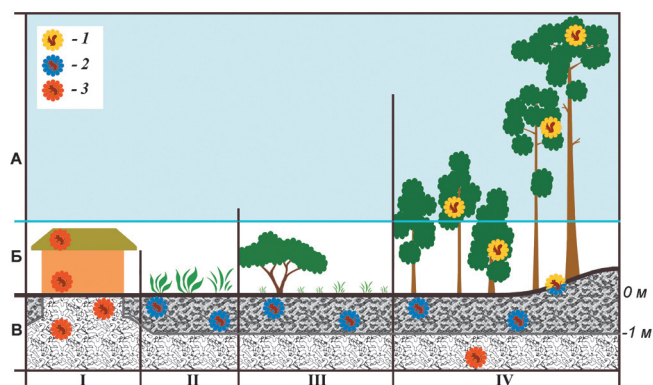


Рис. 2. Схема местообитаний мелких млекопитающих и расположения их гнезд на профиле «населенный пункт–агроценоз–саванна–тропический лес»:

Биотопы: I – населенный пункт; II – агроценозы; III – саванна; IV – тропический лес. Ярусы обитания животных: A – древесных форм; B – древесно-наземных форм; B – специализированных землероев. Типы гнезд: 1 – периодически промокаемые и просыхаемые надземного яруса; 2 – промокаемые подземного яруса; 3 – защищенные от избыточного увлажнения.

лой белозубой крысы, устраивающей глубокие норы в непромокаемых или хорошо дренируемых слоях грунта. Это единственная многочисленная блоха диких млекопитающих в тропических лесах Вьетнама, но численность ее хозяина во всем ареале невелика (менее 1 % ПЛ). Важно подчеркнуть, что *X. cheopis* не встречается на диких грызунах вдали от населенных пунктов, а *X. vexabilis* – на синантропных внутри населенных пунктов [19].

Продолжительными полевыми исследованиями установлено, что во Вьетнаме нет природных очагов чумы и отсутствуют экологические условия, способствующие их формированию (рис. 2). Популяции блох могут длительно существовать только в хорошо защищенных от переувлажнения микробиотопах, каковыми являются длительно существующие гнезда синантропных зверьков. Гнезда верхнего яруса, надземного или подземного ярусов лесов, саванн и агроценозов не защищены от избыточного увлажнения в дождевой сезон и иссушения в сухой сезон года. Они существуют и используются лишь короткие периоды времени. Численность блох здесь низкая, оптимальных условий для их размножения нет. Гнезда синантропных грызунов под крышей строений хорошо защищены от дождя, высоких температур, что позволяет блохам обитать и размножаться здесь круглый год в течение многих лет. На синантропных малой, гималайской, серой и черной крысах достаточно высока численность *X. cheopis* – наиболее эффективного из всех известных переносчиков возбудителя чумы.

Распространение чумы происходило в результате заноса инфицированных синантропных мелких млекопитающих и их блох в новые населенные пункты вследствие хозяйственной деятельности человека [14, 20]. Эпизоотии в сельских населенных пунктах на плато Тайнгуен всегда развивались на фоне вы-

сокой численности носителей и переносчиков. Так, общая численность синантропных мелких млекопитающих в деревнях составила 15,3 % ПЛ (максимально до 24 %). При этом доля заселенных зверьками домов составила 57 %, а на 1 тыс. кв. м площади строений обитало 40 экз. мелких млекопитающих. При подсчете абсолютного числа крыс в пораженных чумой деревнях насчитывали от 4800 до 8300 экземпляров. Численность *X. cheopis* также была высокой: в сухой период года индекс обилия (ИО) на *R. exulans* составил 1,5, *R. nitidus* – 4,0, *Bandicota savilei* – 16,0, *Suncus murinus* – 1,8. По результатам круглогодичных наблюдений выяснена динамика численности блох по сезонам. Относительно низкими были ИО блох на крысах в августе–феврале (от 0,6 до 1,4), высокими – в марте–июле (1,0–4,2). При сравнении уровней численности носителей и переносчиков в разных типах строений обнаружили существенные различия. В ветхих деревянных домах численность крыс в 3,5, а блох в 5 раз выше, чем в каменных домах. При сборе данных эпиданамнеза почти все случаи заболеваний были связаны с проживанием людей в ветхих домах с обилием грызунов и блох. Всегда эпидемические проявления отмечались в населенных пунктах с преобладанием деревянных строений. Из поселков, где улучшались условия жизни населения (превалировали каменные жилые дома с асфальтированными дворами), чума со временем исчезала.

По официальным данным за период наших исследований с 1990 по 2002 год на Тайнгуен отмечались случаи бубонной чумы: заболело 3514 человек, а уровень смертности составил 4,9 % (при колебаниях по годам от 1,7 до 8,6 %). Несмотря на различия в уровне заболеваемости по годам, явно прослеживалась тенденция к ее снижению (рис. 3). Заболеваемость проявлялась в форме затяжных спорадических случаев или кратковременных вспышек. При возникновении вспышечной заболеваемости часто наблюдались семейные очаги. В структуре заболеваний различий по полу не наблюдалось, в то время как по возрасту они оказались выраженными: до 57 % больных – дети до 16 лет, 36–40 % случаев – трудоспособное население от 16 до 60 лет. Заболевания отмечали в течение всего года, но большинство случаев регистрировали в конце сухого периода года – в феврале–апреле (70 %). Различия в сезонности заболеваний объясняются погодными условиями, влияющими на активность носителей и переносчиков. При высокой численности и миграционной активности грызунов и блох развивается эпизоотический процесс в популяциях синантропных крыс. Гибель прокормителей провоцировала нападение инфицированных чумой блох на человека. Как правило, заболеваниям людей всегда предшествовали эпизоотии. Развитие эпидемических осложнений связывали также с неудовлетворительным санитарным состоянием поселков и жилых домов, миграциями населения в период национального праздника Тэт, слабым развитием лечебно-профилактической сети в сельской местности.

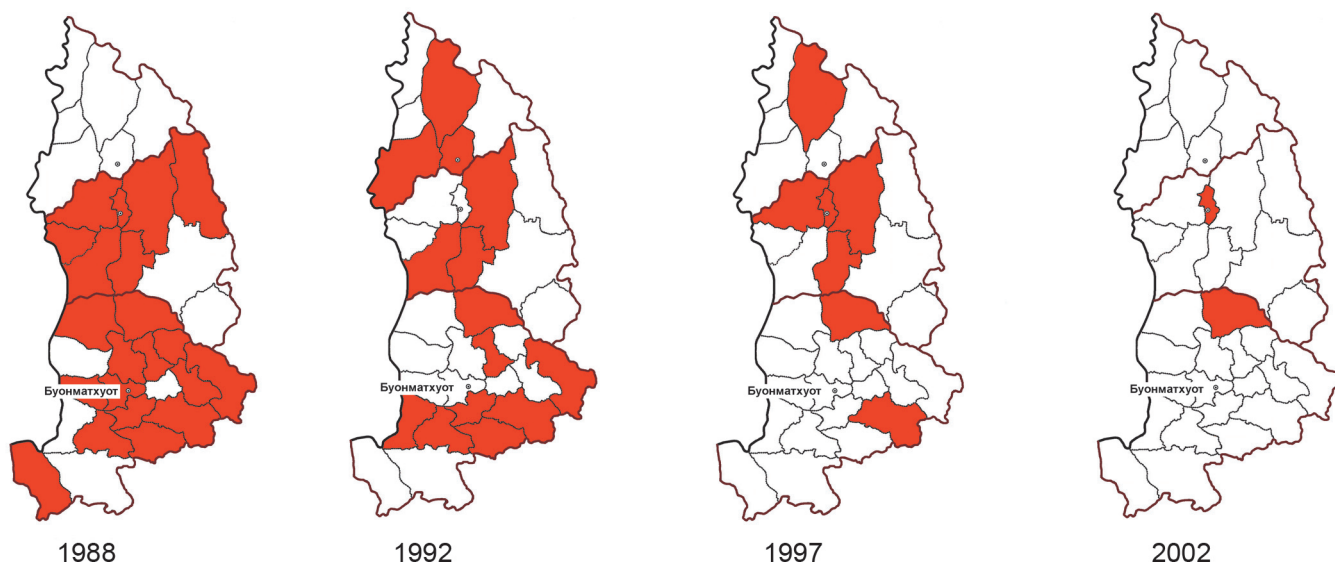


Рис. 3. Пораженные чумой уезды провинций Контум, Залай и Даклак на плато Тайнгуен в разные периоды наблюдений

В XXI веке, по мере повышения благосостояния населения, улучшились условия жизни и быта. В населенных пунктах стали преобладать легкие каменные строения с бетонированными дворами. Это ограничило массовое размножение и распространение крыс, их численность, как и численность паразитирующих на них блох, заметно снизилась. На этом фоне стал снижаться уровень заболеваемости населения, в том числе и чумой [17, 18]. В течение 10 последних лет на плато Тайнгуен продолжались исследования в бывших устойчивых эпидемических очагах в уездах Еа-Ви, Еа-Хлео и Аюмпа, но возбудителя не удалось выявить ни в популяциях синантропных крыс, ни в популяциях диких животных. Причины феномена, по-видимому, связаны с коренными изменениями социальных и бытовых условий жизни населения. Благоустройство населенных пунктов, санитарно-технические мероприятия, направленные на устранение условий, благоприятных для массового размножения и расселения синантропных грызунов и их эктопаразитов, приводят к снижению их численности и устранению механизмов инфицирования животных и человека [18]. Вместе с тем при оценке этих результатов следует учитывать небольшую продолжительность наблюдений. Хорошо известны недавние случаи вспышек чумы в Индии, Алжире, Ливии, на Мадагаскаре. В 90-х годах прошлого столетия в Индонезии на фоне эпидемиологического «затишья» снят мониторинг очага в связи с финансовыми трудностями, но уже в 1997 г. эта болезнь создала проблемы для органов национального здравоохранения. Очаги Индонезии также относят к антропоургическим, по структуре они сходны с очагами Вьетнама. Это подчеркивает необходимость продолжения мониторинга чумы в регионах страны, где в недавнем прошлом регистрировали ее эпизоотические и эпидемические проявления.

Понятие «антропоургический очаг чумы» пока не относится к вполне устоявшимся в научной лите-

ратуре. Под этим типом очагов следует понимать не только синантропные крысиные очаги тропических стран. Если исходить из семантического понимания этого термина, то к антропоургическим должны быть отнесены очаги не только тропических стран, но и те, что расположены на обширных внутропических пространствах Африканского континента, Южной и Юго-восточной Азии, Нового Света, то есть большая часть очагов мира. Секрет происхождения последних, как выяснено сейчас совершенно определенно, следует искать в крысиных очагах. Всесторонние исследования крысиных очагов ведут к раскрытию генезиса очагов чумы в мире. Отсюда понятна актуальность и настоятельная необходимость глубокого изучения известных очагов Вьетнама и других стран Юго-Восточной Азии.

Следует подчеркнуть, что деление очагов чумы на природные и антропоургические (антропогенные, синантропные) в биоценотическом смысле в определенной мере условно. Для сохранения и обеспечения циркуляции возбудителя в популяциях носителей и переносчиков главным условием является наличие комплекса благоприятных условий, при которых возможна реализация эпизоотического процесса. Такие условия на территориях с влажным тропическим климатом складываются именно в населенных пунктах, где в жилье человека формируются сухие местообитания, оптимальные для носителей и переносчиков микроба чумы.

Знание закономерностей формирования и функционирования антропоургических очагов дает возможность реконструкции путей последующего вторичного укоренения возбудителя чумы в популяциях дикоживущих грызунов Нового Света, Африки и Океании. А это, в свою очередь, ведет к расшифровке принципов и механизмов становления свойств высокой вирулентности и патогенности микроорганизмов и, как следствие, к теоретическому обоснованию поиска лечебных и профилактических средств борьбы с чумой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акиев А.К., Варшавский С.Н., Козакевич В.П. Природная очаговость чумы в Юго-Восточной Азии (Вьетнам). В кн.: Эпидемиология и профилактика чумы и холеры. Саратов, 1983. С. 43–52.
2. Базанова Л.П., Марамович А.С., Никитин А.Я., Косилко С.А., Окунев Л.П., Иннокентьева Т.И., Воронова Г.А. Эпизоотологическая характеристика природных очагов чумы Индии. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2009; 3:60–3.
3. Ву Ты Лап. Вьетнам. Географические сведения. Ханой: Изд. литературы на иностранных языках; 1980. 280 с.
4. Касьян А.Ф. Эпидемиологический анализ заболеваний людей чумой на плато Тайнгун. Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.: ГЕОС; 2003. С. 99–104.
5. Касьян А.Ф., Ли Тхи Ви Хьонг, Сунцов В.В., Данг Туан Дат, Дао Суан Винь, Нгуен Ай Фьонг. Эпидемиологические особенности сезонных проявлений чумы во Вьетнаме. Москва-Ханой: Тропцентр-98; 1997. Т. 1. С. 484–91.
6. Козлов М.П., Султанов Г.В. Эпидемические проявления чумы в прошлом и настоящем. Махачкала: Дагестанское книж. изд-во; 1993. 335 с.
7. Козлов М.П., Султанов Г.В. Чума. Природная очаговость, эпизоотология. Т. 3. Махачкала: Дагестанское книж. изд-во; 2000. 304 с.
8. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Ли Тхи Ви Хьонг, Данг Туан Дат. Перемещения синантропных крыс и их блох в населенных пунктах южного Вьетнама. *Пробл. особо опасных инф.* 1999; 79:59–65.
9. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Сунцова Н.И., Ли Тхи Ви Хьонг, Данг Туан Дат, Касьян А.Ф., Сунцов В.В. Изучение миграций малой крысы (*Rattus exulans*) и блохи *Xenopsylla cheopis* в сельских населенных пунктах на плато Тайнгун. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.: ГЕОС; 2003. С. 90–95.
10. Кузнецов Г.В. Млекопитающие Вьетнама. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2006. 420 с.
11. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Касьян А.Ф., Сунцов В.В., Ли Тхи Ви Хьонг, Данг Туан Дат. Структура и численность популяций синантропных крыс и их блох в населенных пунктах в южном Вьетнаме. *Пробл. особо опасных инф.* 2000; 80:61–70.
12. Ралль Ю.М. Лекции по эпизоотологии чумы. Ставрополь: Ставропольское книжное изд-во; 1958. 243 с.
13. Слудский А.А., Ли Тхи Ви Хьонг, Касьян А.Ф., Данг Туан Дат, Матросов А.Н., Дао Суан Винь, Майоров Н.В., Сунцов В.В. Современная эпидемическая активность антропогенных очагов чумы на плато Тайнгун. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.: ГЕОС; 2003. С. 10–12.
14. Сунцов В.В., Ли Тхи Ви Хьонг, Сунцова Н.И. Некоторые черты фауны блох (Insecta, Siphonaptera) мелких млекопитающих Вьетнама. *Зоол. журн.* 1992; 71(9):88–93.
15. Сунцов В.В., Ли Тхи Ви Хьонг, Сунцова Н.И., Грац Н.Г. Чума во Вьетнаме: зоологические и паразитологические аспекты. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.: ГЕОС; 2003. С. 45–50.
16. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2006. 247 с.
17. Сунцов В.В., Сунцова Н.И., Румак В.С., Данг Туан Дат, Хьонг Ань Тует, Лыонг Тхи Мо. Структура и генезис эпизоотических систем «грызун – блоха – микроб *Yersinia pestis*» в ценозах Вьетнама, включая территории экоцида. В кн.: Окружающая среда и здоровье человека в загрязненных диоксидами региона Вьетнама. М.: Товарищество научных изданий КМК; 2011. С. 202–58.
18. Сунцов В.В., Шилова С.А. Предотвращение контактов с грызунами как способ снижения заболеваний населения зоонозными инфекциями (на примере чумы). *Пест-Менеджмент.* 2013; 2:12–8.
19. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Замечания о блохах *Xenopsylla vexabilis* (Pulicidae: Siphonaptera) во Вьетнаме в связи с проблемой антропогенных очагов чумы. *Паразитология.* 2013; 47(6):422–36.
20. Сунцова Н.И., Сунцов В.В., Бокурню Ж.К., Адлер Г.Х., Ли Тхи Ви Хьонг, Кузнецов Г.В. Очерк биогеографии блох (Insecta) Вьетнама. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.: ГЕОС; 2003. С. 65–83.
21. Тарасов М.А., Дао Суан Винь, Ли Тхи Ви Хьонг, Касьян А.Ф. Современная эпизоотическая ситуация и роль антропогенных факторов в очагах чумы и других зоонозов Южного Вьетнама. *Пробл. особо опасных инф.* 1993; 1–2:14–20.
22. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1992; 3:10–3.
23. Cavanaugh D.C., Dangerfield H.G., Hunter D.H., Joy J.T., Marshall J.D., Quy D.V., Vivona S., Winter E.E. Some observations on the current plague outbreak in the Republic of Vietnam. *Amer. J. Public Health.* 1968; 58(4):742–52.
24. Conrad F.D., LeCocq F.R., Krain R. A recent epidemic of plague in Vietnam. *Arch. Intern. Med.* 1968; 3(122):193–8.
25. Cao Minh Tan, Huynh Huu Dang, Vo Thi Mai Chi, Le Nhi. Gop plan nghien cuu doc luc cua Y1 khuan dich hach o Viet Nam. J. VSPD. Ho Chi Minh. 1995. Tr. 17–18.
26. Dang Tuan Dat, Pham Van Hau. Benh dich hach. Dich te hoc, giam sat va phong chong [Чума. Эпидемиология, мониторинг и профилактика]. Nha xuat ban y hoc: Hanoi; 2003. 136 p.
27. Dao Xuan Vinh, Do Thung, Nguyen Ai Phuong. Nhan xet buoc dau ve typ sinh thai (ecotype) cuaquan the vi khuan dich hach (Y. pestis) o Tay Nguyen va o Viet Nam. Cong trinh Nghien cuu khoa hoc 1986–1991. Bo y Te. Vien ve sinh dich te Tay Nguyen. Buon Ma Thuot. 1992. Tr. 78–84.
28. Dao Xuan Vinh. Ket qua xac dinh doc luc va do nhay cam voi khang sinh cua cac chuong vi khuan dich hach phan lap tai Tay Nguyen tu nam 1994–1997. Top san VSPD Tay Nguyen. 1997. 7. Tr. 36–41.
29. Guiyoule A., Grimont F., Iteaman I., Grimont P.A.D., Lefevre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clinical Microbiology.* 1994; 32(3):634–41.
30. Marshall J.D., Quy V., Gibson F.Z., Dung T.S., Cavanaugh D.C. Ecology of plague in Vietnam: Commensal rodents and their fleas. *Mil. Med.* 1967. 32(11):896–903.
31. Nguyen Ai Phuong, Nguyen Thai, Dang Tuan Dat, Huy Nam, Ly Thi Vi Huong. Some ascertainment through the results of the epidemiology study on the two provinces of the western highland Gialai-Kontum, Daklak, 1976–1983. Inst. Hyg. Epidemiol. Tay Nguyen. Sci. Study work 1980–1983. 1983. P. 25–41.
32. Nguyen Ai Phuong. Situation of plague in Vietnam. Cong Trinh Nguen Cuu Khoa Hoc 1986–1991. Buon Ma Thuot; 1992. P. 1–6.
33. Pham Van Than. Nhan xe vu dich hach o Thanh Hoa nam 1980. Society of Hygiene and epidemiology of Viet-Nam. *J. Hygiene and epidemiology.* 1991; 1(2):56–9.
34. Sharif M. Spread of Plague in the Southern and Central Division of Bombay province and plague endemic centers in the IndoPakistan subcontinent. *Bull. WHO.* 1951; 4:75–109.
35. Velimirovic B. Plague in Southeast Asia. A brief historical summary and present geographical distribution. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1972; 66(3):479–504.
36. Velimirovic B. Investigations on the epidemiology and control of plague in South Vietnam. *Zentralbl. Bakteriол. Orig. A.* 1974; 228(4):482–532.
37. Wu Lien The, Chun J.W.H., Pollitzer R., Wu C.Y. Plague: a manual for medical and public health workers. Shanghai: Mercury Press; 1936. 547 p.

References

1. Akiyev A.K., Varshavsky S.N., Kozakevich V.P. [Natural focal-ity of plague in the South-Eastern Asia (Vietnam)]. In: [Epidemiology and Prophylaxis of Plague and Cholera]. Saratov; 1983. P. 43–52.
2. Bazanova L.P., Maramovich A.S., Nikitin A.Ya., Kosilko S.A., Okunev L.P., Innokent'eva T.I., Voronova G.A. [Epizootiological characteristics of natural plague foci in India]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2009; 3:60–3.
3. Vu Ty Lap. [Vietnam. Geographic Information]. Hanoi; 1980. 280 p.
4. Kas'yan A.F. [Epidemiological analysis of plague cases in humans, registered in the territory of the Thai Nguyen Plateau]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M.: GEOS; 2003. P. 99–104.
5. Kas'yan A.F., Ly Thi Vi Huong, Suntsov V.V., Dang Tuan Dat, Dao Xuan Vinh, Nguyen Ai Phuong. [Epidemiological peculiarities of seasonal manifestations of plague in Vietnam]. Moscow-Hanoi; 1997. 1:484–91.
6. Kozlov M.P., Sultanov G.V. [Epidemic manifestations of plague in the past and at present day]. Makhachkala: Dagestan Book Publishing; 1993. 335 p.
7. Kozlov M.P., Sultanov G.V. [Plague. Natural Focality and Epizootology. Vol. 3.]. Makhachkala; 2000. 304 p.
8. Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Suntsova N.I., Ly Thi Vi Huong, Dang Tuan Dat. [Migration of synanthropic rats and their fleas in the residential areas of South Vietnam]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1999; 79:59–65.
9. Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Suntsova N.I., Ly Thi Vi Huong, Dang Tuan Dat, Kas'yan A.F., Suntsov V.V. [Studies of migration of the little rat (*Rattus exulans*) and the flea *Xenopsylla cheopis* in the residential areas of the Thai Nguyen Plateau]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M.: GEOS; 2003. P. 90–5.
10. Kuznetsov G.V. [Mammals of Vietnam]. M.; 2006. 420 p.
11. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Kas'yan A.F., Suntsov V.V., Ly Thi Vi Huong, Dang Tuan Dat. [Structure and the numbers of specimens in the populations of synanthropic rats and their fleas, habitant in the residential areas in South Vietnam]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2000; 80:61–70.
12. Rall' Yu.M. [Lectures on Epizootology of Plague]. Stavropol; 1958. 243 p.
13. Sludsky A.A., Ly Thi Vi Huong, Kas'yan A.F., Dang Tuan Dat, Matrosov A.N., Dao Xuan Vinh, Mayorov N.V., Suntsov V.V. [Current epidemic activity of anthropogenic foci of plague in the Thai Nguyen Plateau]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M.: GEOS; 2003. P. 10–2.

14. Suntsov V.V., Ly Thi Vi Huong, Suntsova N.I. [Certain peculiar features of fauna of fleas (Insecta, Siphonaptera) parasitizing on small mammals of Vietnam]. *Zool. Zh.* 1992; 71(9):88–93.
15. Suntsov V.V., Ly Thi Vi Huong, Suntsova N.I., Grats N.G. [Plague in Vietnam: zoological and parasitological aspects]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M.: GEOS; 2003. P. 45–50.
16. Suntsov V.V., Suntsova N.I. [Origin and Evolution of Epizootic System]. M.; 2006. 247 p.
17. Suntsov V.V., Suntsova N.I., Rumak V.S., Dang Tuan Dat, Huong An Tuet, Luong Thi Mo [Structure and genesis of epizootic systems such as “rodent-flea-*Yersinia pestis* microbe” in coenoses of Vietnam, including the territories of ecocide]. In: [Environment and Human Health in Vietnamese Regions Polluted with Dioxins]. M.; 2011. P. 202–58.
18. Suntsov V.V., Shilova S.A. [Control of the Contacts with Rodents as a Method to Put down Zoonoses Morbidity Rates among the Population (by the example of plague)]. *Pest-Management*. 2013; 2:12–8.
19. Suntsov V.V., Suntsova N.I. [Notes on fleas *Xenopsylla vexabilis* (Pulicidae: Siphonaptera) habitat in Vietnam in the light of anthropogenic plague foci issue]. *Parazitologia*. 2013; 47(6):422–36.
20. Suntsova N.I., Suntsov V.V., Bokurnyu Zh.K., Adler G.Kh., Ly Thi Vi Huong, Kuznetsov G.V. [Profile on Fleas (Insecta) of Vietnam]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M.: GEOS; 2003. P. 65–83.
21. Tarasov M.A., Dao Xuan Vinh, Ly Thi Vi Huong, Kas'yan A.F. [Current epizootic situation and the role of anthropogenic factors in the South Vietnam foci of plague and other zoonotic infections]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1993; 1–2:14–20.
22. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kukleva L.M., Protsenko O.A. [Studies of plasmid composition of plague agent strains isolated from different natural foci]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1992; 3:10–3.
23. Cavanaugh D.C., Dangerfield H.G., Hunter D.H., Joy J.T., Marshall J.D., Quy D.V., Vivona S., Winter E.E. Some observations on the current plague outbreak in the Republic of Vietnam. *Amer. J. Public Health*. 1968; 58(4):742–52.
24. Conrad F.D., LeCocq F.R., Krain R. A recent epidemic of plague in Vietnam. *Arch. Intern. Med.* 1968; 3(122):193–8.
25. Cao Minh Tan, Huynh Huu Dang, Vo Thi Mai Chi, Le Nhi. Gop plan nghien cuu doc luc cua YI khuan dich hach o Viet Nam. *J. VSPD. Ho Chi Minh*. 1995. Tr. 17–18.
26. Dang Tuan Dat, Pham Van Hau. Benh dich hach. Dich te hoc, giam sat va phong chong [Чума. Эпидемиология, мониторинг и профилактика]. Nha xuat ban y hoc: Hanoi; 2003. 136 p.
27. Dao Xuan Vinh, Do Thung, Nguyen Ai Phuong. Nhan xet buoc dau ve typ sinh thai (ecotype) cua quan the vi khuan dich hach (*Y. pestis*) o Tay Nguyen va o Viet Nam. Cong trinh Nghien cuu khoa hoc 1986–1991. Bo y Te. Vien ve sinh dich te Tay Nguyen. Buon Ma Thuot. 1992. Tr. 78–84.
28. Dao Xuan Vinh. Ket qua xac dinh doc luc va do nhay cam voi khang sinh cua cac chuong vi khuan dich hach phan lap tai Tay Nguyen tu nam 1994–1997. Top san VSPD Tay Nguyen. 1997. 7. Tr. 36–41.
29. Guivoule A., Grimont F., Iteman I., Grimont P.A.D., Lefevre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clinical Microbiology*. 1994; 32(3):634–41.
30. Marshall J.D., Quy V., Gibson F.Z., Dung T.S., Cavanaugh D.C. Ecology of plague in Vietnam: Commensal rodents and their fleas. *Mil. Med.* 1967. 32(11):896–903.
31. Nguyen Ai Phuong, Nguyen Thai, Dang Tuan Dat, Huy Nam, Ly Thi Vi Huong. Some ascertainments through the results of the epidemiology study on the two provinces of the western highland Gialai-Kontum, Daklak, 1976–1983. *Inst. Hyg. Epidemiol. Tay Nguyen. Sci. Study work* 1980–1983. 1983. P. 25–41.
32. Nguyen Ai Phuong. Situation of plague in Vietnam. Cong Tring Nguen Cuu Khoa Hoc 1986–1991. Buon Ma Thuot; 1992. P. 1–6.
33. Pham Van Than. Nhan xe vu dich hach o Thanh Hoa nam 1980. Society of Hygiene and epidemiology of Viet-Nam. *J. Hygiene and epidemiology*. 1991; 1(2):56–9.
34. Sharif M. Spread of Plague in the Southern and Central Division of Bombay province and plague endemic centers in the IndoPakistan subcontinent. *Bull. WHO*. 1951; 4:75–109.
35. Velimirovic B. Plague in Southeast Asia. A brief historical summary and present geographical distribution. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 1972; 66(3):479–504.
36. Velimirovic B. Investigations on the epidemiology and control of plague in South Vietnam. *Zentralbl. Bakteriolog. Orig. A*. 1974; 228(4):482–532.
37. Wu Lien The, Chun J.W.H., Pollitzer R., Wu C.Y. Plague: a manual for medical and public health workers. Shanghai: Mercury Press; 1936. 547 p.

Authors:

- Suntsov V.V.* A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution. Moscow, Russian Federation.
Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Kouklev E.V., Tarasov M.A., Kas'yan I.A., Mayorov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru
Suntsova N.I., Lyong Thi Mo. Russian-Vietnamese Tropical Center. Ho Chi Minh City, Vietnam.
Dang Tuan Dat. Thai Nguyen Institute of Hygiene and Epidemiology. Buon Ma Thuot, Vietnam.
Astakhova T.S. Central Research Institute of Epidemiology. Moscow, Russian Federation

Об авторах:

- Сунцов В.В.* Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова. Москва, Российская Федерация.
Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Куклев Е.В., Тарасов М.А., Касьян И.А., Майоров Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru
Сунцова Н.И., Лыонг Тхи Мо. Российско-Вьетнамский тропический центр. Хошимин, Вьетнам.
Данг Туан Дат. Институт гигиены и эпидемиологии Тайнгуен. Буонматхуот, Вьетнам.
Астахова Т.С. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора. Москва, Российская Федерация.

Поступила 03.03.14.

Е.А.Билько¹, С.Б.Гаранина¹, Н.И.Миронова², С.А.Яковлев¹, С.А.Щербакова¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ РНК-ИЗОЛЯТОВ ХАНТАВИРУСОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²МУЗ «Городская клиническая больница № 2 им. В.И.Разумовского», Саратов, Российская Федерация

С целью получения данных о внутривидовом разнообразии хантавирусов, циркулирующих на территории Саратовской области, проведено молекулярно-генетическое исследование полевого и клинического материала. Методом ПЦР РНК хантавирусов была обнаружена в 25 пробах от мелких млекопитающих и 15 пробах крови от людей с диагнозом ГЛПС. Секвенирование выделенных 14 РНК-образцов хантавирусов от грызунов и 3 РНК-образцов клинического материала позволило определить их таксономическую принадлежность к вирусу Пуумала. В ходе филогенетического анализа РНК-изолятов установлено, что все они имеют высокий уровень гомологии между собой (99,8 %) и значительные отличия от известных штаммов Пуумала, распространенных на территории РФ (3,6–21 %). Таким образом, с помощью молекулярно-генетических методов подтверждена циркуляция вируса Пуумала на территории Саратовской области. Выявленная генетическая дистанционность Саратовских РНК-изолятов, в частности, открывает дальнейшие перспективы для определения места инфицирования больных ГЛПС.

Ключевые слова: ГЛПС, хантавирусы, вирус Пуумала, генотипирование, ПЦР.

Е.А.Bil'ko¹, S.B.Garanina¹, N.I.Mironova², S.A.Yakovlev¹, S.A.Shcherbakova¹

Results of Studies of Genetic Heterogeneity in Hantavirus RNA-Isolates, Found in the Territory of the Saratov Region

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²V.I.Razumovsky Municipal Clinical Hospital No 2, Saratov, Russian Federation

With a view to obtain the data on intraspecific diversity of Hantaviruses circulating in the territory of the Saratov Region, carried out has been molecular-genetic testing of the field and clinical material. Using PCR assay, Hantavirus RNA has been detected in 25 samples obtained from small mammals and 15 blood samples of HFRS patients. Sequencing of 14 hantavirus RNA-isolates from rodents and 3 RNA-isolates from clinical material has made it possible to identify their taxonomic appurtenance to Puumala virus. Phylogenetic analysis of RNA-isolates has revealed that all of them are characterized by high degree of homology in between themselves (99.8 %) and substantial distinction from the known Puumala strains, frequently occurring in Russia (3.6–21 %). Therewith, verified has been circulation of Puumala virus in the territory of the Saratov Region using molecular-genetic techniques. Identified genetic differences of Saratov RNA-isolates, in particular, opens a further prospect for allocation of the sites where people can contract HFRS infection.

Key words: HFRS, hantaviruses, Puumala virus, genotyping, PCR.

Саратовская область относится к числу тех территорий Российской Федерации, на которых, начиная с середины 80-х годов, выявлены активные природные очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). За весь период мониторинговых исследований очагов ГЛПС в области (с 1980 по 2011 год) официально было зарегистрировано 6283 случая заболеваний, из которых 31 со смертельным исходом. Изучению вопросов заболеваемости и природной очаговости ГЛПС в Саратовской области было посвящено немало научных работ, однако до сих пор не проводились исследования по изучению спектра циркулирующих в данном регионе хантавирусов, их видового и внутривидового разнообразия, в связи с чем отсутствует объективная оценка эпидемиологического потенциала природных очагов ГЛПС [1, 2, 4].

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 8 видов

хантавирусов, из которых пять (Пуумала, Добrava, Хантаан, Сеул и Амур) являются патогенными для человека и вызывают клинически диагностируемые формы ГЛПС с различной степенью тяжести заболевания, уровнем летальности и интенсивностью эпидемических проявлений [3]. Учитывая высокую трудоемкость вирусологических методов исследования, молекулярно-генетические (ПЦР, секвенирование и др.) являются альтернативой, позволяющей решать задачи, связанные с идентификацией и типированием хантавирусов, циркулирующих в природных очагах, а также с быстрой этиологической расшифровкой заболевания без выделения вирусов на культуре клеток [5].

В связи с вышесказанным, целью работы явилось проведение лабораторных исследований полевого и клинического материала, полученного на территории Саратовской области в 2009–2012 гг., с

последующим генотипированием и характеристикой генетического разнообразия выделенных РНК-изолятов хантавирусов.

Материалы и методы

Эпизоотологическое обследование проводилось на территории зеленой зоны Саратова с определением общей численности мелких млекопитающих, а также с характеристикой состояния популяций основных носителей хантавирусов – возбудителей ГЛПС. Место для исследований выбрано не случайно. Ретроспективный анализ литературных данных показал, что в 80–90-х годах прошлого столетия на этих территориях были зарегистрированы эпидемически активные природные очаги ГЛПС, отмечался высокий процент инфицированных грызунов, имели место массовые случаи заражения людей [1]. Кроме того, зеленая зона Саратова, как наиболее часто посещаемая горожанами зона отдыха, может быть отнесена к территориям повышенной эпидемиологической опасности для людей.

Всего в ходе работы было обследовано 16 точек в границах пригородного лесного массива – лесопарка «Кумысная поляна» и окрестностей п. Сокол. Выставлено 1600 давилочек «Геро», в результате чего добыто 97 экз. грызунов 5 видов и 9 экз. насекомых 3 видов.

Лабораторные исследования суспензий органов мелких млекопитающих (смешанный пул легких и почек) на наличие антигенов и РНК хантавирусов проводили с использованием методов ИФА и ПЦР.

Помимо полевого материала, были проведены молекулярно-генетические исследования пятнадцати клинических образцов. Материал был получен от больных, находившихся в инфекционном отделении МУЗ «Городской клинической больницы № 2 им. В.И.Разумовского» (в 2012 г.) с диагнозом ГЛПС, поставленным на основании выявления специфических антител в сыворотках крови.

Для проведения иммуносерологических исследова-

ний использовали коммерческие тест-системы (производство ИПВЭ им. М.П.Чумакова, РАМН). Для молекулярно-генетических исследований применяли ПЦР со специфическими праймерами, а также разработанную ранее технологию генотипирования, включающую ПЦР с универсальными праймерами и прямое секвенирование ампликонов с использованием системы генетического анализа CEQ 8000 (Beckman coulter Inc.) [5]. Филогенетический анализ выделенных РНК-изолятов проводили по фрагменту гена N с помощью программы «Mega», методом сравнения Neighbor-Joining.

Результаты и обсуждение

В ходе эпизоотологического обследования средняя численность мелких млекопитающих была охарактеризована как низкая и составляла 6,6 %. Почти повсеместно преобладали рыжие полевки, численность которых не превышала 3,1 %. Численность желтогорлых и малых лесных мышей была еще ниже – 1,4 %, а наиболее малочисленными оказались популяции обыкновенной полевки (0,2 %) и насекомых (0,6 %). Причиной подобной невысокой численности грызунов могла стать скудная кормовая база вследствие засушливого летнего периода 2009 г.

При лабораторном исследовании 106 проб полевого материала методами ПЦР и ИФА, положительными оказались 25, что составило 23,6 %. При этом в четырех пробах от рыжих полевок были обнаружены и хантавирусный антиген и вирусная РНК. Результаты исследований суспензий органов мелких млекопитающих на наличие хантавирусной РНК представлены в табл. 1.

Применение ПЦР-анализа в режиме реального времени с использованием видоспецифичных праймеров и зондов позволило определить принадлежность новых РНК-изолятов к виду Пуумала. РНК вируса ГЛПС регистрировали, в основном, в образцах, полученных от рыжих полевок. Инфицированность зверьков этого вида составляла 30,6 %. Помимо проб от рыжих полевок, положительными были образцы, полученные от малых лесных (18,2 %) и желтогорлых мышей (13,6 %), обыкновенных полевок (33,3 %) и обыкновенных бурозубок (33,3 %).

Дальнейшие исследования внутривидового разнообразия вновь выделенных РНК-изолятов, были проведены с помощью методики секвенирования ампликонов. Секвенирование ампликонов четырнадцати положительных образцов (13 – от рыжей полевки и 1 – от желтогорлой мыши) подтвердило их таксономическую принадлежность к вирусу Пуумала, а филогенетический анализ фрагмента гена N нуклеопротеина (426 п.н.) показал их высокую генетическую однородность – уровень гомологии составил 99,8 %.

Кроме полевого материала, методом ПЦР исследовали клинические образцы (кровь), полученные от пятнадцати человек в разгар болезни (на 3–14-й день

Таблица 1

Результаты выявления РНК хантавирусов в суспензиях органов мелких млекопитающих, отловленных в зеленой зоне Саратова

Вид животного	Кол-во добытых животных, абс. (%)	Кол-во положительных проб, абс. (%)
<i>Myodes glareolus</i> (рыжая полевка)	49 (46,2)	15 (60,0)
<i>Microtus arvalis</i> (обыкновенная полевка)	3 (2,8)	1 (4,0)
<i>Apodemus uralensis</i> (малая лесная мышь)	22 (20,8)	4 (16,0)
<i>Apodemus flavicollis</i> (желтогорлая мышь)	22 (20,8)	3 (12,0)
<i>Mus musculus</i> (домовая мышь)	1 (0,9)	0
Насекомоядные:		
- <i>Sorex araneus</i> (обыкновенная бурозубка)	6 (5,7)	2 (8,0)
- <i>Sorex minutus</i> (малая бурозубка)	2 (1,9)	
- <i>Crocidura suaveolens</i> (малая белозубка)	1 (0,9)	
Итого	106	25 (23,6)

Таблица 2

Уровень генетических различий между штаммами вируса Пуумала из различных регионов РФ

Территория	Башкирия	Удмуртия	Оренбург	Самара	Воронеж/Липецк	Омск/Тюмень
Саратов	0,070±0,012	0,036±0,009	0,062±0,011	0,057±0,012	0,119±0,019	0,210±0,019
Республика Башкортостан		0,072±0,011	0,063±0,011	0,055±0,010	0,140±0,017	0,230±0,018
Республика Удмуртия			0,067±0,012	0,060±0,010	0,139±0,018	0,223±0,018
Оренбург				0,035±0,008	0,140±0,018	0,217±0,019
Самара					0,188±0,018	0,230±0,019
Воронеж/Липецк						0,215±0,018

от начала заболевания). Во всех образцах была выявлена РНК вируса Пуумала. Дальнейшие исследования трех отобранных для секвенирования проб показали, что РНК-изоляты от двух больных (один заболел в Аткарском районе области, второй – в Саратове) имеют высокое генетическое сходство между собой, а также с выделенными нами ранее РНК-исолатами от грызунов (уровень гомологии 99,8 %). Третий образец имел генетические отличия от двух других на уровне 0,8–1,0 %. Данный образец был получен от больной, которая выезжала за границы Саратовской области – в Камышинский район Волгоградской области, где, с учетом данных эпиданамнеза, вероятно и произошло ее заражение.

Проведенный филогенетический анализ установил близость Саратовских РНК-исолатов, выделенных от грызунов и людей, к штаммам вируса Пуумала, циркулирующим на территории Приволжского Федерального округа (ПФО). При сравнении со штаммами из Республик Удмуртия и Башкортостан, Самарской, Оренбургской и других областей ПФО (сиквенсы которых зарегистрированы в базе данных NCBI GenBank) выявлен средний уровень различий, который варьировал от 3,6 до 7,0 % (табл. 2). Наибольшая генетическая дистанционность была отмечена при сравнении со штаммами вируса Пуумала, циркулирующими в регионах Центрального Федерального округа (Воронежской и Липецкой областях) и Западной Сибири (Тюменской и Омской областях). Уровень различий с изолятами из этих регионов составил 12 и 21 % соответственно (табл. 2). В ходе анализа аминокислотного состава в пределах секвенированного фрагмента N гена была определена маркерная аминокислотная последовательность (позиции 258–274), позволяющая дифференцировать Саратовские РНК-исолаты от штаммов из других регионов.

Таким образом установлено, что на территории Саратовской области циркулируют геноварианты вируса Пуумала, генетически дистанцированные от других известных штаммов этого вида хантавируса.

Актуальность проведения дальнейших исследований с помощью молекулярно-генетических подходов очевидна. Показана их высокая диагностическая эффективность, которая позволяет, в частности, решать проблемы, связанные с быстрой идентификацией возбудителя ГППС, этиологической расшифровкой заболевания, установлением места (региона, области), где произошло инфицирование человека, а также на основе полученной информации разработа-

вывать адекватные схемы проведения профилактических мероприятий с целью предотвращения эпидемических осложнений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заяц Н.А., Кузнецов В.И., Гаврилова И.Б., Сретенская Д.А., Царёва Т.Д., Бабиченко О.Е. Эпидемиологические и клинико-биохимические аспекты геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Саратовской области. *Усп. совр. естествознания*. 2008; 6:91–2.
2. Куличенко А.Н., Шульдяков А.А., Решетников А.А., Хорошун Е.В., Рамазанова К.Х., Сатарова С.А. Современные клинико-иммунологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Саратовской области. *Инф. бол.* 2008; 2:21–3.
3. Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К., Бернштейн А.Д., Окулова Н.М., Коротина Н.А., Транквилевский Д.В., Морозов Г.В., Юничева Ю.В., Завора Д.Л., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Мутных Е.С., Смирнова М.С., Леонович О.А., Шевелев А.Б., Малкин Г.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России – проблема XXI века. *Вестник Российской акад. естественных наук*. 2012; 1:48–54.
4. Рябова А.В., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Шилов М.М., Попов Н.В. Очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом города Аткарска Саратовской области. *3HuCO*. 2014; 2:27–9.
5. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of Hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 6–7:297–309.

References

1. Zavats N.A., Kuznetsov V.I., Gavrilova I.B., Sretenskaya D.A., Tsareva T.D., Babichenko O.E. [Epidemiological and clinical-biochemical aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Saratov Region]. *Uspekhi Sovrem. Estestvozn.* 2008; 6:91–2.
2. Kulichenko A.N., Shul'dyakov A.A., Reshetnikov A.A., Khoroshun E.V., Ramazanova K.Kh., Satarova S.A. [Modern clinical-immunological peculiarities of HFRS in the Saratov region]. *Inf. Bol.* 2008; 2: 21–3.
3. Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Okulova N.M., Korotina N.A., Trankvilevsky D.V., Morozov G.V., Yunicheva Yu.V., Zavora D.L., Balovneva M.V., Sotskova S.E., Mutnykh E.S., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Shevelev A.B., Malkin G.A. [HFRS in Russia – challenge of the XXI century]. *Vestnik Ros. Akad. Estestv. Nauk*. 2012; 48–54.
4. Ryabova A.V., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Shilov M.M., Popov N.V. [HFRS foci in Atkarsk city of the Saratov region]. *Zdor. Nas. Sreda Obit.* 2014; 2: 27–9.
5. Garanina S.B., Platonov A.E., Zhuravlev V.I., Murashkina A.N., Yakimenko V.V., Korneev A.G., Shipulin G.A. Genetic diversity and geographic distribution of Hantaviruses in Russia. *Zoonoses Public Health*. 2009; 6–7:297–309.

Authors:

Bil'ko E.A., Garanina S.B., Yakovlev S.A., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru
Mironova N.I. V.I. Razumovsky Municipal Clinical Hospital No 2. Saratov, Russian Federation

Об авторах:

Билько Е.А., Гаранина С.Б., Яковлев С.А., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru
Миронова Н.И. Городская клиническая больница № 2 им. В.И.Разумовского. Российская Федерация, Саратов.

Поступила 04.04.14.

И.В.Грачева, А.В.Осин

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КОНСЕРВАЦИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Целью исследования является оценка устойчивости холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при -70°C в присутствии криопротекторов. В работе представлены результаты хранения семи штаммов *V. cholerae* в течение трех лет в пяти защитных средах, содержащих в качестве криопротектора глицерин или лактозу (10, 20, 30 % водные растворы глицерина, мясопептонный бульон с 10 % глицерина, среда с 15 % лактозы и 3 % желатина). Показано, что гибель холерных вибрионов происходит при замораживании-размораживании образцов и их хранении. После трех лет консервации количество живых клеток уменьшилось во всех средах, но в разной степени. Наиболее высокая выживаемость холерных вибрионов после замораживания-размораживания и хранения в замороженном состоянии по используемому протоколу отмечена в лактозо-желатиновой среде. При использовании в качестве протективной среды водного раствора глицерина оптимальной является концентрация криопротектора 20 %. После трех лет хранения при -70°C все штаммы, независимо от состава защитной среды, сохранили основные диагностически значимые фенотипические признаки. Таким образом, холерные вибрионы могут быть сохранены без пересевов в течение трех лет (срок наблюдения) без изменения основных диагностических признаков во всех тестируемых защитных средах при -70°C .

Ключевые слова: холерные вибрионы, замораживание, низкотемпературная консервация, криопротекторы, жизнеспособность.

I.V.Gracheva, A.V.Osin

Low-Temperature Conservation of Collection Cholera Vibrio Strains*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Objective of the study is to evaluate cholera vibrio resistance to freezing and freeze preservation at -70°C in the presence of cryoprotectors. The study outlines the results of storage of seven different *V. cholerae* strains within three-years term in the protective media containing glycerin or lactose (10, 20, 30 % aquatic solutions of glycerin, meat-peptone broth with 10 % of glycerin, a medium with 15 % of lactose and 3 % of gelatin) as cryoprotectors. Demonstrated is the fact that cholera vibrio death occurs during freezing-refreezing procedure and preservation of samples. After three-year conservation the numbers of living cells decrease in all types of media, but to different extent. The highest survival rate in cholera vibrios after freezing-refreezing procedure and freeze preservation in accordance with applicable protocols is observed in lactose-gelatin medium. When using aquatic solution of glycerin as protective medium, optimum turns out to be the cryoprotector concentration equal to 20 %. After three-year preservation at -70°C all the strains, irrespective of the protective medium composition, retain their basic diagnostically significant phenotypic characteristics. Thus, cholera vibrios can be conserved free from subcultures within three-year term (period of observation) without alterations to their basic diagnostic properties in all tested protective media but at -70°C .

Key words: cholera vibrios, freezing, low-temperature conservation, cryoprotectors, survivability.

Выбор метода хранения бактерий зависит от задач, стоящих перед исследователем, и от технических возможностей лаборатории. Традиционным способом сохранения холерных вибрионов в бактериологических лабораториях является посев в столбики 0,4 % питательного агар для культивирования с последующим хранением культуры под слоем минерального масла при комнатной температуре. Метод позволяет сохранить холерные вибрионы без пересевов в течение 1–1,5 лет.

Распространенным методом консервации бактерий является замораживание и хранение при температурах в диапазоне от -20 до -85°C , стабильное поддержание которых обеспечивают современные лабораторные холодильники [2, 5, 7, 10]. Метод позволяет сохранять бактериальные клетки без пересевов до 10 лет [8]. Длительность хранения бактерий при субну-

левых температурах зависит от двух групп факторов. Первая связана с биологическими особенностями и физиологическим состоянием клеток, вторая – с условиями замораживания и хранения, главными из которых являются скорость охлаждения, температура и среда хранения.

Перед практическим использованием метода низкотемпературной консервации в своей коллекционной практике мы провели исследование, целью которого является изучение устойчивости холерных вибрионов к замораживанию в присутствии двух криопротекторов – глицерина (проникающий криопротектор) и лактозы (непроникающий криопротектор), динамики гибели при низкотемпературном хранении в защитных средах, стабильности основных диагностических фенотипических признаков.

Материалы и методы

В работе использованы 7 штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы: 569В классического биовара и 6 штаммов биовара Эльтор (МАК757, М-888, М-1286, М-1351, М-1425, М-1430). До проведения экспериментов штаммы хранились в лиофилизированном состоянии в течение 5–45 лет.

Для приготовления клеточных суспензий штаммы выращивали на скошенном во флаконах мясопептонном агаре pH 7,6 (75 мл) при 37 °C в течение 18–20 ч до стационарной фазы. Культуру смывали 2 мл защитной среды, взвесив с концентрацией $n \cdot 10^{10}$ разливали в 4 криопробирки (Greiner bio-one, Германия). После 30 мин экспозиции при комнатной температуре пробирки помещали в низкотемпературный холодильник на -70 °C (Haier DW-86L288, Япония). Одну пробирку использовали для изучения влияния состава среды на устойчивость холерных вибрионов к замораживанию-оттаиванию, остальные три – для определения количества живых клеток через 12, 24, 36 месяцев хранения. Взвесь размораживали при комнатной температуре в течение 15–20 мин до полного оттаивания содержимого пробирок.

В качестве защитных сред использовали 10, 20, 30 % водный раствор глицерина (AppLichem, Германия), мясопептонный бульон (МПБ) с 10 % глицерина, лактозо-желатиновую среду (среда ЛЖ, 15 % лактозы моногидрат, HiMedia Индия, 3 % желатина, AppliChem, Германия).

В качестве критерия устойчивости холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии использовали выраженный в lg показатель КОЕ/мл – количество клеток, способных к формированию колоний при высеве на питательную среду сразу после замораживания и через определенные периоды хранения, который определяли методом десятикратных разведений взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Диагностически значимые фенотипические признаки – серологические свойства, чувствительность к диагностическим холерным фагам, биохимическую активность – изучали в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры [1]. Уровень продукции гемолизина оценивали методом посева изолированных колоний на пластины питательного агара с 3 % отмытых эритроцитов барана.

Результаты и обсуждение

Устойчивость микроорганизмов к замораживанию зависит от комплекса факторов, в том числе от биологических особенностей вида [3, 8, 9]. Устойчивость холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при -70 °C оценивали на модели двух штаммов *V. cholerae* М-888 и М-1425. На первом этапе работы клетки замораживали в трех средах разного состава, со-

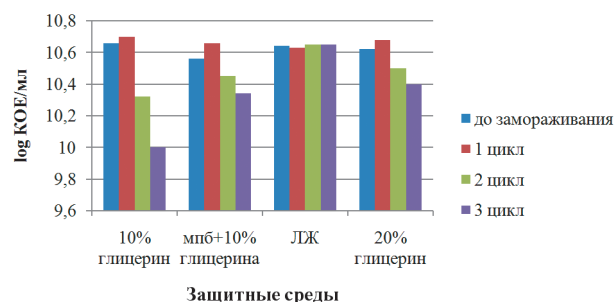


Рис. 1. Устойчивость *V. cholerae* М-888 к повторным циклам замораживания-оттаивания

держащих в качестве криопротектора глицерин или лактозу. 10 % водный раствор глицерина – наиболее распространенный состав для хранения бактериальных клеток при субнулевых температурах. Для многих патогенных бактерий криозащитные свойства ростовых питательных сред с глицерином выше, чем водных растворов криопротектора аналогичной концентрации [6]. Среда ЛЖ успешно используется в нашей лаборатории для высушивания холерных вибрионов из замороженного состояния.

После однократного замораживания клеток *V. cholerae* М-888 и М-1425 в защитных средах мы не отметили статистически достоверного снижения показателя КОЕ/мл по сравнению с контролем (до замораживания). При повторном замораживании наблюдалась гибель клеток в 10 % глицерине и МПБ с 10 % глицерина (рис. 1). Значение КОЕ/мл оставалось практически неизменным после трех циклов замораживания-оттаивания холерных вибрионов в среде ЛЖ ($P < 0,05$). В то же время однократное замораживание в дистиллированной воде привело к снижению концентрации клеток на 0,46–0,8 lg КОЕ/мл в зависимости от штамма, в 0,9 % растворе натрия хлорида – к гибели практически всей популяции.

Таким образом, все использованные протективные составы защищали клетки холерных вибрионов от летальных криоповреждений, основной причиной которых при низкой скорости охлаждения, использованной в работе, согласно наиболее признанной сегодня гипотезе «влияния растворов» является холодной осмотический шок [8]. Наиболее эффективной из использованных является среда ЛЖ, трехкратное замораживание клеток в которой не приводило к статистически достоверному снижению концентрации холерных вибрионов.

Считается, что хранение при температурах ниже -120 °C, например, в жидком азоте или парах жидкого азота, позволяет сохранять клетки в течение неограниченно долгого периода, хотя срок наблюдения ограничен несколькими десятилетиями. При температурах ниже криогенных полностью прекращается движение молекул и останавливаются все химические реакции. Гибель клеток происходит только при их замораживании и размораживании [3, 8]. При субнулевых температурах выше криогенных инактивация клеток может происходить не только на этапах замораживания и оттаивания, но и при хранении, а

уровень снижения жизнеспособности зависит от температуры хранения [5, 7].

Количество живых клеток холерных вибрионов в пробах определяли через 1 день, 12, 24, 36 месяцев хранения, используя каждый раз новую криопробирку, поэтому показатель КОЕ/мл характеризовал выживаемость холерных вибрионов после одного цикла замораживания-оттаивания. В течение трех лет хранения количество живых клеток снизилось во всех трех средах, но в разной степени (рис. 2, 3). Наиболее интенсивная гибель холерных вибрионов зарегистрирована при хранении в 10 % водном растворе глицерина. Через год концентрация клеток *V. cholerae* М-888 уменьшилась на 1 lg КОЕ/мл, через два года – на 1,8 lg КОЕ/мл, через три – на 2,66 lg КОЕ/мл. За три года хранения количество живых клеток *V. cholerae* М-888 в МПБ с глицерином и среде ЛЖ снизилось на 0,71 и 0,52 lg КОЕ/мл соответственно. Результаты тестирования жизнеспособности *V. cholerae* М-1425 при хранении в защитных средах были аналогичными (рис. 3). Концентрация живых клеток после трех лет хранения в 10 % глицерине, МПБ с 10 % глицерина, среде ЛЖ уменьшился на 2,58, 1,15, 0,46 lg КОЕ/мл соответственно.

После трех лет хранения в среде с наиболее низкими защитными свойствами – 10 % глицерине количество живых клеток оставалось достаточным для восстановления культур. Показатель КОЕ/мл для *V. cholerae* М-888 и М-1425 в абсолютном значении составил $1,1 \cdot 10^8$ и $1,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно после одного цикла замораживания-оттаивания и $1,8 \cdot 10^4$ и $3,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл после 15 циклов при начальной концентрации $4,1 \cdot 10^{10}$ и $3,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл.

Несмотря на то, что сразу после консервации в среде ЛЖ клетки холерных вибрионов устойчивы к повторным циклам замораживания-оттаивания, и трехкратное замораживание не приводит к статистически достоверному снижению концентрации, после 3 лет хранения количество живых клеток в пробах после одного и 15 циклов замораживания существенно отличалось. Значение КОЕ/мл для *V. cholerae* М-888 после 1 и 15 циклов замораживания-оттаивания – $1,3 \cdot 10^{10}$ и $1,1 \cdot 10^9$. Аналогичные показатели для *V. cholerae* М-1425 – $1,3 \cdot 10^{10}$ и $8,4 \cdot 10^8$. Результаты показывают, что повторное замораживание повышает чувствительность клеток к криоповреждающим факторам.

Жизнеспособность клеток после замораживания

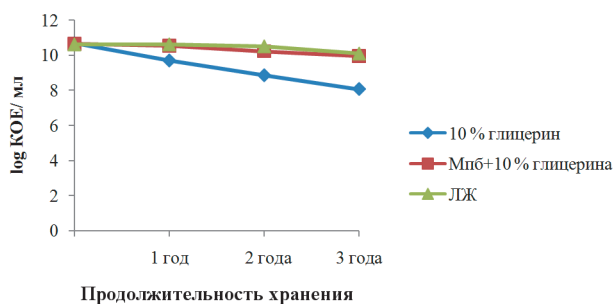


Рис. 2. Динамика гибели *V. cholerae* М-888 в условиях хранения при -70 °C

и хранения зависит не только от вида криопротектора, но и от его концентрации [6, 7]. Увеличение концентрации криопротектора изменяет осмотическое давление среды, ее вязкость при охлаждении, что влияет на степень дегидратации клетки до замораживания, температуру эвтектики или стеклоперехода, количество образующегося льда, его структуру.

Наиболее низкие защитные свойства при хранении холерных вибрионов показал 10 % глицерин. Мы сравнили динамику гибели клеток *V. cholerae* М-888 в защитных средах с концентрацией глицерина 10, 20, 30 %. Увеличение концентрации глицерина до 20 % привело к повышению выживаемости холерных вибрионов при хранении в замороженном состоянии и устойчивости клеток к повторным циклам замораживания-оттаивания (рис. 1). Количество живых клеток после двух лет хранения в 20 % растворе глицерина снизилось на 0,4 lg КОЕ/мл. Аналогичный показатель для 10 % глицерина – 1,8 lg КОЕ/мл. Выживаемость клеток в 20 % глицерине через 2 года хранения была ниже, чем в среде ЛЖ, но сравнима с МПБ с 10 % глицерина (снижение на 0,11 и 0,5 lg КОЕ/мл соответственно). Увеличение концентрации глицерина до 30 % не приводило к дальнейшему повышению выживаемости при хранении. Таким образом, оптимальной для консервации холерных вибрионов по использованному протоколу является концентрация глицерина в среде 20 %.

После хранения при субнулевых температурах у первых генераций культур отмечается удлинение лаг-фазы, что связывают с протеканием в клетках репаративных процессов [3]. В литературе описана повышенная продукция клетками после размораживания антибиотиков, ферментов [3].

Мы изучили основные диагностически значимые свойства холерных вибрионов через день после замораживания и после 3 лет хранения в замороженном состоянии. Популяции всех 7 штаммов, заложенных на хранение, были морфологически однородны, состояли из колоний только исходного фенотипа, в отличие от культур, хранившихся в течение года в 0,4 % агаре. Все штаммы, независимо от состава защитной среды, сохранили характерную для них биохимическую активность, чувствительность к диагностическим фагам, серологические свойства. У одного штамма выявлено изменение гемолитической активности после первого замораживания независи-

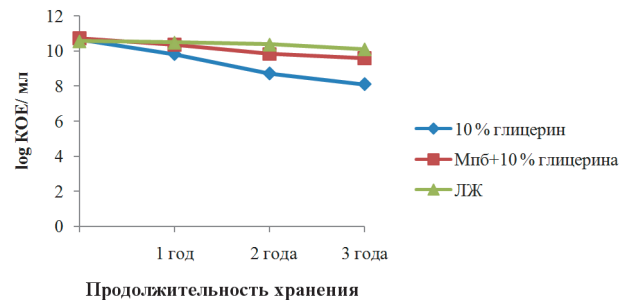


Рис. 3. Динамика гибели *V. cholerae* М-1425 в условиях хранения при -70 °C

мо от состава использованной защитной среды и времени хранения.

Холерные вибрионы Эльтор в отличие от представителей классического биовара лизируют эритроциты барана при росте на плотной питательной среде с кровью, что является одним из тестов дифференциации двух биоваров. Отсутствие гемолитической активности у представителей классического биовара связано с протяженной делецией в гене *hlyA* [4]. Из заложенных на хранение штаммов вибрионов Эльтор 4 лизировали эритроциты (зоны лизиса 0,15–0,4 см в зависимости от штамма), один штамм (МАК757) не лизировал эритроциты. При росте *V. cholerae* М-888 на агаре лизис эритроцитов наблюдается непосредственно под колонией.

После замораживания и трех лет хранения все штаммы, за исключением *V. cholerae* М-888, сохранили исходную гемолитическую активность, их популяции однородны по уровню регистрируемой продукции гемолизина. В популяции *V. cholerae* М-888 после первого замораживания появляются клоны с зоной гемолиза 0,2–0,25 см, что указывает на увеличение секреции или продукции гемолизина. Мы предполагаем, что данный факт может быть связан с нарушением избирательной проницаемости клеточных мембран после размораживания вследствие изменения фазового состояния мембранных липидов [11]. Повышенная проницаемость мембран некоторых клеток может быть причиной повышенной секреции продуцируемого клеткой гемолизина. Стабильность данного признака у штамма *V. cholerae* МАК757, вероятно, связана с генетическими изменениями, поэтому нарушение проницаемости мембран не влияет на результаты теста.

Результаты нашего исследования показывают, что холерные вибрионы устойчивы к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при -70°C в присутствии криопротекторов. Они могут быть сохранены без дополнительных пересевов в течение трех лет (срок наблюдения) без изменения основных диагностических признаков во всех тестируемых защитных средах. Снижение концентрации живых клеток в пробах происходит не только на этапе замораживания-размораживания клеточных суспензий, но и при хранении. Наиболее высокая выживаемость холерных вибрионов после замораживания-размораживания и хранения в замороженном состоянии отмечена в лактозо-желатиновой среде. При использовании в качестве протективной среды водного раствора глицерина оптимальной является концентрация криопротектора 20 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии

Роспотребнадзора; 2007. 87 с.

2. Каменских Т.Н., Калашникова Е.А., Ившина И.Б. Особенности криоконсервации алканотрофных актинобактерий рода *Rhodococcus*. Вестник Пермского университета. 2010; 1(1):15–20.

3. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Микробиология. 2008; 77(5):696–700.

4. Alm R.A., Manning P.A. Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(4):823–4.

5. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. Mem. Inst. Oswaldo Cruze. 2001; 96(4):583–6.

6. Cabri Guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying (cited 14.04.14). Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap3.html>.

7. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38(4):306–10.

8. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol. Rev. 2005; 29(5):897–910.

9. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70(1):268–72.

10. Michel C., Garcia C. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. Vet. Res. 2003; 34:127–32.

11. Wolfe J., Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology. 1999; 39(2):103–29.

References

1. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological recommendations]. M.: 2007. 87 p.

2. Kamenskikh T.N., Kalashnikova E.A., Ivshina I.B. [Peculiarities of cryo-conservation of alkane-trophic actinobacillus, genus *Rhodococcus*]. Bulletin of the Perm University. 2010; 1(1):15–20.

3. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E., Balyberdina L.M., Stepanyuk L.V., Pavlenko N.V. [Experience in long-term conservation of commercial microorganism strains]. Mikrobiologiya. 2008; 77(5):696–700.

4. Alm R.A., Manning P.A. Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. J. Clin. Microbiol. 1990; 28(4):823–4.

5. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. Mem. Inst. Oswaldo Cruze. 2001; 96(4):583–6.

6. Cabri Guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying (cited 14.04.14). Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap3.html>.

7. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38(4):306–10.

8. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol. Rev. 2005; 29(5):897–910.

9. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70(1):268–72.

10. Michel C., Garcia C. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. Vet. Res. 2003; 34:127–32.

11. Wolfe J., Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. Cryobiology. 1999; 39(2):103–29.

Authors:

Gracheva I.V., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Грачева И.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 12.05.14.

В.В.Кутырев¹, А.Ю.Попова², Е.Б.Ежлова², Ю.В.Демина², Н.Д.Пакскина², И.Н.Шарова¹,
А.И.Мищенко³, Е.Н.Рождественский³, Г.Х.Базарова³, Е.П.Михайлов³, Г.А.Ерошенко¹, Я.М.Краснов¹,
Л.М.Куклева¹, А.В.Черкасов¹, Е.Г.Оглодин¹, В.Е.Куклев¹, Г.Н.Одинок¹, С.А.Щербак¹,
С.В.Балахонов⁴, М.В.Афанасьев⁴, С.А.Витязева⁴, М.Ю.Шестопалов⁴, В.Т.Климов⁴

ЗАБОЛЕВАНИЕ ЧЕЛОВЕКА ЧУМОЙ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ В 2014 г. СООБЩЕНИЕ 2. ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁴ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Лабораторную диагностику чумы осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Особенностью стало проведение диагностических исследований на фоне лечения антибактериальными препаратами, обладающими выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителя чумы (цефтриаксон, ципролет, амикацин). Исследования показали, что в условиях антибиотикотерапии на ранних этапах заболевания наиболее эффективным методом лабораторной диагностики чумы является ПЦР, что позволяет на основании результатов этого метода осуществлять постановку не только предварительного, но и окончательного диагноза у больного. С помощью методов молекулярно-генетического анализа (ПЦР, мультилокусный VNTR-анализ, мультилокусное и полногеномное секвенирование) получена генетическая характеристика штаммов, выделенных от больного и сурка, изъятых на дому у больного, которые отнесены к античному биовару основного подвида возбудителя чумы. На основе филогенетического анализа установлено их близкое родство штамму *Y. pestis* основного подвида, изолированному в этом же очаге в 2012 г., а также штаммам из Монгольского Алтая и Тувинского горного очага.

Ключевые слова: чума, возбудитель чумы, основной и неосновные подвиды *Y. pestis*, лабораторная диагностика, молекулярно-генетический анализ.

V.V.Kutyrev¹, A.Yu.Popova², E.B.Ezhlova², Yu.V.Demina², N.D.Pakskina², I.N.Sharova¹, A.I.Mishchenko³,
E.N.Rozhdestvensky³, G.Kh.Bazarova³, E.P.Mikhailov³, G.A.Eroshenko¹, Ya.M.Krasnov¹, L.M.Kukleva¹,
A.V.Cherkasov¹, E.G.Oglodin¹, V.E.Kuklev¹, G.N.Odinokov¹, S.A.Shcherbakova¹, S.V.Balakhonov⁴,
M.V.Afanas'ev⁴, S.A.Vityazeva⁴, M.Yu.Shestopalov⁴, V.T.Klimov⁴

Infection of an Individual with Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of Laboratory Diagnostics and Molecular-Genetic Characterization of the Isolated Strains

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ³Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁴Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Laboratory diagnostics of plague was carried out in compliance with valid operational guidelines and regulations. But its peculiarity consisted in the performance of diagnostic investigations secondary to antimicrobial therapy with application of preparations characterized by the expressed activity towards gram-negative microorganisms, including the agent of plague (ceftriaxone, ciprolet, and amikacin). The studies revealed that under antibiotic treatment during the early phase of infection the most effective method for the laboratory plague diagnostics was PCR. Based on the results of the assay it was possible to establish not only provisional, but also the final diagnosis in a patient. Obtained was genetic characteristics of the strains isolated from the patient and the marmot, withdrawn at the patient's place, using techniques of molecular-genetic analysis, in particular PCR, multilocus VNTR, and multilocus and genome-wide sequencing. Thereupon the strains were attributed to antique biovar of the main subspecies of plague agent. In addition, close relation to *Y. pestis* of the main subspecies isolated in the same focus in 2012 and to the strains from Mongolian Altai and Tuvian mountain focus was determined based on phylogenetic analysis of the isolates.

Key words: plague, plague agent, main and non-main subspecies of *Y. pestis*, laboratory diagnostics, molecular-genetic analysis.

В 2014 г. на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай зарегистрирован случай заболевания человека чумой.

Распоряжением руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека задачи по оказанию консультативно-методической и практической помо-

щи по проведению лабораторной диагностики чумы, а также изучению выделенных штаммов (в том числе их полногеномное секвенирование) были возложены на Референс Центр по чуме ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

12 сентября 2014 г. врач-инфекционист Кош-Агачской ЦРБ поставила больному А. предварительный диагноз «Подмышечный лимфаденит не ясной этиологии слева. Туляремия, бубонная форма? Чума, бубонная форма?» [6]. Для проведения лабораторных исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекционных болезней в присутствии специалиста ФКУЗ «Алтайская ПЧС» с соблюдением требований нормативно-методических документов произведен забор материала от больного: кровь, содержащее бубона, мокрота, моча. Отбор проб осуществлен на фоне антибактериальной терапии препаратами широкого спектра противомикробного действия, обладающими выраженной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе возбудителя чумы (цефтриаксон назначен с 09.09.14 г., ципролет – с 11.09.14 г. и амикацин – с 12.09.14 г.). При заборе материала определено: в содержимом бубона нет, моча прозрачная.

Для проведения диагностических исследований материал доставлен в лабораторию Ташантинского эпидотряда. В соответствии с действующими нормативно-методическими документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики чумы и туляремии, осуществлен посев проб исследуемого материала на плотные и жидкие питательные среды (питательная среда для культивирования чумного микроба (ЧПС) и бульон Хоттингера (рН 7,2) с добавлением гемолизированной крови, FT-агар); произведены бактериоскопия мазков, окрашенных по Граму, заражение биопробных животных (по 2 белые мыши от каждого образца материала п/к и в/бр); выполнена постановка серологических реакций, направленных на поиск антигена чумного и туляремийного микробов (РНГА/РНАт) и антител к чумному и туляремийному микробам (РНГА/РНАг) [9].

При проведении серологических исследований с использованием антигенных и иммуноглобулиновых эритроцитарных диагностикумов получен отрицательный результат. В мазках клеток с морфологией, типичной для чумного и туляремийного микробов, не обнаружено. При просмотре посевов нативного материала на агаровых пластинках через 24 и 48 ч рост колоний, характерных для чумы и туляремии, не обнаружен. Все биопробные животные живы.

В условиях сложившейся ситуации полученные результаты вполне объяснимы. Раннее назначение антибиотиков изменяет свойственный чуме симптомокомплекс и затрудняет в дальнейшем не только клинический, но и бактериологический анализ. Лечение антибиотиками приводит к быстрому купированию инфекционного процесса и освобождению организма от возбудителя [2]. Установлено депрессивное влияние антибактериальных препаратов на

иммунную систему. Согласно литературным данным, своевременно начатое лечение антибиотиками зараженных животных препятствовало накоплению возбудителя в организме до пороговых концентраций, что снижало возможности как серологической, так и бактериологической диагностики. У животных, исследованных сразу после трехдневного лечения антибиотиками и в последующие сроки, выделить культуру чумного микроба не удавалось, антиген в серологических реакциях не определялся. Для проведения экспресс-диагностики (ПЦР, МФА, РНГА), бактериологических исследований и постановки биологической пробы часть клинического материала 13.09.2014 г. в 7.00 ч была направлена автотранспортом с сопровождающими лицами в стационарную лабораторию Алтайской ПЧС. В 19.00 в содержимом бубона методом ПЦР выявлена ДНК чумного микроба, единичные клетки со свечением на 4+ обнаружены в мазке пунктата бубона, окрашенном чумными флуоресцирующими иммуноглобулинами. В моче, крови, мокроте больного маркеров чумного микроба не обнаружено. Результаты исследований на туляремию отрицательные. По результатам индикации методами МФА через 2 ч и ПЦР через 6 ч от начала исследования выдан предварительный ответ о наличии в материале от больного антигена и ДНК возбудителя чумы.

Дальнейшие исследования проводили согласно схеме исследования клинического материала на чуму в соответствии с методическими указаниями по организации и проведению лабораторной диагностики чумы в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней. С учетом особенностей, при которых осуществлен забор материала от больного, для повышения эффективности выделения культуры возбудителя использовали плотные и жидкие питательные среды, куда в качестве стимулятора роста добавляли гемолизированную кровь: ЧПС (производитель ГНЦ ПМБ, Оболенск); агар и бульон Хоттингера, рН 7,2 (НИЦФ, Санкт-Петербург); среда для культивирования чумного микроба (ФКУЗ Иркутский НИПЧИ). Плотные питательные среды дополнительно обрабатывали чумной антифаговой сывороткой.

Для снижения резистентности у животных при постановке биологической пробы на белых мышах на первом этапе применяли куриный желток, а при проведении слепых пассажей – гидрокортизон. Поэтапное исследование биопробных животных также использовали для повышения эффективности биологического метода.

Наблюдение за животными и просмотр посевов осуществляли ежедневно. Через 48 ч бульоны с посевами нативного материала дополнительно исследовали методами ИХА, МФА и ПЦР. Положительный результат получен только при использовании ПЦР. ДНК возбудителя чумы выявлена в бульоне с посевом пунктата бубона. Вероятно, это обусловлено низкой концентрацией возбудителя в пробе, значи-

тельно ниже предельных концентраций, выявляемых в ИХА и МФА.

В период всего хода исследований ПЦР применяли на различных этапах лабораторной диагностики: использовали для идентификации при выявлении подозрительных колоний, контроля роста бульонных культур, исследований суспензий органов биопробных животных, в том числе при осуществлении слепых пассажей. Полученные результаты убедительно указывали на наличие маркеров возбудителя чумы только в материале из бубона.

18.09.2014 г. на 6-е сутки от начала исследования специалистами эпидотряда с высева со среды накопления (бульон с посевом пунктата бубона) выделена культура чумного микроба от больного. Следует отметить, что выделить культуру удалось и от биопробных животных, но только на 13-е сутки после третьего пассажа суспензии органов белой мыши, зараженной пунктатом бубона (с предварительной премедикацией гидрокортизоном – 5 мг в объеме 0,3 мл подкожно в область бедра). Также 18.09.2014 г. прямым посевом культура чумного микроба выделена из подчелюстного лимфатического узла от одного из трех сурков, изъятых на дому у больного. Сурки были добыты в ур. Сербисту. Для установления подвидовой принадлежности культур проведено определение их ферментативной активности.

19.09.2014 г. выделенные культуры, объекты с посевами от больного и сурков, а также кровь больного, взятая повторно, направлены в лабораторию Алтайской ПЧС для проведения расширенной идентификации, в том числе с использованием методов молекулярно-генетического анализа. Кроме того, для исследования подготовлены суспензии органов умерщвленных на 6-е сутки биопробных животных, зараженных в лаборатории Алтайской ПЧС нативным материалом пунктата бубона, кровью, мочой, мокротой.

При проведении диагностических исследований указанного материала получены следующие результаты.

Методом ПЦР с тест-системами «Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и «АмплиСенс *Y. pestis* – FL» (ООО «ИнтерЛабСервис») ДНК возбудителя чумы выявлена в бактериальных суспензиях выделенных культур; в бульоне с посевом пунктата бубона; в бульоне с посевами суспензий органов от одного сурка, изъятых у больного; в суспензии органов умерщвленной белой мыши, зараженной подкожно пунктатом бубона. При исследовании остальных проб получены отрицательные результаты.

Методом ПЦР с экспериментальным набором праймеров *ur2769ms06* Иркутского НИПЧИ для дифференциации основного и алтайского подвидов возбудителя чумы культуры, выделенные от больного и сурка, предварительно идентифицированы как основной подвид. МФА подтверждено наличие синтеза капсульного антигена (Ф1) в культурах вы-

деленных штаммов возбудителя чумы. В мазках из культур, окрашенных по Граму, выявлены грамотрицательные палочки.

При исследовании методом ИФА и в РНГА парных сывороток крови больного, взятых 12.09.2014 и 19.09.2014 гг., установлено: с первой сывороткой от 12.09.2014 г. получены отрицательные результаты; в сыворотке крови больного, взятой 19.09.2014 г., выявлены антитела в титрах 1:200 (в РНГА с антигенным эритроцитарным диагностикумом, производства Республики Казахстан) и 1:80 (в ИФА с тест-системой «ИФА–Ат–Ф1 *Yersinia pestis*», производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), что указывает на наличие сероконверсии и свидетельствует о формировании иммунного ответа к возбудителю чумы.

По результатам идентификации штаммы, выделенные от больного и сурка, изъятых на дому у больного, обладают типичными для основного подвида (*Yersinia pestis* ssp. *pestis*) культурально-морфологическими свойствами, лизируются цельными псевдотуберкулезным, чумными Л413«С» и Покровской бактериофагами. Штаммы ферментируют арабинозу, глицерин, не разлагают рамнозу, меллибиозу, лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, инозит, восстанавливают нитраты в нитриты, не обладают уреазной активностью, неподвижны. 100 % клеток сорбируют гемин на среде Джексона-Берроуза, обладают фибринолизин-пестицин-плазмокоагулазной активностью, продуцируют капсульный антиген Ф1. Установлено наличие четырех плазмид, три из которых (pYP, pYV, pYT) являются типичными для возбудителя чумы, и дополнительной плазмиды pTP33, характерной для штаммов *Y. pestis* из Тувинского горного очага чумы и участков Монгольского Алтая [1], а также хромосомной области пигментации (*ybt*, *pgm*), что свидетельствует о вирулентности штаммов.

Штаммы чувствительны к антибактериальным препаратам: амикацину, гентамицину, доксициклину, ко-тримоксазолу, офлоксацину, рифампицину, тобрамицину, цефтриаксону, пенициллину G, полимиксину, тетрациклину, канамицину, стрептомицину, ципрофлоксацину, ампициллину, цефотаксиму.

По результатам лабораторных исследований на основании выделения культуры от больного и ее идентификации как *Yersinia pestis* ssp. *pestis*, а также наличия сероконверсии подтвержден клинический диагноз «Бубонная чума».

Кроме материала от больного, в лабораториях Алтайской ПЧС и эпидотряда были проведены исследования бактериологическим, серологическими и/или молекулярно-генетическими методами материала от контактных лиц, тушек сурков, изъятых у населения, а также грызунов и эктопаразитов, добытых в ходе эпизоотологического мониторинга участков Сербисту, Ирбисту, Кок-Озек, Курайского хребта Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы [6, 10]. 18.09.2014 г., одновременно со штаммами от больного и сурка, выделена культура *Y. pestis*

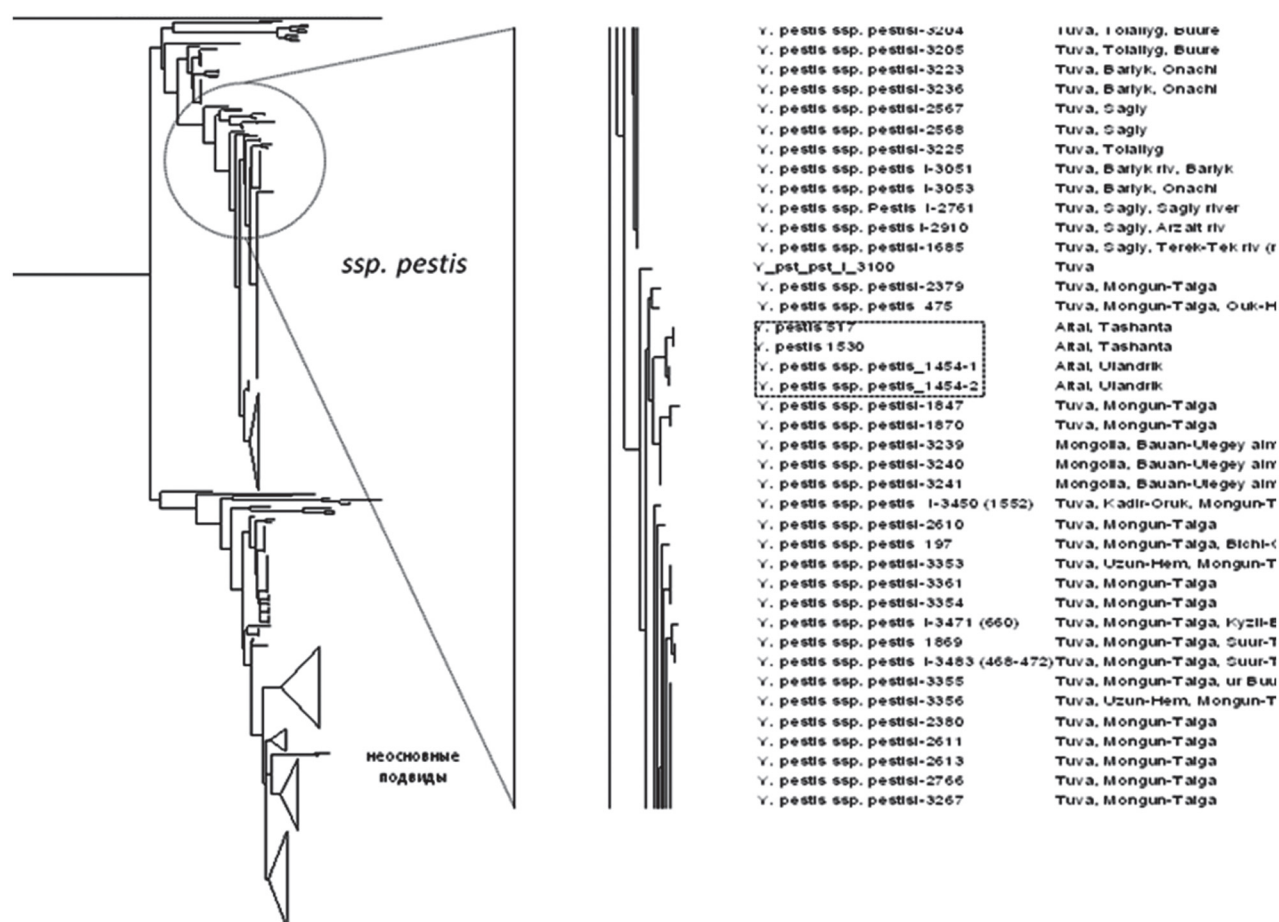


Рис. 1. Филогенетическое родство штаммов *Y. pestis* основного подвида (выделены рамкой), изолированных в 2012 и 2014 гг. в Горно-Алтайском высокогорном очаге, со штаммами из Тувинского горного очага и Монголии по результатам VNTR₂₅-анализа

от блох *Paradoxopsyllus scorodumovi* (4 экз.), собранных из входов нор монгольской пищухи при проведении эпизоотологического обследования территории ур. «Сербисту». Выделенный штамм по своим культурально-морфологическим свойствам и биохимической активности относится к неосновному алтайскому подвиду (*Yersinia pestis* ssp. *altaica*) чумного микроба: не ферментирует арабинозу, лактозу, сахарозу, дульцит, сорбит, инозит, не восстанавливает нитраты в нитриты, ферментирует глицерин, рамнозу, ксилозу, мелибиозу, глюкозу, мальтозу, маннит, не обладает уреазной активностью. По результатам молекулярно-генетического анализа штамм имеет три плазмиды (pYP, pYV, pYT). Методом ПЦР с экспериментальным набором праймеров ур2769ms06 Иркутского НИПЧИ культура возбудителя чумы от блох монгольской пищухи также идентифицирована как алтайский подвид.

Полученные результаты и проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что в условиях антибиотикотерапии наиболее эффективным методом лабораторной диагностики чумы является ПЦР, и в определенных условиях (наличие характерных клинических проявлений, эпидемиологического анамнеза) на основании результатов этого метода может быть установлен окончательный диагноз. Последнее требует решения вопроса о внесении

соответствующих изменений в нормативно-методические документы, регламентирующие проведение лабораторной диагностики чумы.

Использование зарегистрированных ПЦР-тест-систем в лабораторной диагностике чумы уже на этапе индикации позволяет установить видовую принадлежность возбудителя, но не дифференцирует подвиды, что в конкретных условиях оказалось важным. Следовательно, необходима разработка и внедрение в практику простых и надежных диагностических препаратов для осуществления подвидовой дифференциации возбудителя чумы, которые могут быть использованы в лабораториях регионального уровня (противочумные станции) еще на этапе индикации.

Следующим этапом исследований было проведение молекулярно-генетического анализа выделенных в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы штаммов *Y. pestis*. Штаммам, выделенным от больного и сурка, присвоены номера *Y. pestis* 517 и *Y. pestis* 1530 соответственно, штамму от блох *P. scorodumovi* – *Y. pestis* 1313.

Методом мультилокусного анализа по 25 VNTR локусам получены цифровые VNTR-профили штаммов, на основе которых с помощью базы данных BioNumerics (Applied Maths) проведено их филогенетическое исследование (рис. 1).

Установлено, что штаммы *Y. pestis* 517 и *Y. pestis*

1530 имеют полностью идентичные VNTR-профили, которые значительно отличаются от профиля штамма *Y. pestis* 1313, изолированного в этот же период в очаге от блох *P. scorodumovi*, а также от типичных штаммов *Y. pestis*, выделяемых в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы с 1961 г. по настоящее время.

Штаммы *Y. pestis* 517 и *Y. pestis* 1530 так же, как и выделенный в 2012 г. в этом природном очаге штамм основного подвида 1454, попали в одну группу со штаммами, изолированными в конце 80-х годов на территории Хуух-Сэрх-Мунх-Хайрхаан природного очага чумы (Дэлуун-сомон Баян-Ульгийского аймака Монголии), что является свидетельством близкого филогенетического родства этих штаммов (рис. 1).

Дальнейший молекулярно-генетический анализ штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1313 проведен в Референс-центре по мониторингу за возбудителем чумы и другими опасными инфекциями в РосНИПЧИ «Микроб».

Молекулярно-генетический анализ выделенных штаммов *Y. pestis* методами ПЦР и мультилокусного секвенирования

Определение подвидовой принадлежности выделенных штаммов *Y. pestis* осуществляли в соответствии со стандартным алгоритмом молекулярного типирования возбудителя чумы [4]. Для проведения анализа использовали экспериментальный набор праймеров, комплементарных нуклеотидным последовательностям генов *terC*, *ilvN*, *inv*, *rhaS*, *araC*, *ssuA*, *melB*, *metB*, *glpD*, *napA* [3, 4, 5, 7, 8].

С помощью мультилокусной ПЦР с праймерами на последовательность генов *terC*, *ilvN* и *inv* была проведена дифференциация исследуемых штаммов *Y. pestis* по их принадлежности к основному и неосновным подвидам возбудителя чумы. В результате штаммы *Y. pestis* 517 и 1530, полученные от больного и сурка, отнесены к основному подвиду *Yersinia pestis* ssp. *pestis* (рис. 2, А). В гене *terC* у них присутствует делеция в 89 п.н. (размер ПЦР-фрагмента 300 п.н.), а в гене *ilvN* – делеция в 45 п.н. (размер ПЦР-фрагмента 515 п.н.). Обе делеции являются маркерными для штаммов *Y. pestis* основного подвида. Эти мутации отсутствуют в образце ДНК штамма *Y. pestis* 1313, выделенного от блох монгольской пищухи, у которого гены *terC* и *ilvN* находятся в интактном состоянии. Размеры образуемых в ПЦР фрагментов ДНК штамма *Y. pestis* 1313 составили: *terC* – 389 п.н.; *ilvN* – 560 п.н. На основании полученных результатов штамм *Y. pestis*, выделенный от блох монгольской пищухи, отнесен к неосновному подвиду. Все три образца ДНК четко отличались от ДНК близкородственной возбудителю чумы бактерии *Y. pseudotuberculosis* по наличию вставки инсерционной последовательности IS1541 в гене *inv* (размер образуемого ПЦР-фрагмента у штаммов *Y. pestis* составляет 877 п.н., у *Y. pseudotuberculosis* – 169 п.н.).

В монолокусной ПЦР с праймерами на межгенный участок YPO3333–YPO3332 установлено, что штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи относится к алтайскому (неосновному) подвиду, поскольку в этом межгенном участке у него выявлена маркерная для штаммов алтайского подвида делеция размером 122 п.н., которая отсутствует у штаммов *Y. pestis* других подвигов (рис. 2, Б). Размер образуемого ПЦР-фрагмента составил у штамма *Y. pestis* 1313 (как и у других штаммов алтайского подвида) 90 п.н., у всех остальных подвигов он равен 212 п.н.

Также для подтверждения принадлежности выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к основному, а штамма 1313 к алтайскому подвиду проведено определение их генотипов на основе мультилокусного секвенирования с использованием вариативности нуклеотидной последовательности генов дифференциальных биохимических признаков *rhaS*, *araC*, *glpD*, *napA* [4]. В результате установлено, что штаммы 517 и 1530 от больного и сурка имеют генотип rhS1-arC1-np1-gpD1, характерный для штаммов основного подвида. Гены имеют интактную структуру за исключением гена *rhaS*, в позиции 671 которого присутствует нуклеотидная замена G→A, маркерная для штаммов основного подвида, и которая отсутствует у штаммов неосновных подвигов и *Y. pseudotuberculosis*. Дополнительно на основе интактности генов *glpD* и *napA* установлена принадлежность штаммов 517 и 1530 основного подвида к античному биовару возбудителя чумы. Штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи имеет характерный для алтайского подвида генотип rhS3-arC2-np3-gpD1 и содержит вставку единичного нуклеотида G после 773 нуклеотида от начала гена *araC* при интактности других генов *araC*, *glpD* и *napA*. Таким образом, ме-

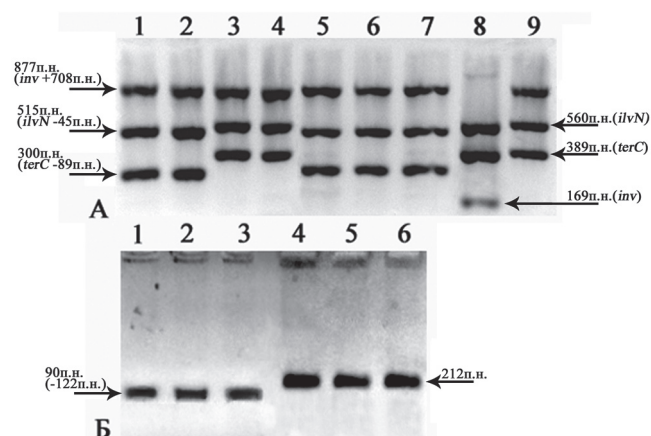


Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis*, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы в 2014 г.

А – дифференциация основного подвида *Y. pestis* от неосновных подвигов и от *Y. pseudotuberculosis*. Штаммы *Y. pestis*, основной подвида: 1 – И-3358 (Тувинский горный очаг), 2 – КМ932 (И-3223) (Тувинский горный), 5 – 1530 (Горно-Алтайский высокогорный), 6 – 517 (Горно-Алтайский высокогорный), 7 – И-3244 (Баян-Ульгийский аймак, Монголия); алтайский подвида (Горно-Алтайский высокогорный): 3 – КМ683 (И-2359), 4 – 1313, 9 – И-2998, 8 – *Y. pseudotuberculosis* IV. Б – ПЦР-детекция штаммов *Y. pestis* алтайского подвида. Алтайский подвида: 1 – КМ638 (И-2359), 2 – 1313, 3 – И-2998; основной подвида: 4 – 1530, 5 – 517, 6 – КМ932 (И-3223).

Таблица 1

Генетические основы фенотипических отличий между штаммами основного и алтайского подвидов возбудителя чумы

Штамм <i>Y. pestis</i>	Мутации в генах				
	<i>rhaS</i> (671*)	<i>araC</i> (773*)	<i>melB</i> (1231*)	<i>ssuA</i> (302*)	<i>metB</i> (988*)
517 (основной подвид), от больного	A	–	+ IS285	–	– G
1530 (основной подвид), от сурка	A	–	+ IS285	–	– G
1313 (алтайский подвид), от блох <i>P. scrodrumovi</i>	G	+ G	–	+ G	–

* Позиция варибельного нуклеотида в гене.

тодом мультилокусного секвенирования подтверждена принадлежность штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к основному подвиду, от блох монгольской пищухи *Y. pestis* 1313 – к алтайскому подвиду.

У выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 от носительно штамма 1313 выявлены отличия в генах, кодирующих другие фенотипические отличия (ферментация мелибиозы, редукция нитратов, питательная потребность в аминокислоте метионине) (табл. 1) [3, 8].

Для установления принадлежности штаммов 517 и 1530, выделенных от больного и сурка, к конкретной филогенетической линии основного подвида возбудителя чумы использован комплект экспериментальных праймеров, выявляющих единичные нуклеотидные замены, маркерные для основных филогенетических линий возбудителя чумы. В результате проведенного анализа определена маркерная для филогенетической линии 4.ANT мутация – замена единичного нуклеотида G→A позиции 124 гена *YPO1418*. Это доказывает принадлежность выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 к линии 4.ANT, штаммы которой циркулируют в Тувинском горном очаге и пограничном с Горно-Алтайским высокогорным природным очагом районе Монголии.

Таким образом, на основе комплексного генетического анализа генов жизнеобеспечения – ферментации сахаров (*rhaS*, *araC*, *melB*) и глицерина (*glpD*), редукции нитратов (*napA*, *ssuA*) и биосинтеза аминокислоты метионина (*metB*), а также маркерных мутаций различных филогенетических линий возбудителя чумы установлено, что штаммы *Y. pestis* 517 и 1530, выделенные от больного и сурка, относятся к штаммам античного биовара основного подвида линии 4.ANT. Штамм *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи принадлежит к алтайскому подвиду.

Полногеномное секвенирование ДНК штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1313 и биоинформационный анализ полученных данных

Секвенирование геномной ДНК осуществляли на платформе Ion PGM (Life Technologies) с использованием набора реагентов, позволяющих получать длину прочтения единичного фрагмента ДНК около

400 п.н. Далее с использованием программы Newbler v. 2.6 (454 Life Sciences, Roche Diagnostics), единичные прочтения собраны в контиги и аннотированы с использованием программы Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>).

При анализе полногеномных последовательностей выделенных штаммов установлено, что во всех трех исследованных пробах присутствуют хромосомная область пигментации (*pgm*), включающая *hms* оперон и остров высокой патогенности HPI с *ybt* локусом, гены *pla* и *pst* (плазмида pPst), *caf* и *ymt* (pFra), *lcrV*, *yopM* и *yopN* (pCad). Таким образом, штаммы *Y. pestis* 517, 1530 и 1313 имеют набор основных генов, ассоциируемых с вирулентностью возбудителя чумы.

Для реконструкции филогенетических отношений проведено сравнение полученных нуклеотидных последовательностей ДНК полных геномов штаммов, выделенных от человека (*Y. pestis* 517) и сурка (*Y. pestis* 1530), от блох монгольской пищухи (*Y. pestis* 1313), с ранее секвенированными нами геномами штаммов *Y. pestis*, выделенных на территориях природных очагов чумы Российской Федерации и сопредельных стран, а также с геномами возбудителя чумы, представленными в международной базе данных NCBI GenBank, изолированными на территории Монголии, Китая, Непала и США.

Филогенетический анализ методом сравнения полиморфизма единичных нуклеотидов (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) полученных черновых (draft) геномов проводили с помощью программы Wombac (<https://github.com/Victorian-Bioinformatics-Consortium/wombac>). Суть филогенетического анализа заключалась в определении матрицы полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs) высокой степени достоверности у 46 геномов штаммов *Y. pestis*, относительно коровой части генома референтского штамма *Y. pestis* CO92. Количество варибельных позиций (SNPs) в данной матрице составило 2102. Полученная матрица SNPs кластеризована с помощью программного обеспечения BioNumerics v. 7.1 (Applied Maths) с использованием алгоритма максимальной экономии (Maximum parsimony tree).

Анализ показал, что максимальное совпадение по матрице SNPs (99,9 %) нуклеотидные последовательности ДНК полных геномов штаммов *Y. pestis* 1530 и 517 имеют как между собой, так и с нуклеотидной последовательностью ДНК штамма *Y. pestis* 1454, выделенного в 2012 г. на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в ур. Большие Сары-Гобо (рис. 3, группа № 37, 38 и 39 соответственно). Степень подобия в 98,5 % по матрице SNPs нуклеотидные последовательности этих штаммов показали со штаммом основного подвида *Y. pestis* MGJZ12 (NCBI GenBank), выделенного в Сайлюгемском природном очаге чумы (район озер Даян Нур и Халгашин Нур) Баян-Ульгийского аймака Монголии [13], который граничит с Горно-Алтайским высокогорным очагом чумы (рис. 3, № 36).

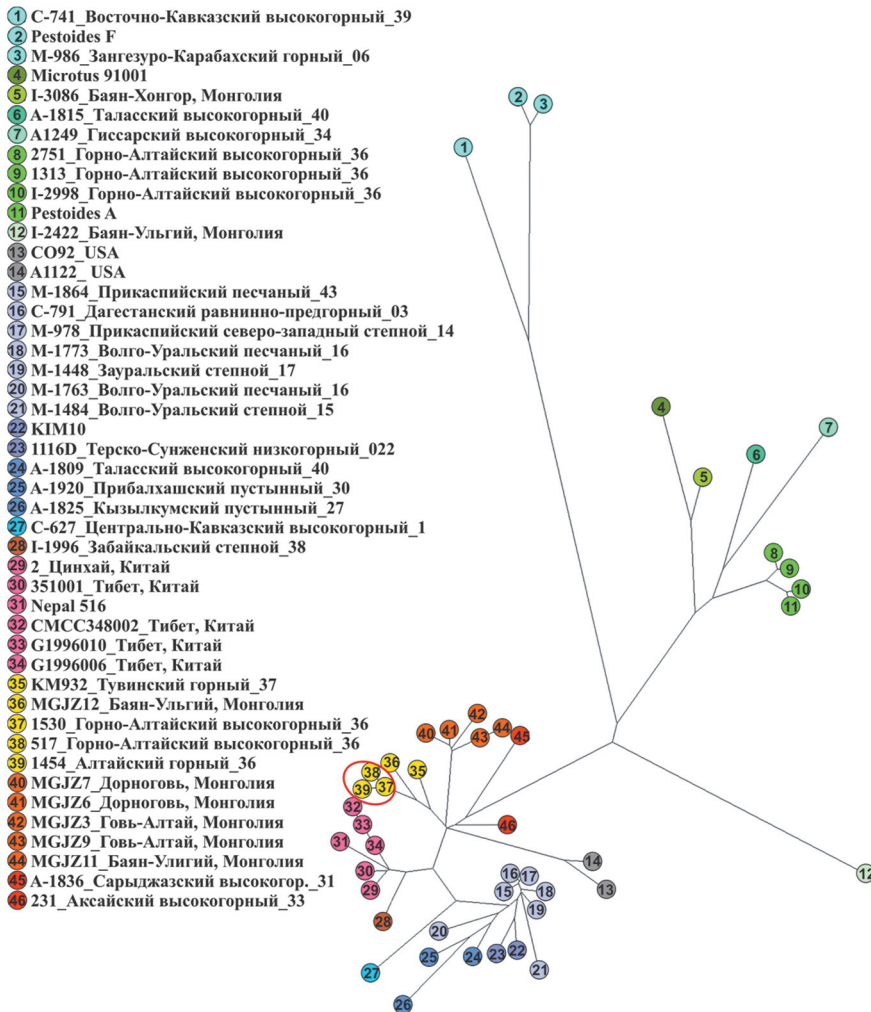


Рис. 3. Филогенетическое родство выделенных в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге штаммов *Y. pestis* со штаммами из других природных очагов на основе анализа полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs)

Кроме того, нуклеотидные последовательности этих штаммов показали степень подобия в 98,1 % по матрице SNPs с последовательностью ДНК штамма основного подвида *Y. pestis* KM932 из Тувинского горного природного очага чумы, граничащего с Горно-Алтайским высокогорным природным очагом чумы на северо-востоке (рис. 3, № 35).

Штамм *Y. pestis* 1313 (алтайский подвид, изолирован от блох монгольской пищухи в 2014 г.) имеет максимальное совпадение нуклеотидной последовательности ДНК генома по матрице SNP (99,7 %) со штаммом алтайского подвида *Y. pestis* 2751-55 (2012 г.) из Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы (рис. 3, № 9 и 8 соответственно).

Согласно результатам проведенной кластеризации (рис. 3) анализируемые геномы 46 штаммов *Y. pestis* разделились на ряд групп, близких по набору единичных точечных мутаций нуклеотидов. Отдельный кластер сформировали три штамма *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага – 1454, 1530, 517 и штаммы KM932 из Тувинского горного очага и MGJZ12 из Баян-Ульгийского аймака Монголии. Ближайший к нему кластер состоит из других штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных на территории Монголии (рис. 3, № 40–44). Более удаленно распола-

гаются штаммы *Y. pestis* основного подвида из Тянь-Шаньских высокогорных очагов чумы (№ 45, 46), а так же Китая и Непала (рис. 3, № 29–34). Остальные штаммы *Y. pestis* основного подвида также сформировали отдельные кластеры, представленные на дендрограмме (рис. 3). Как следует из этой дендрограммы группа штаммов *Y. pestis* неосновных подвида (№ 1–12) значительно удалена от кластеров штаммов основного подвида. Штамм *Y. pestis* 1313 (№ 9) расположился в кластере штаммов алтайского подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага (№ 8–11). Он имеет максимальное подобие со штаммом *Y. pestis* 2751-55 (№ 8), выделенным в 2012 г. в этом очаге.

На основе сравнения геномов 46 использованных штаммов *Y. pestis* выявлена 61 уникальная точечная мутация нуклеотидов в последовательности ДНК штаммов 1530, 517, 1454, MGJZ12 и KM932, которая отличает их от всех представленных 229 геномов *Y. pestis* в NCBI GenBank и группы геномов *Y. pestis*, секвенированных нами ранее. Из выделенной 61 мутации 12 SNPs характерны только для штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1454 (табл. 2); 9 SNPs – для штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1454 и MGJZ12; 13 SNPs – для штаммов *Y. pestis* 517, 1530, 1454, MGJZ12 и KM932; 14 SNPs – для штамма *Y. pestis* MGJZ12 и 13 SNPs – для штамма *Y. pestis* KM932. Найденные уникальные

Уникальные точечные мутации нуклеотидов штаммов *Y. pestis* 517, 1530 и 1454 основного подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге

Позиция по референс-штамму CO92, п.н.	Точечная мутация (SNP)	Название (номер) штаммов <i>Y. pestis</i>					Область или ген, содержащие SNP
		517	1530	1454	MGJZ12	KM932	
394234	C > A	+	+	+	-	-	перед YPO0379
928294	G > T	+	+	+	-	-	между YPO0847 и YPO0847
1484392	C > T	+	+	+	-	-	<i>dacC</i> (YPO1320)
1996447	C > T	+	+	+	-	-	YPO1751a
2057419	C > A	+	+	+	-	-	YPO1811
2092484	T > G	+	+	+	-	-	<i>yecC</i> (YPO1811)
3270727	G > A	+	+	+	-	-	<i>murQ</i> (YPO2925)
3362591	A > G	+	+	+	-	-	YPO3009
3495476	C > T	+	+	+	-	-	перед <i>rpmE2</i>
3693309	G > T	+	+	+	-	-	YPO3311
3718023	A > G	+	+	+	-	-	YPO3332
4339797	G > A	+	+	+	-	-	<i>wzzE</i> (YPO3865)

точечные мутации могут быть использованы для идентификации штаммов *Y. pestis* основного подвида из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и близких к ним штаммов *Y. pestis* из сопредельных территорий (табл. 2).

Штаммы основного подвида *Y. pestis* 1530, 517 и выделенный ранее 1454 имеют высокое подобие по структуре хромосомной области ДНК, а также одинаковый плазмидный состав (три основные плазмиды: pCD1 pMT1 pPCP1 и дополнительную pTP33), отличающий их от всех ранее выделявшихся в очаге алтайских штаммов *Y. pestis*, которые обладают типичным для возбудителя чумы набором из трех плазмид [2].

Таким образом, на основании полученных с помощью методов ПЦР, мультилокусного VNTR-анализа, мультилокусного и полногеномного секвенирования данных можно сделать вывод о принадлежности выделенных от больного и сурка штаммов *Y. pestis* (517 и 1530 соответственно) в 2014 г. в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы к основному подвиду, а штамма *Y. pestis* 1313 от блох монгольской пищухи – к алтайскому подвиду. Проведенный филогенетический анализ полиморфизмов единичных нуклеотидов (SNPs) коровой части геномов выделенных штаммов *Y. pestis* 517 и 1530 основного подвида указывает на их максимальную близость штамму основного подвида *Y. pestis* 1454, выделенному в 2012 г. на территории этого же очага чумы, а также штамму основного подвида *Y. pestis* MGJZ12 из Баян-Ульгийского аймака Монголии. Все эти штаммы относятся к филогенетической линии 4.ANT, которая не встречается в других регионах мира. Полученные молекулярно-генетические данные позволяют сделать обоснованное предположение о том, что для всей территории Юго-Восточной области Горного Алтая характерна циркуляция штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара линии 4.ANT («Тувинский вариант»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяз А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Денисов А.В., Ивженко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:60–5.
2. Дмитриевский А.М., Белозеров Е.С. Чума. Алматы; 1995. 172 с.
3. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариабельности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50(5):522–30.
4. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. *Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол.* 2012; 3:25–35.
5. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):38–42.
6. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
7. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент RU 2425891. Оpubл. 10.08.2011. Бюл. 22.
8. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Павлова А.И., Кутырев В.В. Генетические основы метионинзависимости штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. *Генетика*. 2011; 47 (3):332–8.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
10. Оищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
11. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *PNAS*. 2013; 110(2):577–82.

References

1. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–5.
2. Dmitrovsky A.M., Belozero E.S. [Plague]. *Almaty*, 1995. 172 p.
3. Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Genetic foundations of nitrate reduction variability in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika*. 2014; 50(5):522–30.
4. Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Standard algorithm for molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2012; 3:25–35.
5. Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kuklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinkov G.N., Kutyrev V.V. [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiological agent of main and minor subspecies]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):38–42.
6. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
7. Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Pavlova A.I., Anisimova L.V., Kutyrev V.V. [Method of differentiation between *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* using polymerase chain reaction]. RF Patent 2425891.
8. Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Pavlova A.I., Kutyrev V.V. [Genetic foundations of methionine-dependency in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. *Genetika*. 2011; 47(3):332–8.
9. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections: Practice Guidelines]. M.: ZAO "Shiko", 2013. 560 p.
10. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia, and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
11. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S.,

Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *PNAS*. 2013; 110(2):577–82.

Authors:

Kutyrev V.V., Sharova I.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odinkov G.N., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russian Federation.

Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Кутырев В.В., Шарова И.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва, Российская Федерация.

Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 26.11.14.

Е.Г.Оглодин, Г.Н.Одинок, К.А.Никифоров, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВАРИАНТОВ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО ПОДВИДА МЕТОДОМ ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Впервые разработан способ определения геновариантов штаммов *Yersinia pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. Для дифференциации геновариантов античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 4.ANT), средневекового (2.MED, 2.MED0) и восточного (1.ORI) биоваров использован комплекс ДНК-мишеней, большинство из которых выявлено впервые. Применение их в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов обеспечивает быстрое и надежное разделение штаммов этих геновариантов, циркулирующих в различных географических регионах. Эффективность метода подтверждена при анализе 110 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории России, ближнего и дальнего зарубежья, в том числе 37 штаммов античного, 53 штаммов средневекового и 20 штаммов восточного биоваров.

Ключевые слова: возбудитель чумы, основной подвида, геноварианты, ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

E.G.Oglodin, G.N.Odinokov, K.A.Nikiforov, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko

Identification of Genovariants of *Yersinia pestis* Strains Belonging to Main Subspecies Using PCR with Hybridization-Fluorescent Registration of Results

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

For the first time ever developed has been the method of identification of genovariants in *Yersinia pestis* strains belonging to the main subspecies using PCR with hybridization-fluorescent registration of results. A complex of DNA-targets, the most of which are newly detected ones, have been utilized to differentiate between genovariants of antique (0. ANT, 1. ANT, 2. ANT, 4. ANT), medievalis (2. MED, 2. MED0), and orientalis (1. ORI) biovars. Application of these targets in PCR with hybridization-fluorescent registration of results provides for a rapid, effective and reliable classifying of the strains of the genovariants, circulating in various geographical regions. Efficacy of the method has been validated via analysis of 110 *Y. pestis* strains, isolated in the territory of the Russian Federation, neighboring countries and beyond, including 37 strains of antique, 53 strains of medievalis, and 20 strains of orientalis biovars.

Key words: plague agent, the main subspecies, genovariants, PCR with hybridization-fluorescent registration of results.

В основной подвида возбудителя чумы входят штаммы *Yersinia pestis* с высокой и универсальной вирулентностью и высокой эпидемической значимостью. На основании биохимических отличий и по историко-географическому принципу штаммы основного подвида делятся на античный, средневековый и восточный биовары, каждый из которых вызвал одну из трех прошедших в истории пандемий чумы. По результатам проведенного полногеномного секвенирования ряда штаммов *Y. pestis* выделены три филогенетические линии основного подвида: древняя линия «0» и две ее производные «1» и «2». В эти филогенетические линии входят основные геноварианты античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT), средневекового (2.MED) и восточного (1.ORI) биоваров [6, 8]. Выполненное недавно полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного и Тувинского горного очагов, расположенных в России, позволило выделить еще два геноварианта штаммов средневекового (2.MED0) и античного (4.ANT) биоваров [3]. Штаммы геноварианта 4.ANT античного биовара были выявлены ранее и на территории Монголии [7].

Определение геноварианта штамма (и, следовательно, его географического происхождения) важно

для установления источника происхождения и вероятных путей заноса инфекции, что требует разработки быстрых и надежных способов молекулярной идентификации геновариантов возбудителя чумы. Целью этого исследования была разработка способа определения геновариантов штаммов *Y. pestis* основного подвида методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов.

Материалы и методы

В работе использовано 110 штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных в природных очагах России, в ближнем и дальнем зарубежье (табл. 1). Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли стандартным методом в соответствии с МУ 1.3.2569-09 [4].

Последовательности использованных праймеров и зондов в формате TaqMan приведены в табл. 2. В качестве флуоресцентных красителей использовали FAM и ROX красители, а гасителей флуоресценции – BHQ1 и BHQ2. Условия проведения реакции были следующими: для мишеней «glpD» и «TUV» – 1 цикл при 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °C 15 с, 60 °C 20 с, 72 °C 10 с; «med24» и

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *Y. pestis* основного подвида и определение их геновариантов

Штаммы, происхождение, шт.	ДНК мишени, наличие сигнала в ПЦР						Геновариант
	cusφ	70	med24	pCKF	glpD	TUV+	
Античный биовар							
Высокогорные очаги Тянь-Шаня – 15 штаммов	–	+	+	–	+	–	0.ANT
Африка – 4	+	+	+	–	+	–	1.ANT
Забайкальский степной очаг – 8	–	–	+	–	+	–	2.ANT
Тувинский горный очаг, Монголия – 10	–	+	+	–	+	+	4.ANT
Средневековый биовар							
Очаги Прикаспия, Кавказа, Средней Азии – 35	–	–	–	–	+	–	2.MED
Центрально-Кавказский высокогорный очаг – 18	–	+	+	+	+	–	2.MED0
Восточный биовар							
Вьетнам, США, Европа – 20	+	+	+	–	–	–	1.ORI

«pCKF» – 1 цикл при 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °C 20 с, 56 °C 40 с; «Cusф» – 1 цикл при 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °C 15 с, 60 °C 30 с, 72 °C 25 с; «70» – 1 цикл при 95 °C в течение 15 мин, затем 35 циклов при 95 °C 15 с, 60 °C 20 с, 72 °C 10 с. Амплификацию ДНК осуществляли для каждой ДНК-мишени в отдельной реакции в амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). На этапе отжига праймеров проводили учет флуоресценции, уровень порога равнялся 0,05, специфичность реакции определялась значением St менее 31. Результат обеспечивался программным измерением значения St графика кривой флуоресценции, что отображалось в виде статуса реакции («реакция» и «нет реакции»).

Результаты и обсуждение

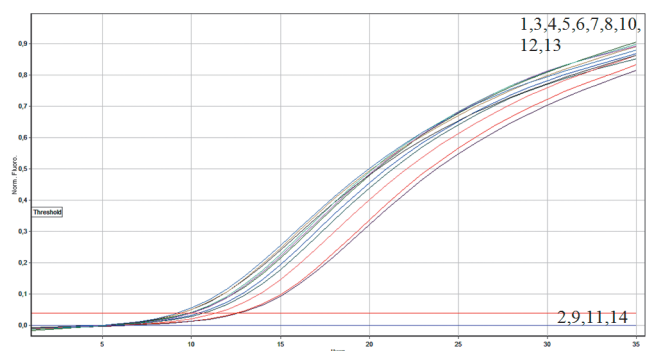
Для разработки быстрого и надежного способа определения геновариантов основного подвида возбудителя чумы в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов проведен поиск эффективных ДНК мишеней, обеспечивающих выявление геновариантов античного (0.ANT, 1.ANT, 2.ANT, 4.ANT), средневекового (2.MED, 2.MED0) и восточного (1.ORI) биоваров. Ранее нами было установлено, что в геноме штаммов средневекового биовара между генами *gcuT* и *visC* после 3626562 нуклеотида присутствует делеция размером 24 п.н., которая отсутствует у штаммов других биоваров [1]. Для выявления штаммов средневекового биовара (геновариант 2.MED) в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов на мишень «Med24» рассчитаны праймеры, фланкирующие делецию, и зонд в варианте TaqMan, комплементарный самому участку делеции (табл. 2). Эффективность рассчитанных праймеров и зонда проверена на 110 использованных в этой работе штаммах основного подвида, в том числе на 35 штаммах средневекового биовара (табл. 1). У всех штаммов античного и восточного биоваров наблюдался положительный сигнал амплификации, который отсутствовал у штаммов средневекового биоваров (рисунков, А). Единственным

исключением оказались штаммы средневекового биовара из некоторых участков Центрально-Кавказского высокогорного очага чумы. Эти штаммы отнесены нами ранее к геноварианту 2.MED0 на основе полногеномного секвенирования одного из них – *Y. pestis* C-627 [3]. Штаммы геноварианта 2.MED0 содержат уникальную криптическую плазмиду размером 5,4 т.п.н., которая отсутствует у других штаммов *Y. pestis* [2, 5]. На основе впервые полученной полной нуклеотидной последовательности этой плазмиды выбран ее участок в позиции 3205–3332, который обозначен нами как мишень «pCKF», рассчитаны праймеры и зонд в формате TaqMan для специфической детекции штаммов средневекового биовара геноварианта 2.MED0 (табл. 2). Их эффективность проверена на использованных в этой работе штаммах основного подвида, включая 18 штаммов из Центрально-Кавказского вы-

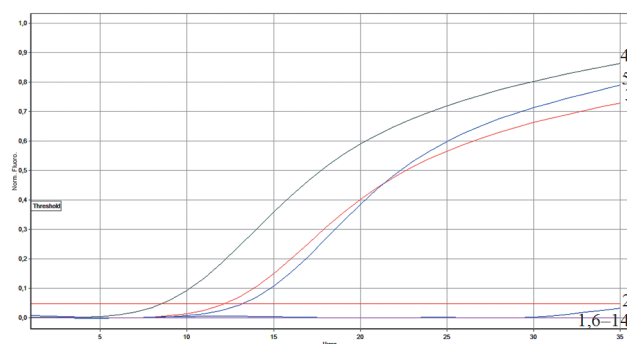
Таблица 2

Использованные в работе праймеры и зонды

ДНК-мишень	Последовательность 5'-3'
cusф-S	AGCGTACTCAGCTAATG
cusф-As	TATGGCGGACAAACAGAG
cusф-P	FAM-CACTCGACTTATGAAGAACTGGCC-BHQ1
med24-S	GCCAGTGTGTGTCTAAA
med24-As	CAACATTCGTCGCAAAG
med24-P	FAM-ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC-BHQ1
pCKF-S	AACCGCCTAAGCACTTTAT
pCKF-As	CGTCAGGAACCTCAACGAA
pCKF-P	FAM-ATCAGAGAGCATTTGAGCGGTTG-BHQ1
glpD-S	CAAGGCTTCACTTACCAAG
glpD-As	CAGAGGAAGGTAACATGGA
glpD-P	FAM-TACCGACAGGCCACGCCAG-BHQ1
TUV-S	CGCCGCCCATTCGGATTTA
TUV-As	TCTGGCTTCCCCTTCTCTGC
TUV-P	FAM-TGTGCTTATCAGGACAACACAGCACA-BHQ1
70-S	AGCGTCGTTTCTGCATCG
70-As	CGCCGATTCACTGCAGAT
70-P	ROX-CTGAGGGTTTCGCATAGCC-BHQ2



А



Б

Выявление типичных и атипичных штаммов средневекового биовара методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на мишени «Med24» (А) и «pCKF» (Б):

Штаммы *Y. pestis*: 1 – Sonche восточный биовар (б/в) (положительный контроль); 2 – 107 средневековый б/в (нет реакции); 3 – C-730 средневековый б/в, атипичный; 4 – KM 919 средневековый б/в, атипичный; 5 – KM 921 средневековый б/в, атипичный; 6 – 210 (301) античный б/в; 7 – Hamburg 15 восточный б/в; 8 – 231(708) античный б/в (положительный контроль); 9 – 99 средневековый б/в (нет реакции); 10 – И-3036 античный б/в; 11 – Kurdistan 290 средневековый б/в (нет реакции); 12 – A-1836 античный б/в; 13 – И-1996 античный б/в; 14 – отрицательный контроль

сокогорного очага. Положительный сигнал гибридизации наблюдался в ПЦР только у штаммов геноварианта 2.MED0 и отсутствовал у штаммов геноварианта 2.MED и других биоваров основного подвида, что свидетельствует о специфичности выбранной мишени для детекции штаммов геноварианта 2.MED0 (рисунков, Б). Использование в ПЦР праймеров и зондов на две ДНК-мишени – «Med24» и «pCKF» обеспечивает выявление всех штаммов средневекового биовара и их дифференциацию от штаммов других биоваров основного подвида.

Для выявления геноварианта 1.ORI восточного биовара нами рассчитаны праймеры и зонд на известную генетическую метку штаммов этого биовара – делецию в 93 п.н. в гене глицерол-3-фосфатдегидрогеназы в позиции 19–111 от начала гена [9]. Праймеры комплементарны последовательностям, фланкирующим делецию, а зонд комплементарен участку самой делеции (табл. 2). В ПЦР у всех 20 использованных штаммов восточного биовара положительный сигнал гибридизации отсутствовал в отличие от штаммов других биоваров и подвидов.

Штаммы *Y. pestis* основного подвида, которые не содержат делеций в мишенях «Med24» и «glpD»

и у которых отсутствует мишень «pCKF», относятся к античному биовару. Для разделения геновариантов штаммов античного биовара нами проведен поиск эффективных ДНК-мишеней на основе сравнительного анализа полногеномных последовательностей штаммов этого биовара, представленных в базе данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLAST. Эффективным для выявления геноварианта 1.ANT оказался участок генома, содержащий у штаммов этого геноварианта филаментозный фаг CUSφ. Рассчитанные нами праймеры и зонд в формате TaqMan комплементарны последовательности этого фага (табл. 2), поэтому у штаммов геноварианта 1.ANT в ПЦР наблюдался положительный флуоресцентно-гибридизационный сигнал. Филаментозный фаг CUSφ также содержится и в геноме всех штаммов восточного биовара 1.ORI, однако геновариант античного биовара 1.ANT отделяется от геноварианта 1.ORI по наличию сигнала в ПЦР по ДНК-мишени «glpD». У штаммов восточного биовара сигнал по мишени «glpD» отсутствует (табл. 1).

Для дифференциации штаммов другого геноварианта античного биовара – 2.ANT выбрана выявленная нами мишень «70», которая представляет участок гена *y1694*, содержащий у штаммов этого геноварианта делецию размером 70 п.н. после 811 н. от начала гена. Рассчитаны праймеры на участки гена *y1694*, фланкирующие делецию, и зонд, комплементарный самому участку делеции (табл. 2). В ПЦР у штаммов геноварианта 2.ANT положительный сигнал гибридизации отсутствует. Делеция размером в 70 п.н. в гене *y1694* присутствует также и у штаммов средневекового биовара геноварианта 2.MED, однако геновариант 2.ANT отделяется от них по наличию положительного сигнала по мишени «Med24». У штаммов геноварианта 2.MED этот сигнал отсутствует (табл. 1).

Для выявления штаммов античного биовара геноварианта 4.ANT, циркулирующих в Тувинском горном очаге и Монголии, использован участок криптической плазмиды размером 34 т.п.н., присутствующий в этих штаммах. В качестве ДНК мишени, обозначенной «TUV», выбран участок плазмиды, расположенный в гене *parA*. Праймеры и зонд рассчитаны на последовательность плазмиды, поэтому в ПЦР положительный гибридационно-флуоресцентный сигнал наблюдался у 10 штаммов геноварианта 4.ANT и отсутствовал у других биоваров и подвидов.

Штаммы античного биовара, которые не дифференцируются с помощью мишеней «cusφ», «70» и «TUV», относятся к геноварианту 0.ANT античного биовара.

Эффективность разработанного нами метода определения геновариантов основного подвида античного, средневекового и восточного подтверждена на 110 штаммах основного подвида античного, средневекового и восточного биоваров (табл. 1).

Таким образом, нами впервые разработан эф-

фективный способ определения геновариантов основного подвида возбудителя чумы в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, использование которого позволяет ускорить процедуру определения внутривидовой принадлежности и региона происхождения штаммов *Y. pestis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Генетические основы вариабельности признака редукции нитратов у штаммов *Yersinia pestis*. *Генетика*. 2014; 50:1–9.
2. Жаринова Н.В., Брюханова Г.Д., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф., Бейер А.П., Царева Н.С., Зайцев А.А. Свойства штаммов чумного микроба, циркулирующих в Центральном-Кавказском высокогорном природном очаге чумы. *Акт. пробл. эпидемиол. и профилактик. бол.* 2004; 2:14.
3. Одинок Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ полногеномной последовательности штаммов *Yersinia pestis* на основе ступенчатого 680-SNP алгоритма. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:49–54.
4. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09.
5. Проценко С.Л., Сердюкова Т.В., Розанова Г.Н. Выявление новой плазмиды у пролинзависимых штаммов возбудителя чумы из Центрально-Кавказского природного очага и гетерогенность циркулирующих в нем штаммов по плазмидному составу. В кн.: Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь; 1987. С. 265–7.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24):14043.
7. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(2):577.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Raumagnac P., Wagner D.V., Feldcamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140.
9. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of struc-

tural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

References

1. Eroshenko G.A., Odnokov G.N., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Kuttyrev V.V. [Genetic foundations of the variability of nitrate reduction in *Yersinia pestis* strains]. *Genetika*. 2014; 50:1–9.
2. Zharinova N.V., Bryukhanova G.D., Eremenko E.I., Bryukhanov A.F., Beyer A.P., Tsareva N.S., Zaitsev A.A. [Properties of the plague agent strains circulating in Central-Caucasian high-mountain natural focus of plague]. *Aktual. Probl. Epidemiol. Profilakt. Infek. Bol.* 2004; 2:14.
3. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Shavina N.Yu., Kuttyrev V.V. [Analysis of the genome wide sequence of *Yersinia pestis* strains based on the consecutive 680-SNP algorithm]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:49–54.
4. [Management of the laboratories using methods of nucleic acids amplification when working with the materials containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity. Methodological Regulations]. MR 1.3.2569-09.
5. Protsenko S.L., Serdyukova T.V., Rozanova G.N. [Detection of new plasmid in proline-dependent plague agent strains found in Central-Caucasian natural focus and heterogeneity in plasmid composition of the circulating in the focus strains]. In: [Particularly dangerous infections in the Caucasus]. Stavropol, 1987; 265–7.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(24):14043.
7. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutational rate in an epidemic pathogen *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(2):577.
8. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Raumagnac P., Wagner D.V., Feldcamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R. Phylogenetic diversity and historical patterns of pandemic spread of *Yersinia pestis*. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140.
9. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

Authors:

Oglodin E.G., Odnokov G.N., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Оглодин Е.Г., Одинок Г.Н., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 09.07.14.

Л.Ф.Стовба, В.Н.Лебедев, А.А.Петров, В.С.Кулиш, С.В.Борисевич

ДИАГНОСТИКА БЛИЖНЕВОСТОЧНОГО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА ЧЕЛОВЕКА

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад, Российская Федерация

Ближневосточный респираторный синдром представляет опасное заболевание человека, вызываемое новым коронавирусом. В декабре 2012 г. ВОЗ опубликовала временные руководящие документы по диагностике этого вируса. ВОЗ рекомендует использовать два способа диагностики этого заболевания – двухэтапную обратнo-транскриптазную ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и иммуноферментный анализ. Первый этап ПЦР-диагностики должен включать ОТ-ПЦР-РВ с мишенью на фрагмент генома выше *upE* гена. Второй (подтверждающий) ПЦР-тест может быть направлен на альтернативные мишени в пределах вирусного генома, не перекрывающиеся с *upE* геном, и последующее секвенирование, по крайней мере, сегмента одного из вирусных генов и сравнение полученной последовательности с таковыми, депонированными в GenBank. Метод ИФА применяется ретроспективно с целью определения наличия вирусоспецифических антител в сыворотках крови реконвалесцентов.

В статье рассмотрены основные характеристики данных методов выявления возбудителя заболевания или специфических антител к нему, и методические рекомендации ВОЗ при диагностике Ближневосточного респираторного синдрома.

Ключевые слова: коронавирус, Ближневосточный респираторный синдром, респираторные инфекции, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, секвенирование генома, филогенетический анализ.

L.F.Stovba, V.N.Lebedev, A.A.Petrov, V.S.Kulish, S.V.Borisevich

Diagnostics of Human Middle-East Respiratory Syndrome

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

Middle-East respiratory syndrome is a human disease caused by a new coronavirus. In December, 2012 WHO published draft regulatory document on diagnostics of the virus. It was recommended to use two methods of disease diagnostics – two-phase reverse-transcription real-time PCR and enzyme immunoassay. The first phase of the PCR-diagnostics should include reverse-transcription real-time PCR targeted on the genome fragment upwards of *upE*. The second (control) PCR-test may be alternatively targeted within the bonds of the genome, its target being non-crisscross with *upE* gene. It should include sequencing of, at least, a segment of one of the viral genomes and comparative analysis of the obtained sequence along with the like ones deposited in the GenBank. Enzyme immunoassay is retrospectively used for virus-specific antibody detection in convalescents' blood sera.

Examined are the key specifications of the methods for the detection of ethiological agent or specific antibodies to it, and WHO methodological recommendations in case of Middle-East respiratory syndrome diagnostics.

Key words: coronavirus, Middle-East respiratory syndrome, respiratory infections, reverse transcription, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay, genome sequencing, phylogenetic analysis.

Ближневосточный респираторный синдром человека (БВРС) – новое инфекционное заболевание, вызываемое коронавирусом, сопровождающееся симптомами острого поражения нижнего отдела респираторного тракта, прогрессирующей пневмонией и нередко почечной недостаточностью. Инкубационный период заболевания составляет около 5 сут [9, 15].

К настоящему времени (по состоянию на 7 февраля 2014 г.) инфекция стала причиной 182 лабораторно подтвержденных случаев в 12 странах, в том числе в 5 странах европейского региона: Германии, Италии, Великобритании, Испании и Франции. Из этих случаев 79 закончились смертельным исходом (летальность составила 43,4 %) [18].

Проведенный ретроспективный эпидемиологический анализ случаев ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) позволил установить, что заболевание носит природно-очаговый характер, эндемичный район которого находится на Аравийском

полуострове [1]. Естественным резервуаром возбудителя в природе являются, скорее всего, насекомоядные летучие мыши, относящиеся к родам *Tylonycteris* и *Pipistrellus* [11, 15]. Групповые случаи заболевания в семьях из Саудовской Аравии, Великобритании и случаи заболевания среди обслуживающего персонала в госпитале в Саудовской Аравии и Иордании позволяют предположить возможность наиболее вероятного пути передачи возбудителя от человека к человеку – респираторного. Однако устойчивой трансмиссии возбудителя не отмечено [9].

Опасность ближневосточного респираторного синдрома усугубляется тем, что в эндемичный для возбудителя заболевания регион ежегодно приезжают миллионы туристов и паломников мусульман практически со всего мира, в том числе и из России. В настоящее время отсутствуют средства специфической профилактики и лечения, хотя, подобно ТОРС, он чувствителен к применению интерферонов I и III

типов [10]. Важно отметить, что выявлять РНК нового коронавируса могут только в лабораториях 23 из 46 стран Европейского региона [13]. Изложенные факторы определяют угрозу возникновения пандемии нового особо опасного респираторного заболевания.

В июне 2012 г. от пациента, 60-летнего гражданина Саудовской Аравии, который позже скончался, был выделен возбудитель этой инфекции, геном которого полностью секвенировали [3, 19]. Геном содержит 30119 нуклеотидов, из которых формируется 10 открытых рамок трансляции. Были выявлены вариации в позиции 11623 (U или G), предполагая, что это может быть либо валин (кодон GUC), либо глицин (кодон GGC). Валиновый кодон может быть избыточным в этой позиции у возбудителя БВРС, хотя он присутствует в большинстве других бетакоронавирусов. В позиции 27162 могут быть либо G, либо A. Эта замена G на A вводит преждевременный stop кодон (UGG на UAG). У данного вируса 5' и 3' части гена N (нуклеопротеин) белка усечены по сравнению с другими бетакоронавирусами. Основные различия в геноме коронавирусов, представляющих одну и ту же монотипичную линию, наблюдаются в пределах открытой рамки трансляции (о.р.т.), расположенной около 3'-конца генома РНК. В целом же геном нового коронавируса очень напоминает геномы остальных коронавирусов, особенно HCoV-NKU4 и HCoV-NKU5. Генетическое разнообразие коронавирусов обеспечивается высокой частотой рекомбинации РНК и способностью больших геномов получать и терять домены [6, 12, 16]. Несмотря на выявленные отличия в геноме этого вируса, нет доказательств, что именно они определяют его высокую вирулентность.

Эксперты ВОЗ на своем заседании от 28 ноября 2012 г. утвердили в качестве обязательных требований использование для диагностики возбудителя БВРС двух методов, из которых ПЦР является обязательным [15].

В качестве первого этапа выявления РНК возбудителя в настоящее время рекомендована постановка обратной транскриптазной ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) с праймерами, фланкирующими участок генома выше E гена [4]. Для подтверждения первичных результатов рекомендуется вторая ОТ-ПЦР-РВ для альтернативной мишени в пределах вирусного генома, а также секвенирование, по крайней мере, одного из вирусных генов и дальнейшего сравнения этой последовательности с последовательностями нового коронавируса (MERS-CoV), депонированными в GenBank.

Эти требования основываются на работе V.M.Corman и соавт. [5], в которой изложены результаты двух ОТ-ПЦР-РВ. Первая реакция в качестве мишени использовала область выше E гена (upE исследование). Для подтверждения этого результата использовалась вторая ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на открытую рамку трансляции 1в (о.р.т. 1в исследование). Последовательности праймеров и зонда указаны

в табл. 1. Последовательности этих праймеров не перекрывались с таковыми, использованными ранее для выявления РНК других коронавирусов. При этом условия проведения обоих ОТ-ПЦР-РВ были одинаковы [7, 8, 17].

Для определения чувствительности использовались разведения вируса от 0,01 до 0,1 ЦПД₅₀ на реакцию. Более детальная оценка чувствительности проводилась с точными количествами *in vitro* транскрибированной РНК, представляющей собой полученные авторами ПЦР-фрагменты, перекрывающие области ампликонов из обоих опытов [5].

В результате исследований установлено, что чувствительность в upE исследовании составляет 3,4 копии РНК на реакцию (95 % доверительный интервал) или 291 копия на мл пробы, а в о.р.т. 1в – значительно ниже (64 копии РНК на реакцию при 95 % доверительном интервале).

Определение специфичности выполнялось с использованием культур таких известных респираторных вирусов как вирусы парагриппа типов 1–4, респираторно-синцитиального вируса, человеческого метапневмовируса, человеческих парехавирусов 1 и 3 типов, вируса гриппа А (H1N1, H3N2), вируса гриппа В, риновируса, энтеровируса, аденовируса и коронавирусов: HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV229E, HCoV-NKU1. Ни в одной из ОТ-ПЦР-РВ положительных результатов не зафиксировано, при этом коронавирус HCoV229E использовался в количестве $3 \cdot 10^9$ РНК копий/мл, HCoV-NL63 – $4 \cdot 10^{10}$, HCoV-OC43 – $3 \cdot 10^{10}$, SARS-CoV – $5 \cdot 10^{10}$. В общем, ни в одной из 92 клинических проб, содержащих респираторные вирусы, не зарегистрировано накопления специфического ампликона, в отличие от положительных контролей. Авторами сделано заключение, что эти результаты могут быть свободно применимы для исследования клинических проб. В обоих опытах получены специфические продукты амплификации, причем upE исследования более чувствительны, чем о.р.т. 1в. Следовательно, авторы этого сообщения считают [5], что, если в клинической лаборатории будут получены положительные результаты в upE исследовании, то для их подтверждения можно использовать о.р.т. 1в исследование, причем авторы обеспечат *in vitro* транскрибированными РНК в качестве положительных контролей upE исследования.

В дальнейшем, учитывая, что первым шагом диагностики должно быть upE исследование, а вторым – ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на другой, не перекрывающийся с E геном фрагмент, эта же группа авторов предложила в качестве мишени для второй подтверждающей реакции использовать о.р.т. 1а [4], что, возможно, было обусловлено низкой чувствительностью о.р.т.1в подтверждающей реакции. Используемые при постановке ОТ-ПЦР-РВ последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Результаты исследования о.р.т. 1а установили, что чувствительность этой реакции составляла 4,1

Специфические компоненты и условия постановки ОТ-ПЦР-РВ для выявления РНК БВРС

Ген-мишень	Компоненты реакции		Условия постановки реакции
	Компонент	Структура компонента	
Область генома выше гена белка Е (upE)	Прямой праймер	GCAACGCGCGATTCACTT	
	Обратный праймер	GCCTCTACACGGGACCCATA	
	Зонд	(6-карбоксифлуоресцеин-[FAM])-CTCTTCACATTATCGCCCGAGCTCG-6-карбокси-N,N,N,N-тетраметилродамин [TAMRA])	
О.Р.Т. 1в	Прямой праймер	TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT	55 °C – 20 мин 95 °C – 3 мин 95 °C – 15 с 58 °C – 30 с } 45 циклов
	Обратный праймер	TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG	
	Зонд	(6-карбоксифлуоресцеин-[FAM])-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-6-карбокси-N,N,N,N-тетраметилродамин [TAMRA])	
О.Р.Т. 1а	Прямой праймер	CCACTACTCCCATTTTCGTCAG	
	Обратный праймер	CAGTATGTGTAGTGCCTFTTAAGCA	
	Зонд	(6-карбоксифлуоресцеин-[FAM])-TTGCAAATTGGCTTGCCCCCACT-6-карбокси-N,N,N,N-тетраметилродамин (TAMRA))	

РНК копии на реакционную пробу, т.е. равнялась таковой для upE исследования. Для подтверждения более высокой чувствительности о.р.т. 1а исследования были поставлены параллельные реакции с бронхоальвеолярными пробами от больного, находившегося в Эссен (Германия). Эти пробы имели очень низкую концентрацию РНК – около 360 копий/мл, что определено в upE исследовании. В о.р.т. 1а исследовании так же были получены положительные результаты, а в о.р.т. 1в – нет. Факт более высокой чувствительности о.р.т. 1а исследования особенно важен при диагностике клинических проб с небольшим количеством вируса, т.е. на очень ранней или очень поздней стадии заболевания.

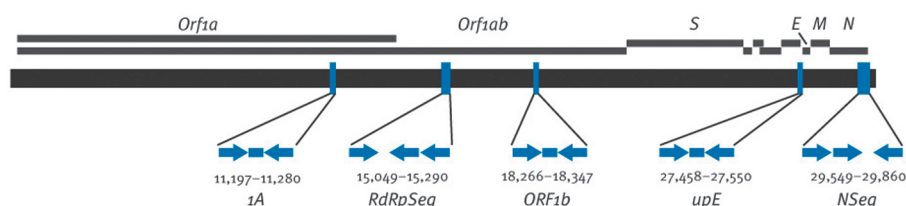
Специфичность реакции оценивалась на 42 клинических пробах параллельно с пробами, содержащими другие коронавирусы: HCoV-OC43 ($1 \cdot 10^8$ РНК копии/мл), HCoV-229E ($3 \cdot 10^9$), HCoV-NL63 ($4 \cdot 10^9$) и TOPC ($5 \cdot 10^{10}$), а также человеческий риновирус, энтеровирус, вирус ЕСНО, человеческий метапневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирус парагриппа 1–4 типов, вирус гриппа 1 и 2 типов, аденовирус. Положительные результаты получены только для MERS-CoV.

Учитывая требования ВОЗ, что помимо постановки двух ОТ-ПЦР-РВ, необходимо секвенировать хотя бы один ген нового коронавируса и сравнить его последовательность с таковой, депонированной в

GenBank, были секвенированы два ампликона, полученные в ОТ-ПЦР. Один из них – это RdRp ген (РНК-зависимая РНК-полимераза), наиболее консервативный ген в геноме HCoV (рисунок) бетакоронавируса линии С – вируса летучих мышей. Однако праймеры для него находятся в высококонсервативной области и перекрестно реагируют с другими коронавирусами, такими как HCoV-OC43, HCoV-NKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E и TOPC. Последовательность этого гена (RdRpSeq) также используется для типирования коронавирусов [2, 17].

Второй ампликон – высокоспецифический фрагмент в пределах N нуклеокапсидного гена (NSeq), выбранный из-за наличия в нем 6 нуклеотидной делеции, которая определена в пробах от пациентов в Лондоне и Эссексе. Хотя еще рано делать какие-то выводы о вирусном разнообразии, связанным с этим отличием. В дальнейшем будет интересно секвенировать и сравнить NSeq фрагмент большого числа вирусов с целью классификации штаммов.

Ампликоны для секвенирования RdRp и N генов получены в ОТ-ПЦР с помощью специфических праймеров. В табл. 2 представлены последовательности праймеров и условия ОТ-ПЦР для амплификации RdRpSeq и NSeq фрагментов. Используемые реактивы те же, что и в предыдущих реакциях. Если в первом раунде реакций не наблюдалось видимых ампликонов, то ставили второй раунд (полугнездо-



Гены-мишени для диагностики нового человеческого коронавируса (MERS-CoV):

Праймеры представлены стрелками. Получаемые ампликоны – линии между праймерами. Цифры ниже ампликонов указывают их позиции на геноме MERS-CoV. *RdRpSeq* – ампликон, полученный полугнездовой ОТ-ПЦР и используемый для секвенирования (мишень RdRp ген). *NSeq* – ампликон для секвенирования, полученный тем же методом (мишень N ген) в работе [5, 6]. *S* – ген, кодирующий вирусные шипики, *E* – ген белка оболочки, *M* – ген мембранного белка, *N* – ген нуклеокапсидного белка, *Orf* – открытая рамка трансляции, *RdRp* – РНК-зависимая РНК-полимераза [19]

Таблица 2

Специфические компоненты ОТ-ПЦР для получения RdRpSeq и NSeq ампликонов [4]

Ген-мишень для секвенирования	Компоненты реакции		Условия постановки реакции
	Компонент	Структура компонента	
RdRpSeq	Прямой праймер	TGCTATWAGTGCTAA GAATAGRGC R=A/G, W=A/T	50 °C – 20 мин 95 °C – 3 мин 95 °C – 15 с 56 °C – 15 с 72 °C – 30 с } 45 циклов
	Обратный праймер	GCATWGCNCWGTAC ACTTAGG W=A/T, N=A/C/T/G	
	Обратный праймер для второго раунда	CACTTAGGRTARTCC CAWCCCA	
NSeq	Прямой праймер	CCTTCGGTACAGTGG AGCCA	То же, что и в первом раунде для RdRpSeq
	Обратный праймер	GATGGGGTTGCCAAA CACAAAC	
	Прямой праймер для второго раунда	TGACCCAAAGAATCC CAATCCCAACTAC	То же, что и во втором раунде для RdRpSeq

вая ПЦР). Последовательность прямого праймера для RdRpSeq фрагмента во втором раунде та же, что и в первом. Последовательность обратного праймера для NSeq фрагмента во второй реакции та же, что и в первой [4].

Результаты секвенирования генов, амплифицированных с праймерами, представленными в табл. 2, подтверждают принадлежность возбудителя БВРС к бетакоронавирусам линии С.

Согласно рекомендациям ВОЗ при диагностике этого вируса необходимо придерживаться двух различных методов. При диагностике опасных и особо опасных заболеваний человека чаще всего используют ПЦР в различных модификациях и ИФА. Последний метод (выявление специфических антител возбудителя) получил наибольшее распространение из иммунохимических методов. С помощью ИФА возможна идентификация вируса, однако по чувствительности он уступает ПЦР. Кроме того, высока вероятность ложноположительных результатов из-за перекрестной реактивности с четырьмя другими патогенными для человека коронавирусами [15]. Поэтому ИФА применяется, в основном, для серологической диагностики, причем антитела к возбудителю БВРС определяются, когда вирус еще есть в организме человека, и наблюдаются симптомы болезни [4]. Этот метод незаменим для определения иммунного статуса на поздней стадии заболевания, когда вирус уже элиминировался из организма, и постановка диагноза перенесенного заболевания возможна только по наличию вирусоспецифических антител.

Таким образом, методы диагностики новой коронавирусной инфекции – БВРС, позволяют выявлять его геномную РНК на всех стадиях инфекции. Согласно рекомендациям ВОЗ, на первом этапе в обязательном порядке применяется ОТ-ПЦР-РВ с праймерами, рассчитанными только для данного вируса, на область генома выше Е гена. Для подтверждения этого результата применяется вторая ОТ-ПЦР-РВ с праймерами на о.р.т. 1а. Эти две реакции опреде-

ляют видовую принадлежность возбудителя БВРС. Обе реакции специфичны и высокочувствительны. Для подтверждения принадлежности БВРС к бетакоронавирусам линии С летучих мышей необходимо секвенировать хотя бы один из консервативных генов и сравнить его последовательность с таковой, депонированной в GenBank. Метод ИФА применяется ретроспективно с целью определения наличия вирусоспецифических антител у реконвалесцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стовба Л.Ф., Лебедев В.Н., Петров А.А., Кулиш В.С., Борисевич С.В. Ближневосточный респираторный синдром – заболевание человека, вызываемое новым коронавирусом. *Воен.-мед. журн.* 2013; 11:76–7.
2. Bermingham A., Heinen P., Iturriza-Gomara M., Gray J., Appleton H., Zambon M.C. Laboratory diagnosis of SARS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004; 359(1447):83–9.
3. Boheemen S., Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gorbaleña A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A.M. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*. 2012; 3(6):pii:e00473-12. (cited 20 Nov 2012). doi:10.1128/mBio.00473-12. Available from: <http://mbio.asm.org/content/3/6/e00473-12.full>.
4. Corman V.M., Müller M.A., Costabel U., Timm J., Binger T., Meyer B., Kreher P., Lattwein E., Eschbach-Bludau M., Nitsche A., Bleicker T., Landt O., Schweiger B., Drexler J.F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Ditter U., Bonin F., Wolff T. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill.* 2012; 17(49):pii=20334. (cited 06 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>.
5. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., Boheemen S., Goral R., Ballhause M., Bestebroer T.M., Muth D., Müller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* 2012; 17(39):pii=20285. (cited 27 Sep 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>.
6. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbaleña A.E., Holmes K.V., Brown C.S., Drosten C., Fouchier R.A., Galiano M. Family *Coronaviridae*. In: *Virus Taxonomy*, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012. P. 806–28.
7. de Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N., Panning M., Drexler J.F., Mulangu S., Sims A.C., Tilton S.C., Menachery V.D., Gralinski L.E., Schafer A., Matzke M.M., Webb-Robertson B.J., Chang J. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2007;

45(3):1049–52.

8. Emery S.L., Erdman D.D., Bowen M.D., Newton B.R., Winchell J.M., Meyer R.F., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(2):311–16.

9. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virology Journal*. 2013; 10:66. (cited 28 Feb 2013). doi:10.1186/1743-422X-10-66. Available from: <http://www.virologyj.com/content/10/1/66>.

10. Kindler E., Jonsdottir H.R., Muth D., Hamming O.J., Hartmann R., Rodriguez R., Geffers R., Fouchier R.A., Drosten C., Müller M.A., Dijkman R., Thiel R. Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *MBio*. 2013; 4(1):e00611-12. (cited 19 Feb 2013). doi:10.1128/mbio.00611-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573664/>.

11. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310:676–9. (cited 29 Sep 2005). doi:10.1126/science.1118391. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/310/5748/676>.

12. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.

13. Palm D., Pereyaslov D., Vaz J., Broberg E., Zeller H., Gross D., Brown C.S. Laboratory capability for molecular detection and confirmation of novel coronavirus in Europe. *Euro Surveill.* 2012; 49(17):pii=20335. (cited 5 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N49/art20335.pdf>

14. Pollak M.P., Pringle C., Madoff L.S., Memish Z.A. Novel coronavirus – Middle East. *J. Infect. Dis.* 2013; 17(2):e143-4. (cited 27 Dec 2012). doi: 10.1016/j.jid.2012.12.001. Available from: <http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712%2812%2901310-0/fulltext>.

15. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus. Stockholm: ECDC; 19 February 2013. (cited 22 Feb 2014). Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/novel-coronavirus-rapid-risk-assessment-update.pdf>.

16. Snijder E.J., Bredenbeek P.J., Dobbe J.C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L.L., Guan Y., Rozanov M., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 2003; 331:991–1004.

17. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2008; 454:3–12.

18. WHO. Global Alert and Response (GAR): Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 07 Feb 2014 (cited 07 Feb 2014). Available from: http://www.who.int/csr/don/2014_02_07mers/en/index.html.

19. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367:1814–20.

References

1. Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Kulish V.S., Borisevich S.V. [Middle-East respiratory syndrome – human diseases caused by a new coronavirus]. *Voen. Med. Zh.* 2013; 11:76–7.
2. Bermingham A., Heinen P., Iturriza-Gomara M., Gray J., Appleton H., Zambon M.C. Laboratory diagnosis of SARS. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004; 359(1447):83–9.
3. Boheemen S., Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gorbaleena A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A.M. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*. 2012; 3(6):pii=e00473-12. (cited 20 Nov 2012). doi:10.1128/mbio.00473-12. Available from: <http://mbio.asm.org/content/3/6/e00473-12.full>.
4. Corman V.M., Müller M.A., Costabel U., Timm J., Binger T., Meyer B., Kreher P., Lattwein E., Eschbach-Bludau M., Nitsche A., Bleicker T., Landt O., Schweiger B., Drexler J.F., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Ditter U., Bonin F., Wolff T. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill.* 2012; 17(49):pii=20334. (cited 06 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>.

5. Corman V.M., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bludau M., Boheemen S., Goral R., Ballhause M., Bestebroer T.M., Muth D., Müller M.A., Drexler J.F., Zambon M., Osterhaus A.D., Fouchier R.M. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill.* 2012; 17(39):pii=20285. (cited 27 Sep 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>.

6. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., Brown C.S., Drosten C., Fouchier R.A., Galiano M. Family *Coronaviridae*. In: *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (Eds.). Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2012. P. 806–28.

7. de Souza Luna L.K., Heiser V., Regamey N., Panning M., Drexler J.F., Mulangu S., Sims A.C., Tilton S.C., Menachery V.D., Gralinski L.E., Schafer A., Matzke M.M., Webb-Robertson B.J., Chang J. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(3):1049–52.

8. Emery S.L., Erdman D.D., Bowen M.D., Newton B.R., Winchell J.M., Meyer R.F., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(2):311–16.

9. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virology Journal*. 2013; 10:66. (cited 28 Feb 2013). doi:10.1186/1743-422X-10-66. Available from: <http://www.virologyj.com/content/10/1/66>.

10. Kindler E., Jonsdottir H.R., Muth D., Hamming O.J., Hartmann R., Rodriguez R., Geffers R., Fouchier R.A., Drosten C., Müller M.A., Dijkman R., Thiel R. Efficient replication of the novel human betacoronavirus EMC on primary human epithelium highlights its zoonotic potential. *MBio*. 2013; 4(1):e00611-12. (cited 19 Feb 2013). doi:10.1128/mbio.00611-12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3573664/>.

11. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310:676–9. (cited 29 Sep 2005). doi:10.1126/science.1118391. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/310/5748/676>.

12. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.

13. Palm D., Pereyaslov D., Vaz J., Broberg E., Zeller H., Gross D., Brown C.S. Laboratory capability for molecular detection and confirmation of novel coronavirus in Europe. *Euro Surveill.* 2012; 49(17):pii=20335. (cited 5 Dec 2012). Available from: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N49/art20335.pdf>

14. Pollak M.P., Pringle C., Madoff L.S., Memish Z.A. Novel coronavirus – Middle East. *J. Infect. Dis.* 2013; 17(2):e143-4. (cited 27 Dec 2012). doi: 10.1016/j.jid.2012.12.001. Available from: <http://www.ijidonline.com/article/S1201-9712%2812%2901310-0/fulltext>.

15. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment. Severe respiratory disease associated with a novel coronavirus. Stockholm: ECDC; 19 February 2013. (cited 22 Feb 2014). Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/novel-coronavirus-rapid-risk-assessment-update.pdf>.

16. Snijder E.J., Bredenbeek P.J., Dobbe J.C., Thiel V., Ziebuhr J., Poon L.L., Guan Y., Rozanov M., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 2003; 331:991–1004.

17. Vijgen L., Moës E., Keyaerts E., Li S., Van Ranst M. A pan-coronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2008; 454:3–12.

18. WHO. Global Alert and Response (GAR): Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 07 Feb 2014 (cited 07 Feb 2014). Available from: http://www.who.int/csr/don/2014_02_07mers/en/index.html.

19. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367:1814–20.

Authors:

Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Kulish V.S., Borisevich S.V. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation.

Об авторах:

Стובה Л.Ф., Лебедев В.Н., Петров А.А., Кулиш В.С., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 16.01.14.

**А.В.Комиссаров, А.К.Никифоров, А.И.Перепелица, С.А.Еремин, О.В.Громова, Ю.Г.Васин, О.А.Волох,
А.В.Гаева, Л.Ф.Ливанова**

АППАРАТНЫЙ МЕТОД ОБЕССОЛИВАНИЯ АНТИГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

Экспериментально доказана возможность применения метода тангенциальной ультрафильтрации для обессоливания антигенных компонентов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной. Определены технологические параметры проведения процесса. Показано, что свойства холерогена-анатоксина, продуцируемого штаммом *Vibrio cholerae* 569В Инаба и О-антигенов, продуцируемых штаммами *V. cholerae* 569В Инаба и М-41 Огава, полученных с использованием разработанных методических приемов, не уступают полученным по традиционной технологии и удовлетворяют требованиям нормативной документации. Обоснованная опытным путем технология обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины позволила снизить время проведения процесса с 3–4 сут до 5–6 ч и проводить его в контролируемых условиях. Аппаратный метод обессоливания внедрен в производственный процесс получения вакцины.

Ключевые слова: тангенциальная ультрафильтрация, вакцина холерная, антигены, обессоливание.

**A.V.Komissarov, A.K.Nikiforov, A.I.Perepelitsa, S.A.Eremin, O.V.Gromova, Yu.G.Vasin, O.A.Volokh,
A.V.Gaeva, L.F.Livanova**

Hardware-Controlled Method of Desalting Antigen Components of Cholera Chemical Vaccine

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

Experimentally substantiated is the possibility to apply tangential ultrafiltration for desalting antigen components of the tableted bivalent chemical cholera vaccine. Specified are the technological parameters of the process. It is demonstrated that the properties of cholera-gene-anatoxin (produced by *Vibrio cholerae* strain 569B Inaba) and O-antigens (produced from *V. cholerae* 569B Inaba and M-41 Ogawa strains) obtained using the designed methodology are as efficient as the ones manufactured using certified procedure and satisfy regulatory requirements. Experimentally substantiated technology for the desalting of antigen components of chemical cholera vaccine provides for the reduction of the time elapsed up to 5-6 hours from the original 3 to 4 days. It also allows for the manufacturing under controlled conditions. This hard-ware controlled method of desalting has been implemented into the vaccine production practice.

Key words: tangential ultrafiltration, cholera vaccine, antigens, desalting.

Наиболее эффективными средствами профилактики и диагностики холеры являются медицинские иммунобиологические препараты [4]. В 2001 г. в России вакцинация против холеры, в соответствии с Приказом Минздрава России от 27.07.2001 № 229, была включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. В настоящее время в Российской Федерации для вакцинации и ревакцинации населения используют вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную производства института «Микроб». Хотя данная вакцина не уступает по эффективности зарубежным аналогам [6, 8] в технологии ее приготовления имеется ряд недостатков, обусловленных тем, что она была разработана более 20 лет назад, одним из которых является диализ О-антигена (О-АГ) и холерогена-анатоксина (ХА) холерного вибриона штамма 569В Инаба и О-АГ холерного вибриона штамма М-41 Огава для их освобождения от сульфата аммония в целлофановых диализных мешочках против водо-

проводной воды, что не исключает вероятность попадания в диализуемые продукты нежелательных примесей, находящихся в воде. Кроме того, данный технологический процесс довольно длительный, его проведение длится от 3 до 4 сут.

Одним из перспективных направлений требующих, на наш взгляд, внедрения в технологию приготовления холерной вакцины является применение метода тангенциальной ультрафильтрации для обессоливания антигенных компонентов холерной вакцины, что и являлось целью данной работы.

Материалы и методы

В работе использовали безмикробные детоксигированные центрифугаты, полученные при производственном выращивании штаммов *V. cholerae* М-41 Огава и 569В Инаба (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб») и осажденные сульфатом аммония. Для обессоливания

О-АГ и ХА применяли установки для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009, снаряженной мембранными модулями с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 30 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 м²; на базе фильтродержателя АСФ-020, снаряженной мембранными модулями с НОММ 30 кДа, с площадью фильтрации равной 0,7 м²; Vivaflow-200 с мембранным модулем 300 кДа, с площадью фильтрации равной 0,02 м².

Серологическую активность О-АГ холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони с О1 сывороткой. Активность ХА устанавливали в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС). Определение ионов аммония и сульфат-ионов проводили в соответствии с методами, изложенными в нормативной документации [5].

Результаты и обсуждение

В настоящее время можно выделить несколько типов фильтрующих элементов для систем тангенциальной фильтрации: плоскорамный (кассетный), рулонный, трубчатый, полволоконный, керамический [1, 7]. Преимуществом плоскорамных фильтрационных элементов является возможность их линейного масштабирования: отработав технологию на лабораторной установке, полученные данные можно использовать для расчета пилотной и промышленной установок [1]. Поэтому именно данный тип фильтрующих элементов был выбран для проведения исследований.

Был апробирован процесс обессоливания диафильтрацией в периодическом режиме. Технологические режимы проведения процесса диафильтрации были выбраны исходя из результатов собственных исследований по концентрированию О-АГ и ХА методом тангенциальной ультрафильтрации [2, 3]: давление на входе и выходе фильтрационной установки – (2,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. Для обессоливания О-АГ были апробированы ультрафильтрационные модули с НОММ 300 кДа с площадью фильтрации 0,02 м², ХА – 30 кДа с площадью фильтрации 0,1 м².

Количество обессоливаемых продуктов насыщенных сульфатом аммония, полученных после центрифугирования, составило: О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава – по 100 граммов; ХА 569В Инаба – 25 граммов.

Центрифугаты выделенных антигенов были растворены, в соответствии с регламентом производства, в дистиллированной воде до величины оптической плотности равной (0,6±0,2) при измерении в кювете с рабочей длиной 20 мм и длиной волны 590 нм. Полученные объемы составили: О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава – по 1,0 дм³; ХА штамма 569В Инаба – 0,01 дм³. Полученные полупродукты подвергали десятикратному разбавлению дистиллированной водой и концентрировали до исходного объема. Количество дистиллированной воды, израс-

Значения параметров, определенных при обессоливании

Наименование продукта	Значения параметров		
	Количество воды, дм ³	Время, ч	Средняя удельная скорость фильтрации, дм ³ /м ² /ч
О-АГ 569В Инаба	16,0	2,5	64
О-АГ М-41 Огава	15,0	3,0	50
ХА 569В Инаба	2,6	2,0	65

ходованной на обессоливание, время проведения технологического процесса, средняя удельная скорость фильтрации представлены в таблице.

Проведенные исследования по оценке показателей качества обессоленных препаратов показали, что они не уступают полученным по регламентной технологии. Так, активность О-АГ 569В Инаба и О-АГ М-41 Огава в РИД с О1 сывороткой составляла 1:32 и 1:125 соответственно, ХА 569В Инаба в РИД с АХС – 1:16. Данные значения были одинаковы для препаратов, полученных как по регламентной, так и по экспериментальной технологиям. Основываясь на полученных значениях средней удельной скорости фильтрации, представленных в таблице, и количестве получаемых продуктов за один производственный цикл произвели расчет площади ультрафильтрационных модулей необходимой для обессоливания антигенов в течение 5–6 ч. Для обессоливания ХА 569В Инаба необходима фильтрующая поверхность до 4 м², О-АГ М-41 Огава – до 5 м², О-АГ 569В Инаба – до 4 м². На рынке оборудования для производства медицинских иммунобиологических препаратов данное оборудование представлено довольно широко (компании Владисарт, Sartorius, Millipore).

Таким образом, на основании полученных данных показана принципиальная возможность обессоливания антигенных компонентов вакцины холерной бивалентной химической таблетированной методом тангенциальной ультрафильтрации и проведено обоснование выбора фильтрационного оборудования в промышленную технологию производства холерной вакцины.

Следующим шагом исследований являлась апробация разработанных методических приемов в условиях производства холерной химической вакцины.

В эксперименте участвовали безмикробные детоксицированные центрифугаты микробных культур *V. cholerae* М-41 Огава (400 дм³) и 569В Инаба (360 дм³), т.е. то количество, которое получается за один производственный цикл выращивания холерных вибрионов. Бездомные центрифугаты концентрировали до 10,0 дм³ и подвергали осаждению сульфатом аммония (О-АГ Инаба до 30 % насыщения, О-АГ Огава – до 50 и ХА Инаба – до 80) с последующим получением осадка центрифугированием. Обессоливание проводили с использованием оборудования технологического участка концентрирования антигенов (рис. 1), включающего в себя установку для фильтрации на базе фильтродержателя АСФ-020, снаряженной 4 ультрафильтрационными моду-

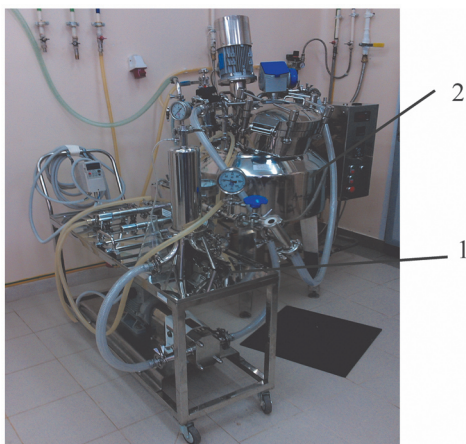


Рис. 1. Оборудование для обессоливания:
1 – фильтрационная установка; 2 – емкость РВД-100

лями с НОММ 30 кДа с общей площадью фильтрации равной 2,8 м², и реактор РВД-100. Антигенные компоненты разводили дистиллированной водой до 10,0 дм³ в реакторе, добавляли воду до общего объема 80 дм³ и концентрировали до исходного объема. При достижении объема 10 дм³ анализировали на содержание ионов аммония и сульфат-ионов. Данную процедуру повторяли до достижения нулевой концентрации ионов. Динамика процесса обессоливания представлена на рис. 2.

Анализируя полученные данные, можно гово-

рить о том, что время обессоливания антигенных компонентов составляет от 2 до 4 ч, что даже меньше, чем было рассчитано при проведении предварительных экспериментов, учитывая, что и площадь фильтрации составляла меньшую величину. Количество дистиллированной воды, затраченной на проведение процесса максимально составляло 300 дм³. Максимальные продолжительность и объем воды определены для обессоливания ХА 569В Инаба, что объясняется большим в сравнении с другими антигенными компонентами количеством сульфатом аммония, затрачиваемом при его осаждении. Представляет интерес тот факт, что удаление сульфат-ионов происходит быстрее, чем ионов аммония. Данное обстоятельство позволяет выбрать тип иономера для контроля процесса обессоливания в режиме реального времени.

По разработанным методическим приемам получено по 3 производственные серии каждого из антигенных компонентов холерной химической вакцины, полностью удовлетворяющих требованиям нормативной документации, что дало основание для внедрения аппаратного метода обессоливания в технологический процесс производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брайт К., Каталевский Е.Е., Савельева С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевтические технологии и упаковка. 2009; 6:47–51.

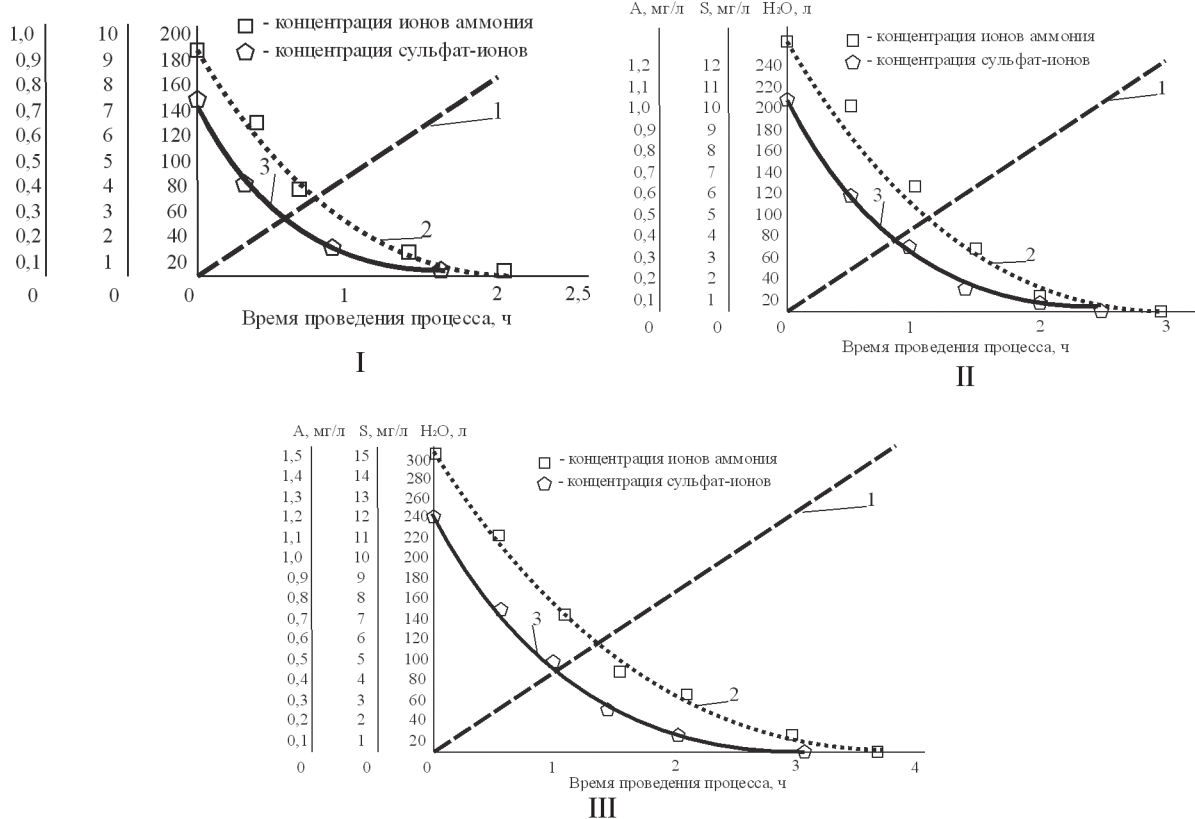


Рис. 2. Динамика процесса обессоливания антигенных компонентов холерной химической вакцины:

A – концентрация ионов аммония; S – концентрация сульфат-ионов; I – данные для О-АГ 569В Инаба; II – данные для О-АГ М-41 Огава; III – данные для ХА 569В Инаба

2. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Громова О.В., Крайнова А.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И., Васин Ю.Г. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):75–7.
3. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):83–6.
4. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области профилактики особо опасных инфекционных бактериальных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 2(92):18–24.
5. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. МУК 4.1/4.2.588-96. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):5–12.
7. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 240 с.
8. Щуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2009; 2:62–7.

References

1. Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'eva S.P. [Cross-flow filtration]. *Farmatsevt. Tekhnol. Upakovka.* 2009; 6:47–51.
2. Komissarov A.V., Eremin S.A., Ul'yanov A.Yu., Aleshina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I. [Development of

the experimental technology for protective antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba concentration by means of tangential ultrafiltration]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):75–7.

3. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I. [Experimental evaluation of application of “cross-flow” ultrafiltration method for O-antigen concentrating in cholera chemical bivalent vaccine production]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):83–6.

4. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 2(92):18–24.

5. [Methods of control of medical immunobiological preparations administered to humans. Methodological Regulations]. MR 4.1/4.2.588-96. M., 1998.

6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):5–12.

7. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and Sorbents in Biotechnology]. L.: Khimiya; 1991. 240 p.

8. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Preventive vaccination against cholera: Current state of affairs]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2009; 2:62–7.

Authors:

Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Perepelitsa A.I., Eremin S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Gaeva A.V., Livanova L.F. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Перепелица А.И., Еремин С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Волох О.А., Гаева А.В., Ливанова Л.Ф. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 27.09.13.

И.И.Корсакова^{1,2}, Н.П.Храпова^{1,2}, Т.В.Замарина¹, Е.В.Пименова¹, Н.С.Макаров², Ю.А.Голосеев¹**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОБЛОТТИНГА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭПИТОПНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА**¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация; ²ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Волгоград, Российская Федерация

Целью работы являлось изучение с помощью иммуноблоттинга эпитопной направленности моноклональных антител к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*, синтезируемых гибридомами-продуцентами из двух коллекций, полученных в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

В работе использовали 8 типичных штаммов возбудителя мелиоидоза с полноценной антигенной структурой. Антигенные препараты разделяли вертикальным электрофорезом в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфата натрия. При тиражировании клеток 12 гибридом-продуцентов получали препаративные количества моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*, на основе которых приготовили иммунопероксидазные конъюгаты. Эпитопную направленность моноклональных антител изучали методом иммуноблоттинга.

В составе антигенных комплексов водно-солевых и формамидных экстрактов *B. pseudomallei* методом вертикального электрофореза установлено наличие нескольких обязательных мажорных компонентов. С помощью дифференциального окрашивания доказана гликопротеиновая природа отдельных компонентов исследованных антигенов. В иммуноблоттинге с применением названных антигенных препаратов определена эпитопная направленность ряда моноклональных антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, показаны отличия в картине их специфического взаимодействия с биополимерами, входящими в антигенный спектр, характерные как для гибридом-продуцентов, принадлежащих к разным коллекциям, так и для отдельных штаммов *B. pseudomallei*.

Ключевые слова: мелиоидоз, *Burkholderia pseudomallei*, антигены, моноклональные антитела, эпитопная направленность, иммуноблоттинг.

I.I.Korsakova^{1,2}, N.P.Khrapova^{1,2}, T.V.Zamarina¹, E.V.Pimenova¹, N.S.Makarov², Yu.A.Goloseev¹**Utilization of Immunoblotting in Studies of Epitope Targeting in Monoclonal Antibodies to Melioidosis Agent Antigen 200 KDa**¹Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation; ²Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Objective of the research was to use immunoblotting for studies of epitope targeting in monoclonal antibodies to 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* antigen, which are synthesized by hybridomas-producers from the two collections in the laboratory of immunodiagnosics and biotechnology at the premises of Volgograd Research Anti-Plague Institute. Employed were 8 typical strains of melioidosis agent with the complete antigenic structure. Antigen preparations were separated by means of denaturing vertical electrophoresis in 12 % polyacrylamide gel with 0.1 % sodium dodecylsulfate. During the process of cell-replication, 12 hybridomas-producers were given preparative amounts of monoclonal antibodies to 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* glycoprotein. Following that, immunoperoxidase conjugates were manufactured. Epitope targeting of monoclonal antibodies was evaluated using immunoblotting. With the help of vertical electrophoresis identified was the presence of several mandatory major components contained in the antigen complexes of the salt-water and formamid *B. pseudomallei* extracts. Differential staining substantiated glycoprotein origin of certain antigen components. Immunoblotting with the stated above antigen preparations revealed epitope targeting of a number of monoclonal antibodies to 200 kDa antigen of melioidosis agent; demonstrated were the differences in their specific interaction with biopolymers which form part of the antigen specter. Those differences were characteristic of hybridomas-producers belonging to different collections, as well as of particular strains of *B. pseudomallei*.

Key words: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, antigens, monoclonal antibodies, epitope targeting, immunoblotting.

Эпитоп является очень небольшим участком на поверхности антигенного комплекса, вступающим во взаимодействие с комплементарным ему активным центром моноклональных антител (МКА) и встречающимся в составе антигена с различной частотой [5, 6]. После электрофореза в денатурирующих условиях эти участки можно выявить в составе отдельных антигенных фракций методом иммуноблоттинга.

МКА нашли широкое применение для дифференциации и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза, изучения свойств и локализации антиге-

нов, входящих в состав микробных клеток, установления внутривидовых различий между отдельными штаммами [1, 4, 7]. Чтобы определить целевое назначение каждого типа МКА, необходимо подробно охарактеризовать их свойства, в том числе эпитопную направленность, отражающую индивидуальные свойства каждого моноклонального иммуноглобулина. Ее изучение важно для последующего создания диагностических тестов на основе МКА, а также для выбора методов очистки антигенов.

Целью работы являлось изучение с помощью

иммуноблоттинга эпитопной направленности МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*, синтезируемых гибридами-продуцентами из двух полученных в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» коллекций.

Материалы и методы

В работе использовали 8 типичных штаммов возбудителя мелиоидоза с полноценной антигенной структурой из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Методики культивирования микроорганизмов, накопления и обеззараживания микробных взвесей, получения водно-солевых (ВСЭ) и формамидных (ФЭ) экстрактов описаны ранее [3]. Клетки 12 гибридом-продуцентов МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei* 100 тиражировали для получения препаративных количеств МКА. Из мышинной асцитической жидкости выделяли моноклональные иммуноглобулины, на их основе готовили иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) по методу [2].

Антигенные препараты разделяли вертикальным электрофорезом в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле с 0,1 % додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) на приборе «Mini-PROTEAN 3» («Bio-Rad Laboratories, inc.», США) [8]. В качестве стандартов молекулярных масс (м.м.) использовали набор маркерных белков 14,4–97 kDa (ООО «Хеликон», Москва). Последующий перенос исследуемых образцов на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм проводили в ячейке прибора «Mini-Trans-Blot» («Bio-Rad Laboratories, inc.», США) в жидкой среде в течение ночи при 4 °C, 90 мА и 30 В [8] в модификации, которая заключалась в использовании в качестве блокирующего реагента 0,03 % раствора твин-20. Детекцию антигенных препаратов проводили с использованием полученных моноклональных ИПК после проверки их на специфичность. Рабочее разведение ИПК составило 1:20. Обработку мембраны иммуноферментным конъюгатом и последующую визуализацию антигенных фракций осуществляли по общепринятой методике с использованием хромогена диаминобензидина (DAB), активированного 0,1 мл 3,5 % H₂O₂ [8]. Электрофореграммы и блоттограммы сканировали на приборе «Epson expression™ 10000 XL» («Epson», Япония). Полученные изображения анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab TL120»® («TotalLab Ltd.») с установлением м.м. биополимерных фракций и их математическим выравниванием.

Результаты и обсуждение

При комбинированной окраске электрофореграмм кумасси синим R-250 и нитратом серебра в диапазоне м.м. 203–17,7 kDa в составе ВСЭ *B. pseudomallei* было выявлено от 16 до 35 антиген-

ных фракций, а в ФЭ – 4–13 компонентов. Следует отметить наличие в составе ВСЭ всех исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза мажорных антигенов с м.м. около 203, 177, 70, 34, 30, 26 и 17,7 kDa. Для ФЭ характерными оказались фракции с м.м. 203, 68, 65 и 58 kDa. В результате использования специфического окрашивания полиакриламидного геля на гликопротеиды и полисахариды алциановым синим и реактивом Шиффа с йодной кислотой показано, что значительная часть изучаемых антигенов является гликопротеинами.

Иммуноблоттинг с ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и различными сериями ФЭ *B. pseudomallei* 100 позволил установить подробную картину специфического взаимодействия биополимеров различных м.м., входящих в их антигенные спектры, с экспериментальными ИПК, а также получить представление об эпитопной плотности и направленности использованных в работе МКА (таблица).

Следует отметить, что эпитопная направленность МКА, принадлежащих к двум полученным в разное время коллекциям, существенно отличается. Так, ИПК 2H₇ и 2A₆ II из первой коллекции способны связываться с антигеном 203 kDa, входящим в состав как ВСЭ, так и ФЭ. Кроме того, эти МКА взаимодействуют с отдельными антигенными компонентами, имеющими м.м. от 44 до 40 kDa. ИПК 2H₇ в силу своей специфичности обнаруживал две фракции, характерные по результатам электрофореза для всех исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза – 203 и 17,7 kDa.

Остальные МКА относятся ко второй коллекции и имеют во многом сходную, но не идентичную эпитопную направленность. Наибольшее количество эпитопов в составе всех использованных в иммуноблоттинге образцов ВСЭ и серий ФЭ выявлено с помощью ИПК 5C₂, который суммарно связался с 14 биополимерами с м.м. в диапазоне от 37 до 18,4 kDa. Эпитопный профиль МКА 6B₇, 6A₁₁ и 3C₆ практически одинаков: он представлен шестью антигенными фракциями в составе всех исследованных ВСЭ и

Сводные данные по эпитопной направленности МКА к антигенам исследованных ВСЭ и ФЭ штаммов *B. pseudomallei*

Наименование МКА	Выявленные эпитопы на биополимерах с м.м. (kDa) в составе:	
	ВСЭ	ФЭ
5C ₂	37, 36, 35, 34, 30, 26, 24, 21, 18,4	37, 33, 22, 18,6
4A ₁₀	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
6F ₉	37, 36, 35, 34, 26, 18,4	33, 22, 18,6
6A ₁₁	37, 36, 35, 34, 26, 21	33, 22, 18,6
6B ₇	37, 36, 35, 34, 26, 21	37, 33, 22, 18,6
6B ₇ I	52, 35, 34, 30	-
6B ₇ II	52, 35, 34, 30	-
6E ₇	37, 36, 35, 34, 26	33, 22, 18,6
7A ₈	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
2H ₇	203, 44, 41, 40, 34, 17,7	203, 17,7
2A ₆ II	203, 40	203

трем – у ФЭ, за исключением входящего в состав 22 серии ФЭ *B. pseudomallei* 100 дополнительного компонента с м.м. 37 kDa для МКА 6В₇ и антигена 18,4 kDa, обнаруженного в ВСЭ штамма *B. pseudomallei* 100 с помощью МКА 3С₆ (рисунок).

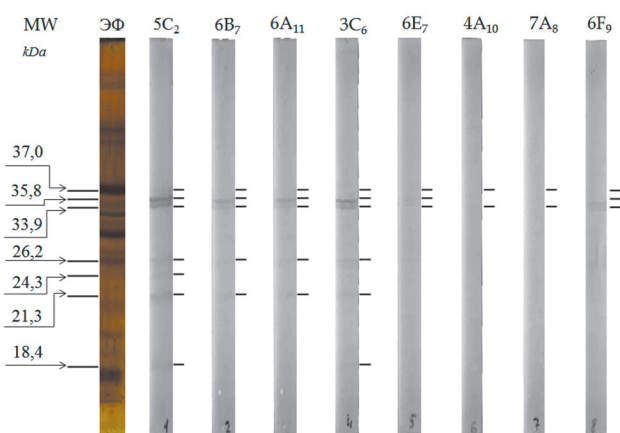
Исследованный ИПК 6Е₇ не взаимодействовал с низкомолекулярными антигенами ВСЭ *B. pseudomallei* 100, которые располагаются в области м.м. 21–18,4 kDa. В остальном этот образец МКА повторяет картину эпитопного взаимодействия ИПК 6В₇, 6А₁₁ и 3С₆ с биополимерами изученных образцов ВСЭ и ФЭ.

ИПК 4А₁₀ и 7А₈ связывались лишь с 4 антигенами в составе ВСЭ штаммов *B. pseudomallei*, а результаты их реакции с эпитопами ФЭ аналогичны большинству МКА из второй коллекции. Специфичность ИПК 6F₉ оказалась такой же, как и у 3С₆, только он не реагировал с антигеном 21 kDa в составе ВСЭ.

Ни одно из изученных МКА не вступило в связь с антигенами 5-й серии ФЭ *B. pseudomallei* 100, что связано, по всей видимости, с ранее выявленным низким содержанием гликопротеинов в его составе.

В целом, картина эпитопного профиля для каждого из исследованных ИПК варьировала в зависимости от штамма *B. pseudomallei*, из которого получали антигенные препараты. Однако у большинства штаммов были обнаружены компоненты с м.м. 35, 34 и 17–18 kDa.

Таким образом, в составе антигенных комплексов ВСЭ и ФЭ *B. pseudomallei* методом вертикального электрофореза в ПААГ-ДСН установлено наличие нескольких обязательных мажорных компонентов. С помощью дифференциального окрашивания доказана гликопротеиновая природа отдельных компонентов исследованных антигенов. Определение эпитопной направленности ряда МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза позволило осуществлять отбор МКА к пространственно разобобщенным детерминантам, не конкурирующих за центры связывания на молекуле антигена, с целью дальнейшего использования их комбинаций для создания иммунодиагностических препаратов.



Блоттограммы взаимодействия антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 100 с панелью исследованных ИПК:

а – м.м. биополимеров на блоттограмме (kDa); б – суммарный антигенный профиль ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 1–8 – блоттограммы соответствующих ИПК

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 112:46–50.
2. Булатова Т.В., Храпова Н.П., Барышева А.Ю. Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза. *Медицинский академический журн.* 2012; Приложение: 307–9.
3. Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М., Ломова Л.В., Дрефс Н.М., Голосеев Ю.А., Булатова Т.В. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхольдери. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 113:82–5.
4. Храпова Н.П., Алексеев В.В., Корсакова И.И., Дрефс Н.М., Ломова Л.В., Булатова Т.В., Напалкова Г.М. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдери. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 107:66–9.
5. Gaseitsiwe S., Valentini D., Mahdaviifar S., Reilly M., Ehrnst A., Maeurer M. Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501 and DRB1*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):168–75.
6. Linnebacher M., Lorenz P., Koy C., Jahnke A., Born N., Steinbeck F., Wollbold J., Latzkow T., Thiesen H.-J., Glocker M. Clonality characterization of natural epitope-specific antibodies against the tumor-related antigen topoisomerase IIa by peptide chip and proteome analysis: a pilot study with colorectal carcinoma patient samples. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2012; 403(1):227–38.
7. Ma G.Q., Shao F., Xie X.M., Cui H.F., Wan H.J. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for reliable detection *Burkholderia pseudomallei* in soil samples. *African J. Microbiol. Res.* 2014; 8(5):452–7.
8. Westermeier R. Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations. 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

References

1. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. [Modern approaches for detection of glanders and melioidosis. Identification and typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 112:46–50.
2. Bulatova T.V., Khrapova N.P., Barysheva A.Yu. [Development of experimental immuno-enzyme monoclonal test-system for 200 kDa antigen detection]. *Meditsinskii Akadem. Zh.* 2012; Appendix: 307–9.
3. Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Drefs N.M., Goloseev Yu.A., Bulatova T.V. [Comparative analysis of immunochemical methods applied for studies of pathogenic *Burkholderia* antigens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 113:82–5.
4. Khrapova N.P., Alekseev V.V., Korsakova I.I., Drefs N.M., Lomova L.V., Bulatova T.V., Napalkova G.M. [Application of glanders and melioidosis monoclonal antibodies of different epitope specificity for pathogenic *Burkholderia* detection and identification]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 107:66–9.
5. Gaseitsiwe S., Valentini D., Mahdaviifar S., Reilly M., Ehrnst A., Maeurer M. Peptide microarray-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501 and DRB1*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):168–75.
6. Linnebacher M., Lorenz P., Koy C., Jahnke A., Born N., Steinbeck F., Wollbold J., Latzkow T., Thiesen H.-J., Glocker M. Clonality characterization of natural epitope-specific antibodies against the tumor-related antigen topoisomerase IIa by peptide chip and proteome analysis: a pilot study with colorectal carcinoma patient samples. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 2012; 403(1):227–38.
7. Ma G.Q., Shao F., Xie X.M., Cui H.F., Wan H.J. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for reliable detection *Burkholderia pseudomallei* in soil samples. *African J. Microbiol. Res.* 2014; 8(5):452–7.
8. Westermeier R. Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations. 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

Authors:

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Zamarina T.V., Pimenova E.V., Goloseev Yu.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru
Korsakova I.I., Khrapova N.P., Makarov N.S. Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation.

Об авторах:

Корсакова И.И., Храпова Н.П., Замарина Т.В., Пименова Е.В., Голосеев Ю.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru
Корсакова И.И., Храпова Н.П., Макаров Н.С. Волгоградский государственный медицинский университет. Волгоград, Российская Федерация.

Поступила 15.04.14.

Л.М.Михайлов, Л.Е.Токарева, Н.Л.Баранникова, С.В.Балахонов

СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА АНТИГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ БРУЦЕЛЛ В S- И L-ФОРМАХ

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

Известно, что бруцеллы в S-форме вызывают аллергическую перестройку макроорганизма, которая проявляется реакцией гиперчувствительности замедленного типа, эта способность у атипичных вариантов (L-формы) изучена недостаточно.

Показано, что корпускулярный антиген из вакцины *B. abortus* 19BA и термоэкстракт из *B. abortus* И-206 в S-форме при трехкратной иммунизации вызывают выраженную сенсибилизацию, а корпускулярный антиген и термоэкстракт, приготовленные из бруцелл в L-формах, и термоэкстракт из бруцелл в S-форме при однократном способе введения не оказывают такого действия на лейкоциты белых мышей.

Ключевые слова: бруцеллы, S- и L-форма, термоэкстракт, сенсибилизация лейкоцитов, коэффициент лейкоцитолитиза.

L.M.Mikhailov, L.E.Tokareva, N.L.Barannikova, S.V.Balakhonov

Sensitizing Properties of Antigen Preparations Obtained from Brucella in S- and L-Forms

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

It is known that S-form Brucella causes allergic transformation in a macroorganism, which is manifested as delayed-type hypersensitivity reaction. This capacity in atypical variants (L-forms) is under-investigated. It is demonstrated that corpuscular antigen in *B. abortus* 19BA vaccine and thermoextract prepared from *B. abortus* I-206 in S-form when threefold administered cause marked sensitization; while corpuscular antigen and thermoextract produced from *Brucella* in L-form, and thermoextract from *Brucella* in S-form in case of one time administration do not have such an effect on leucocytes of white mice.

Key words: *Brucella*, S- and L-forms, thermoextract, leukocyte sensitization, leukocytolysis index.

Сущность аллергических процессов при бруцеллезе изучена недостаточно. Считается, что при бруцеллезе ведущее значение имеет аллергия замедленного типа [3]. Выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) необходимо учитывать при проведении специфической профилактики бруцеллеза и изучении иммуногенов различного типа, путей и дозы введения [2].

В настоящее время в литературе имеются немногочисленные данные о способности бруцелл в L-форме вызывать аллергизацию организма. Исследование персистенции бруцелл в L-форме и развитие реакции ГЗТ на модели морских свинок в течение 15 месяцев наблюдения показало, что она не способствовала нарастанию реакции ГЗТ. При заражении морских свинок бруцеллами в L-форме, полученными *in vitro* и *in vivo*, в дозе 10^6 м.к. выявлены существенные различия в их вирулентности. Бруцеллы в L-форме, полученные *in vivo*, инфицировали 86 % животных с развитием в отдельных случаях генерализованной формы инфекции, а *in vitro* этот показатель снижался до 42 % с развитием только регионарной инфекции, при этом кожная проба Бюрне у животных во всех случаях была отрицательной. Эритроцитарный диагностикум, приготовленный на основе комплекса антигенов, выделенных из стабильных L-культур, использовали для исследования 2000 сывороток крови людей из

неблагополучных по бруцеллезу пунктов некоторых областей Казахстана. В 60 % случаев с использованием L-антигена получен отрицательный результат, сомнительные и положительные результаты составили по 20 %. Из положительно реагирующих сывороток 5 % выявлено с помощью РХ и РА, 15 – РПГА. При этом установлено, что проба Бюрне позволяет выявлять ГЗТ, обусловленную не только S-, но и L-вариантами бруцелл. Изучение влияния бруцелл в L-форме на аллергическую перестройку, учитывая, что они способны длительное время персистировать в организме человека [4] и животных [6], является актуальным.

Целью работы является определение сенсибилизирующих свойств корпускулярных и растворимых антигенных препаратов, приготовленных из бруцелл в S- и L-формах, на лейкоцитах белых мышей.

Материалы и методы

В работе использовали инаktivированные корпускулярные антигены, полученные из вакцины *Brucella abortus* 19 BA и *B. abortus* И-206 в L-форме, водорастворимые препараты (термоэкстракты) из *B. abortus* И-206 в S- и L-формах. В качестве биологических моделей использовали 100 белых мышей массой 18–20 г, которых разделили на 8 опытных и 2 контрольные группы по 10 особей в каждой.

Иммунизацию проводили по двум схемам: корпускулярные препараты в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (1, 2, 3, 4 группы), термоэкстракты (ТЭ) – 0,1 мкг в 0,5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида (5, 6, 7, 8 группы) вводили внутривенно однократно и трехкратно с интервалом в 7 сут между инъекциями. Контрольным животным вводили только 0,9 % раствор натрия хлорида по той же схеме (9, 10 группа). Животных гуманным способом выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 2003 г., Приложением к приказу МЗ СССР № 775 от 12.08.1977 г. Забор материала (селезенку) для получения лейкоцитов проводили через семь дней после последней иммунизации. Сенсибилизирующие свойства препаратов изучали в реакции лейкоцитолита [5]. Коэффициент лейкоцитолита (КЛ) вычисляли по формуле:

$$КЛ = \frac{МК - МО}{МК} \cdot 100 ,$$

где КЛ – коэффициент лейкоцитолита, МК – количество лимфоцитов в контрольной лунке, МО – количество лимфоцитов в опытной лунке. Полученные результаты оценивали: КЛ до 15 – результат отрицательный или сомнительный, от 16 до 20 – слабopоложительный, от 21 до 30 – положительный, КЛ > 30 – резкоположительный. Ошибку репрезентативности при статистической обработке результатов определяли по И.П.Ашмарину и соавт. [1]:

$$m = \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}} ,$$

где m – ошибка репрезентативности; p – соответствующая величина (в %); q – 100- p ; n – численность выборки.

Результаты и обсуждение

Результаты, полученные в ходе эксперимента и вычисления КЛ, представлены на рисунке.

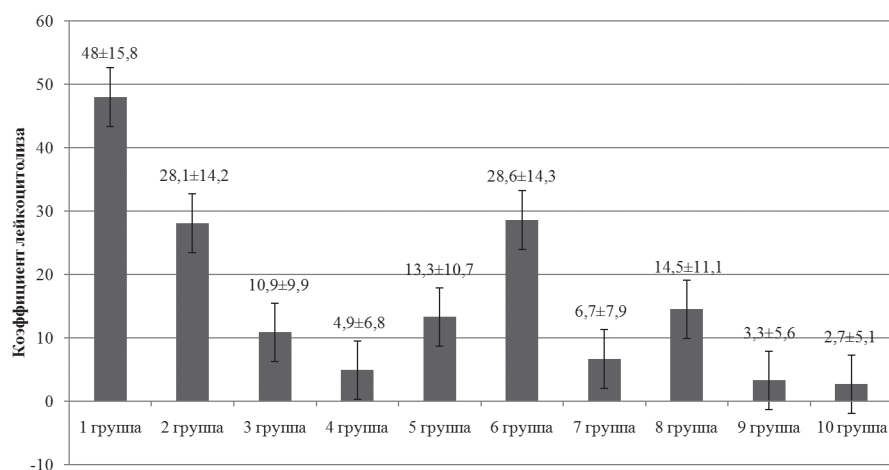
При однократном введении инактивированной корпускулярной вакцины *B. abortus* 19 ВА первой группе экспериментальных животных среднее зна-

чение КЛ составило $48,0 \pm 15,8$, реакция оценена как резкоположительная. Во второй группе при трехкратной иммунизации этим препаратом КЛ оставался положительным ($28,1 \pm 14,2$), однако отмечалось его снижение в 1,7 раза по сравнению с первой группой. Корпускулярный препарат из *B. abortus* И-206 в L-форме не вызывает сенсибилизации лимфоцитов белых мышей, которая выражается низкими показателями КЛ при однократном (3-я группа) – $10,9 \pm 9,9$, при трехкратном введении антигена (4-я группа) – $4,9 \pm 6,8$, но несколько превышающими таковые у интактных (контрольных) животных – $3,3 \pm 5,6$ (9-я группа) и $2,7 \pm 5,1$ (10-я группа) соответственно и оцениваемыми как отрицательные.

При однократной или трехкратной иммунизации термоэкстрактом, приготовленным из *B. abortus* И-206 в S-форме, сенсибилизация лейкоцитов, выраженная определением КЛ, составила $13,3 \pm 10,7$ (5-я группа), $28,6 \pm 14,3$ (6-я группа) соответственно с оценкой результата как отрицательный и положительный. При иммунизации ТЭ из бруцелл этого же штамма в L-форме КЛ определялся $6,7 \pm 7,9$ (7-я группа) – $14,5 \pm 11,1$ (8-я группа) и оценивался как отрицательный или сомнительный.

Из полученных результатов следует, что инактивированный корпускулярный антиген, приготовленный из вакцины *B. abortus* 19 ВА (1, 2 группы), и ТЭ бруцелл в S-форме (6 группа) вызывают выраженную сенсибилизацию лейкоцитов селезенки белых мышей, о чем свидетельствует уровень КЛ, оцениваемый как положительный и резко положительный. Однократное применение ТЭ (5-я группа) приводит к слабой сенсибилизации и сомнительному результату КЛ. Корпускулярный антиген и ТЭ из бруцелл в L-форме при обеих схемах иммунизации (однократная или трехкратная) в целом не вызывает существенной аллергической перестройки у белых мышей (3, 4, 7, 8 группы), о чем свидетельствует низкий уровень КЛ в пределах $6,7 \pm 7,9$ – $14,5 \pm 11,1$, что оценивается как отрицательный или сомнительный результат.

Таким образом, корпускулярный антиген и термоэкстракт, приготовленные из бруцелл в L-форме,



Коэффициент лейкоцитолита при иммунизации антигенными препаратами, приготовленными из бруцелл в S- и L-формах:

1-я группа – однократная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* 19 ВА; 2-я группа – трехкратная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* 19 ВА; 3-я группа – однократная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* И-206 в L-форме; 4-я группа – трехкратная иммунизация корпускулярным антигеном *B. abortus* И-206 в L-форме; 5-я группа – однократная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в S-форме; 6-я группа – трехкратная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в S-форме; 7-я группа – однократная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в L-форме; 8-я группа – трехкратная иммунизация ТЭ из *B. abortus* И-206 в L-форме; 9-я группа – однократное введение физиологического раствора (контроль); 10-я группа – трехкратное введение физиологического раствора (контроль)

термоэкстракт из бруцелл в S-форме при однократном введении не оказывают сенсibilизирующего действия на лейкоциты селезенки белых мышей, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения их влияния на организм экспериментальных животных с целью подбора антигенов, обладающих слабым алергизирующим действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Бронников В.С. Сенсibilизирующая активность противобруцеллезных химических вакцин. В кн.: Актуальные проблемы бруцеллеза и туберкулеза животных. Омск; 2000. С. 164–7.
3. Вершилова П.А. Бруцеллез. М.: Медицина; 1972. 439 с.
4. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Борисов В.А., Ходус Ф.И., Гордиенко Л.Н., Ощепков В.Г. Персистенция L-форм бруцелл у человека с хронической формой бруцеллеза. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009; 5:114–5.
5. Таран И.Ф., Цыбин Б.П., Крылова А.А., Аболина Т.А. Изучение L-форм бруцелл, их ревертантов и исходных культур. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1981; 6:39–43.
6. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Л.: Колос; 1976. 279 с.

References

1. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgis; 1962. 180 p.
2. Bronnikov V.S. [Sensibilizing activity of anti-*Brucella* chemical vaccines]. In: [Actual problems of animal brucellosis and tuberculosis]. Omsk; 2000. P. 164–7.
3. Vershilova P.A. [Brucellosis]. M.: Medicine; 1972. 439 p.
4. Mikhailov L.M., Kalinovskiy A.I., Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Borisov V.A., Khodus F.I., Gordienko L.N., Oshchepkov V.G. [Persistence of *Brucella* L-forms in a person with the chronic brucellosis]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol. Immunobiol.* 2009; 5:114–5.
5. Taran I.F., Tsybin B.P., Krylova A.A., Abolina T.A. [Studying of a role of *Brucella* L-forms, its revertants and stock cultures]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1981; 6:39–43.
6. Trilenko P.A. [Brucellosis in agricultural animals]. L.: Kolos; 1976. 279 p.

Authors:

Mikhailov L.M., Tokareva L.E., Barannikova N.L., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Михайлов Л.М., Токарева Л.Е., Баранникова Н.Л., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 22.05.14.

М.В.Овчинникова, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров

СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА И ЕГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МОДИФИКАНТА В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА *IN VITRO**ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Проведено сравнительное изучение сорбционных свойств полимерного энтеросорбента хитозана и его специфического модификанта, полученного методом адсорбции антитоксических иммуноглобулинов на растворимой хитозановой матрице. Установлено, что растворимая форма хитозана и его специфический модификант проявляли высокую адсорбционную активность в отношении холерного токсина, снижая его исходную концентрацию. Равновесная емкость хитозана и его модификанта возрастала с увеличением исходных концентраций холерного токсина в растворе. В статических условиях изучали степень извлечения холерного токсина из раствора. В динамике фиксировали скорость извлечения адсорбата из раствора. В ходе проведенных экспериментов доказана эффективность специфической сорбции модифицированного сорбента, обусловленная наличием в его структуре активного компонента – антитоксических противохолерных иммуноглобулинов. Полученные данные представляют интерес в плане дальнейшей разработки специфического противохолерного энтеросорбента.

Ключевые слова: энтеросорбенты, природные полисахариды, хитозан, холерный токсин, специфическая сорбция, модельные растворы.

M.V.Ovchinnikova, M.N.Kireev, A.K.Nikiforov

Sorption Properties of Polymeric Enterosorbent and Its Specific Modified Analogue in Simulated Cholera Toxin Solutions *in vitro**Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Carried out was comparative study of the sorption properties in polymeric enterosorbent – chitosan, and its specific modified analogue obtained through absorption of anti-toxin immunoglobulins onto the soluble chitosan template. It is determined that soluble chitosan and its specific counterpart express high sorption activity in relation to cholera toxin, thus making lower its initial concentrations. Equilibrium adsorption capacity of the chitosan and its modified variant increase with the raise of initial cholera toxin concentration in the solution. Cholera toxin extraction rate was identified under static conditions. Adsorbate substance recovery rate was registered in the progression. In the course of experiments proved was modified sorbent specific sorption efficiency, occasioned by the presence of the active component in the analogue composition – namely, anti-toxic anticholeraic immunoglobulins. The data obtained are of the importance for further development of specific anticholeraic enterosorbent.

Key words: enterosorbents, natural polysaccharides, chitosan, cholera toxin, specific sorption, simulated test solutions.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) являются одной из важных проблем в мировом и отечественном здравоохранении. С одной стороны, уровень заболеваемости остается достаточно высоким, без тенденции к отчетливому снижению, с другой – отмечается появление сероваров, обуславливающих тяжелое течение болезни: *S. flexneri* 2a, энтерогеморагическая эшерихия O157, а также нетипичные штаммы *V. cholerae* O1 [9, 6]. Такие штаммы обладают высоким пандемическим потенциалом, что обеспечивается высокой адаптацией к условиям внешней среды и повышенной вирулентностью, которая выражается в более тяжелом течении заболевания с высоким показателем летальности [6].

В настоящее время в лечении ОКИ появились новые подходы – основной акцент делается на патогенетическую терапию, целью которой является дезинтоксикация, коррекция водно-электролитных изменений, нормализация моторно-секреторных функций желудочно-кишечного тракта, восстановление кишечной микрофлоры, усиление репаративных процессов в слизистой толстой кишки, энтеросорб-

ция. При инфекционных заболеваниях энтеросорбция является не только патогенетическим способом терапии, но и этиотропным, поскольку сорбенты способны поглощать как эндо- и экзотоксины возбудителей, так и фиксировать на своей поверхности бактериальные клетки и вирусы, выключая их таким образом из патологического процесса [4].

При всем многообразии энтеросорбентов несомненный интерес представляют препараты на основе природных молекул и их производных. Наиболее перспективную группу веществ составляют некрахмальные полисахариды, к которым относятся альгинаты и фукоиданы морских бурых водорослей, каррагенаны красных водорослей, пектины морских и наземных трав, хитин, его производное хитозан.

Хитозан – сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина, имеющий уникальную поликатионную фибриллярную структуру [2]. Наличие в структуре этого полисахарида многочисленных реакционно-способных OH- и NH₂-групп создает возможность проведения разнообразной модификации и осуществления строго направленного синтеза

производных этого полимера. Дополнительно протонированная аминогруппа в молекуле хитозана является высокоактивной, что определяет его свойства связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, обуславливая тем самым хелато- и комплексообразующие свойства хитозана. Обилие водородных связей способствует связыванию полисахаридом большого количества органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальных токсинов и токсинов, образующихся в толстом кишечнике в процессе пищеварения. Хитозан обладает низким раздражающим действием на слизистую оболочку кишки, мукоадгезивен, высоко биосовместим, существенно повышает биодоступность труднорастворимых веществ в крови, биodeградирует [1]. При этом хитозан имеет ряд преимуществ перед другими энтеросорбентами (например, активированным углем и каолином), не вызывая побочных эффектов при применении, таких как сорбция из организма важных питательных веществ и развитие констипационного синдрома [7].

Несмотря на опыт применения хитозана в качестве энтеросорбционного средства при лечении различных заболеваний [2, 7], вопрос его эффективности в специфической сорбции токсинов бактериальной природы остается не изученным. На современном этапе особое внимание уделяется созданию энтеросорбентов, избирательно поглощающих из организма токсические вещества белкового происхождения, накапливающиеся в результате развития различных патологических (аутоиммунных, инфекционных и др.) процессов. Применение таких препаратов позволит решить задачу целенаправленной нейтрализации токсических продуктов с последующей их элиминацией из организма.

Целью данной работы является сравнительное изучение сорбционной активности природного полисахарида хитозана и его специфического модификанта в отношении энтеротоксина холерного вибриона в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Для проведения экспериментов использовали хитозан (1,4-β-D-глюкан) (ЗАО «Биопрогресс», Россия): молекулярная масса 200 кДа, размер частиц от 1 до 150 мкм, сорбирующая поверхность 100–250 м² на 1 г.

Ограничения по применению хитозана связаны с его низкой растворимостью при нейтральных и слабощелочных значениях pH. Учитывая этот факт, получали растворимую форму хитозана методом осадительной коацервации. Для этого навеску полисахарида растворяли в 2,5 % растворе лимонной кислоты с последующим осаждением 10 % раствором сульфата натрия. Полученную взвесь осаждали центрифугированием. При этом образовывался гелеобразный осадок, содержащий микрочастицы хитозана размером 200–300 нм.

В качестве специфического лиганда использовали антитоксические иммуноглобулины, выделенные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных холерным токсином. Специфическая активность взятых в эксперимент иммуноглобулинов составила в твердофазном иммуноферментном анализе и dot-иммуноанализе 1:2000, в реакции иммунодиффузии – 1:64.

Специфический модификант хитозана получали методом адсорбции активного лиганда на растворимой форме сорбента. Для этого расчетное количество иммуноглобулинов соединяли с навеской энтеросорбента и оставляли на 3–5 ч при постоянном перемешивании. Затем твердую фазу отделяли центрифугированием. Контроль эффективности процесса адсорбции осуществляли измерением остаточного белка в супернатанте.

Сорбционные свойства образцов энтеросорбентов изучали в статическом и динамическом режимах *in vitro*. В эксперименте использовали модельные растворы холерного токсина в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл.

В химическую посуду с растворами холерного токсина в указанных концентрациях добавляли по 10 мг исследуемых сорбентов. Экспозиция статического режима составила 24 ч, в динамическом режиме образцы отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 6 ч. Концентрацию не связавшегося холерного токсина определяли спектрофотометрически на двух длинах волн (260 и 280 нм).

Для отражения эффективности процесса сорбции определяли: количество холерного токсина в фазе сорбента $A = C_0 - C_p$, где C_0 – начальная концентрация токсина в растворе, мкг/мл, C_p – равновесная концентрация токсина, мкг/мл; равновесную емкость сорбентов $A_{\max} = (C_0 - C_p) \cdot V/m$, где m – навеска сорбента, г; V – объем раствора токсина, л; степень извлечения белка из раствора $L = (C_0 - C_p)/C_0 \cdot 100 \%$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что энтеросорбент хитозан и его специфический модификант в статических условиях проявляли высокую адсорбционную активность по отношению к холерному токсину в модельных растворах, которая выражалась в снижении исходных концентраций адсорбата в 28,7–68,6 и 50,8–90,3 раз соответственно, в зависимости от его концентрации в реакционной смеси.

С увеличением исходных концентраций холерного токсина в растворе возрастала равновесная емкость хитозана и его модификанта. Степень извлечения белка была максимальной при высоких исходных концентрациях холерного токсина (100 мкг/мл), причем у специфического модификанта данный показатель превышал на 25 % аналогичный параметр хитозана, что свидетельствует о более высоких сорбционных свойствах специфического образца (табл. 1).

Таблица 1

Адсорбционная активность хитозана и его специфического модификанта в модельных растворах холерного токсина

Сорбент	Концентрация токсина, мкг/мл			Равновесная емкость, (A_{max})	Степень извлечения токсина из раствора (L)
	Исходная (C_0)	В фазе раствора (C_p)	В фазе сорбента (A)		
Хитозан	10	7,13±1,5	2,87±1,1	1,09±0,9	28,7
	20	11,15±1,7	10,85±1,2	5,42±1,2	44,2
	30	12,50±1,0	17,50±1,2	8,75±1,6	58,3
	40	17,46±1,5	22,54±1,5	11,27±1,5	56,3
	50	15,91±1,5	34,09±1,0	17,04±1,6	68,1
	60	20,53±1,0	39,47±1,2	19,73±1,3	65,7
	70	21,90±1,2	48,10±1,2	24,05±1,0	68,7
	80	25,20±0,9	54,80±1,5	27,40±1,4	68,5
	90	33,27±1,5	56,73±1,7	28,36±1,5	63,0
	100	31,40±1,5	68,60±1,5	34,30±1,5	68,6
Специфический модификант	10	4,92±1,3	5,84±1,4	2,90±1,6	50,8
	20	5,45±1,0	14,66±1,2	7,30±1,6	72,7
	30	6,21±1,2	23,81±1,2	11,90±1,0	79,3
	40	5,72±1,0	34,34±1,5	17,10±1,2	85,7
	50	6,84±1,5	43,24±1,4	21,60±1,3	86,3
	60	7,25±1,7	52,86±1,4	26,23±0,8	87,9
	70	7,53±1,7	62,52±1,8	31,26±1,5	89,2
	80	8,61±1,6	71,42±1,7	34,71±1,2	89,2
	90	9,01±1,5	80,99±1,5	40,49±1,2	89,9
	100	9,70±1,5	90,30±0,8	45,15±1,5	90,3

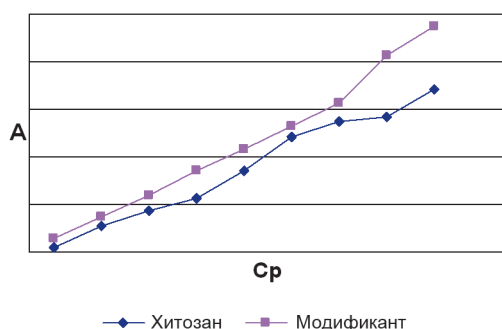
Изотермы адсорбции холерного токсина на исследуемых образцах энтеросорбентов имели S-образный вид с точками перегиба в области средних концентраций белкового адсорбата – 30 мкг/мл для хитозана и 60 – для модификанта (рисунок). Изотермы такого типа описывают полимолекулярную адсорбцию. Для набухающих полимерных сорбентов, таких как хитозан, адсорбция происходит за счет образования водородных связей и электростатических взаимодействий. При относительно малых концентрациях адсорбата происходит образование водородных связей с первичными адсорбционными центрами хитозана, его полярными amino- и гидроксильными группами, затем на менее доступных внутренних участках, причем мономолекулярный слой может быть образован не полностью. Далее каждая адсорбированная молекула сама становится центром адсорбции. При увеличении концентраций адсорбата происходит рост образовавшихся на первичных адсорбционных центрах активных кластеров, и величина адсорбции

возрастает, что на графике отражается небольшим изгибом [3].

При модификации хитозана происходит включение в активные центры сорбента молекул иммуноглобулина. Известно, что связывание антигенов происходит в щели активного центра, образованной переменными доменами в N-концевой части легкой и тяжелой цепей Fab-фрагментов. Частично контактируют с антигеном гипервариабельные участки H- и L-цепей, расположенные в местах изгибов полипептидной цепи, а также некоторые из аминокислотных остатков более глубоких внутренних областей цепи. Введение в структуру сорбента таких антигенсвязывающих центров, по нашему мнению, и приводит к специфической сорбции, которая выражается в увеличении количества извлеченного токсина из раствора. Наряду с величинами сорбции, для практических целей большое значение имеет скорость извлечения адсорбата из раствора. В связи с этим в следующей серии экспериментов исследовали динамику изменения концентрации холерного токсина в реакционной смеси при контакте с хитозаном и его специфическим модификантом.

Полученные результаты (табл. 2) свидетельствовали о том, что специфический модификант хитозана проявлял высокую скорость извлечения холерного токсина из раствора, достигая максимальной концентрации холерного токсина в фазе сорбента уже через 3 ч от начала эксперимента. Процесс сорбции холерного токсина немодифицированным хитозаном завершался через 6 ч экспозиции.

Изучение процесса сорбции-десорбции в реакционных смесях показало, что концентрация холерного токсина в фазе сорбента держалась на макси-



Изотермы сорбции холерного токсина из раствора энтеросорбентом хитозаном и его специфическим модификантом

Таблица 2

Динамика изменения концентрации холерного токсина в растворе в условиях сорбции

Энтеросорбент	Контроль концентрации, мкг/мл	Концентрация холерного токсина в фазе сорбента, мкг/мл					
		Время сорбции, ч					
		1	2	3	4	5	6
Хитозан	100	25,20	31,30	42,0	48,60	56,65	69,60
Специфический модификант	100	76,40	89,50	90,0	89,0	89,5	90,0

мальном уровне и не снижалась спустя 72 ч (срок наблюдения) от начала взаимодействия сорбента с раствором холерного токсина. Это характерно как для исходного хитозана, так и для его специфического модификанта, и свидетельствует о необратимости процесса сорбции в обоих случаях.

Таким образом, сравнительное изучение сорбционной активности (равновесная емкость, степень и скорость извлечения токсина из раствора) природного полисахарида хитозана и его специфического модификанта к холерному токсину показало количественное и временное превосходство специфического модификанта над исходным препаратом. Доказана эффективность специфической сорбции модифицированного сорбента, обусловленная наличием в его структуре активного компонента – антитоксических противохолерных иммуноглобулинов.

Полученные данные *in vitro* представляют научный интерес в плане дальнейшей работы по конструированию специфического противохолерного энтеросорбента на основе хитозановой матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Большаков И.Н. Хитозановая энтеросорбция при остром уремиическом синдроме. *Современные наукоемкие технол.* 2004; 3:43–6.
2. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н. Препараты на основе хитина и хитозана в медицине и рациональном питании. *Мед. иммунол.* 2001; 2:316–17.

3. Зимон А.Д., Лешинко А.Ф. Коллоидная химия. М.: Агар; 2001. 317 с.
4. Мазанкова Л.Н., Павлова А.А. Совершенствование патогенетической терапии острых кишечных инфекций у детей. *Детские инф.* 2006; 4:67–9.
5. Николаев В.Г., Михаловский С.В., Николаева В.В., Олещук А.М., Лисничук Н.Е. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее. *Вестник пробл. биол. и мед.* 2007; 4:7–17.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):5–13.
7. Скрыбин К.Г., Вихорева Г.А., Варламов В.П., редакторы. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение. М.: Наука; 2002. 368 с.
8. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В. Применение энтеросорбентов в медицине. *Тихоокеанский мед. журн.* 1999; 2:84–9.
9. Юшук Н.Д., Еремущкина Я.М. Основные принципы лечения острых кишечных инфекций. *Мед. помощь.* 2005; 1:16–19.

References

1. Bol'shakov I.N. [Chitosan enterosorption in case of acute uremic syndrome]. *Sovremennye Naukoemkie Tekhnologii.* 2004; 3:43–6.
2. Zhogolev K.D., Nikitin V.Yu., Tsygan V.N. [Chitin- and chitosan-based preparations in medicine and rational nutrition]. *Med. Immunol.* 2001; 2:316–7.
3. Zimon A.D., Leshchinko A.F. [Colloid Chemistry]. М.: Агар, 2001. 317 p.
4. Mazankova L.N., Pavlova A.A. [Development of nosotropic therapy for treatment of acute enteric infections in children]. *Detskie Infektsii.* 2006; 4:67–9.
5. Nikolaev V.G., Mikhailovsky S.V., Nikolaeva V.V., Oleshchuk A.M., Lisnichuk N.E. [Enterosorption: current state of the issue and future prospects]. *Vestnik Probl. Biol. i Meditsiny.* 2007; 4:7–17.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):5–13.
7. Skryabin K.G., Vikhoreva G.A., Varlamov V.P., editors [Chitin and Chitosan: Manufacturing, properties and application]. М.: Наука; 2002. 368 p.
8. Khotimchenko Yu.S., Kropotov A.V. [Application of enterosorbents in medicine]. *Tikhookeansky Med. Zh.* 1999; 2:84–9.
9. Yushchuk N.D., Eremushkina Ya.M. [Basic principles of acute enteric infection management]. *Med. Pomoshch'.* 2005; 1:16–19.

Authors:

Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.11.14.

УДК 616.98:579.842.23

Г.В.Демидова, В.П.Зюзина, Е.П.Соколова, Н.И.Пасюкова, И.А.Беспалова, Т.Н.Бородина,
В.И.Тынянова

ТОКСИЧНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *YERSINIA PESTIS* ДЛЯ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ D-ГАЛАКТОЗАМИНОМ

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

Определена токсичность высокотемпературных ЛПС37 и комплексов ЛПС с мышинным токсином (ЛПС37-МТ) вакцинного и вирулентного штаммов *Yersinia pestis* для белых мышей, сенсibilизированных D-галактозамином (D-GalN). LD₅₀ ЛПС37 и ЛПС37-МТ *Y. pestis* 231 для интактных мышей составляла соответственно 310÷500 и 110÷250 мкг/мышь. ЛПС37 *Y. pestis* EV76 нетоксичен для биопробных животных в дозе 3 мг. В то же время ЛПС37-МТ токсически активен и его LD₅₀ равна 520÷610 мкг/мышь. На фоне D-GalN чувствительность животных к действию указанных форм ЛПС вакцинного штамма повышалась на два порядка, а для ЛПС вирулентного штамма – на три. При этом различия токсических свойств между исходными (ЛПС37) и конформационно измененными (ЛПС37-МТ) формами ЛПС обоих исследованных штаммов *Y. pestis* полностью нивелируются.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, эндотоксиновая толерантность, липополисахарид (ЛПС), комплекс ЛПС с мышинным токсином (МТ), D-галактозамином (D-GalN).

G.V.Demidova, V.P.Zyuzina, E.P.Sokolova, N.I.Pasyukova, I.A.Bespalova, T.N.Borodina, V.I.Tynyanova

Toxicity of Various Forms of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharides to D-Galactosamine Sensitized White Mice

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

Determined has been toxicity to D-galactosamine (D-GalN) sensitized white mice of high-temperature LPS37 and LPS complexes with murine toxin (LPS37-MT) contained in vaccine and virulent *Yersinia pestis* strains. *Y. pestis* 231 LPS37 and LPS37-MT LD₅₀ for intact mice is 310÷500 and 110÷250 mcg/mouse, respectively. *Y. pestis* EV76 LPS37 is non-toxic for experimental animals if administered in a dose of 3 mcg. While *Y. pestis* EV76 LPS37-MT is toxically active and its LD₅₀ equals 520÷610 mcg/mouse. Sensitivity of the animals to the stated above LPS forms' effect when affected by D-GalN is by two orders greater, and as for LPS of the virulent strain is by three orders. Concurrently, differences in toxicity properties in the original (LPS37) and conformationally altered (LPS37-MT) LPS-forms in both of the tested *Y. pestis* strains drop out of the equation completely.

Key words: *Yersinia pestis*, endotoxin resistance, lipopolysaccharide (LPS), LPS-complex with murine toxin (MT), D-galactosamine (D-GalN).

В настоящее время известно, что токсические свойства бактериальных липополисахаридов (ЛПС) можно усиливать в условиях *in vivo* посредством снижения порога чувствительности макроорганизма к действию ЛПС. С этой целью обычно используют вещества, обладающие иммуносупрессивным действием. Иной способ, широко применяемый в лабораторной практике, заключается в обработке животных аминокислотой D-галактозамином (D-GalN). Сенсibilизация животных этим веществом увеличивает токсичность бактериальных ЛПС в сотни и тысячи раз [5]. Возможность применения D-GalN для повышения токсичности ЛПС чумного микроба на модели белых мышей описана нами ранее [1].

ЛПС *Yersinia pestis* относится к R-хемотипу. Биологическое своеобразие его заключается в высокой внутривидовой вариабельности химической структуры и температурозависимом характере синтеза ЛПС. В соответствии с химическим строением полимеров токсичность препаратов ЛПС возбудителя чумы весьма различна и колеблется от средних значений LD₅₀

(350–800 мкг/мышь), что характерно для R-ЛПС, до полного отсутствия эффекта токсичности. Как правило, низкотемпературные ЛПС (ЛПС28) чумного микроба токсичны для биопробных животных, в то время как высокотемпературные ЛПС (ЛПС37) являются слабыми индукторами синтеза провоспалительных цитокинов, а в некоторых случаях вообще не обладают токсическими свойствами [3].

Известно, что в условиях *in vitro* токсичность препаратов ЛПС *Y. pestis* можно усилить путем формирования токсически активной конформации полимеров. Модулятором конформационных изменений ЛПС является специфический белок чумного микроба – мышинный токсин (МТ), который образует комплекс ЛПС-МТ, специфичный и высокотоксичный для биопробных животных [2].

Представляло интерес сравнить токсические свойства исходных и конформационно измененных форм ЛПС вакцинного и вирулентного штаммов чумного микроба для белых мышей, сенсibilизированных D-GalN.

В работе использовали высокотемпературные ЛПС, полученные из клеток вакцинного (EV76) и вирулентного (231) штаммов *Y. pestis*. Культуры выращивали при 37 °C на агаре LB (Difco, США) в течение 48 ч. ЛПС выделяли фенольным методом.

Мышиный токсин выделяли по оригинальной методике В.И.Марченкова из вакцинного штамма *Y. pestis* EV76. LD₅₀ препарата МТ равнялась 5,6 (4,0÷7,9) мкг/мышь. Для активации токсических свойств ЛПС *Y. pestis* препараты ЛПС соединяли с МТ и инкубировали 30 мин при 37 °C с целью образования комплекса ЛПС-МТ [2].

Обработку белых мышей D-GalN проводили по методу C.Galanos *et al.* в нашей модификации [1]. Максимальная концентрация D-GalN (Merck, Германия) составляла 30 мг на белую мышь. Доза не была токсичной для лабораторных животных. D-GalN растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно экспериментальным животным одновременно с препаратами ЛПС *Y. pestis*, исследуемыми на токсичность. Значение LD₅₀ рассчитывали по общепринятой формуле Кербера. Статистическую обработку полученных результатов проводили по критерию знаков для вероятности 0,95.

Использованные в работе 37 °C ЛПС вакцинного и вирулентного штаммов чумного микроба существенно различаются по химическому строению [6] и, как показал эксперимент, проявляют различную токсичность для биопробных животных. Так, препарат ЛПС37 вирулентного штамма *Y. pestis* 231 имеет достаточно высокий уровень токсичности, его LD₅₀ равна 310÷500 мкг/мышь. В то же время ЛПС37 вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 не токсичен для белых мышей в дозах более 3 мг.

При образовании комплекса ЛПС37-МТ токсические свойства ЛПС37 вирулентного штамма увеличиваются приблизительно в 2,5 раза (LD₅₀ = 110÷250 мкг/мышь). У вакцинного же штамма, в отличие от нетоксичной исходной формы ЛПС37, конформационно измененный комплекс ЛПС37-МТ токсичен и его LD₅₀ равна 520÷610 мкг/мышь.

Сенсибилизация белых мышей D-GalN способствует повышению чувствительности животных к действию всех указанных форм ЛПС чумного микроба. При этом выяснилось, что на фоне D-GalN различия в летальной токсичности исходных и конформационно измененных форм ЛПС как вакцинного, так и вирулентного штаммов *Y. pestis* полностью нивелируются. Доза ЛПС, вызывающая 100 % гибель животных, для препаратов всех форм (ЛПС37 и ЛПС37-МТ обоих штаммов) одинакова и равна 10 мкг/мышь. В то же время минимальные дозы препаратов ЛПС37 и ЛПС37-МТ, при которых наблюдается гибель 10–30 % животных, различны для вакцинного и вирулентного штаммов *Y. pestis*. Для препаратов ЛПС *Y. pestis* EV76 она равна 5 мкг/мышь, а для препаратов ЛПС вирулентного штамма *Y. pestis* 231 составляет 0,1 мкг/мышь. Таким образом, D-GalN усиливает токсичность ЛПС37 и ЛПС37-МТ ви-

рулентного штамма *Y. pestis* 231 в 100–1000 раз, а ЛПС37-МТ вакцинного штамма *Y. pestis* EV76 в 100 раз. Нетоксичный в обычных условиях ЛПС37 *Y. pestis* EV76 на фоне D-GalN проявляет такую же токсичность, как и конформационно измененная форма ЛПС37-МТ.

По данным литературы известно, что действие аminosахара D-GalN на организм млекопитающих избирательно и направлено исключительно на клетки печени [5]. В паренхиме печени специфические рецепторы для ЛПС (TLR2/TLR4) экспрессируют только звездчатые ретикулоэндотелиоциты – Купферовы клетки. Связывание ЛПС с Toll-рецепторами приводит к передаче трансмембранного сигнала, направленного на активацию главного регулятора синтеза провоспалительных цитокинов – фактора ядерной транскрипции (NFκB). Синтез TNF-α, инициированный ЛПС, может ограничиваться только Купферовыми клетками, или может быть усилен путем передачи сигнала от TNF-α (уже синтезированного) на соответствующие рецепторы цитотоксических клеток печени (нормальные киллеры и Т-лимфоциты). В свою очередь передача сигнала от TNF-α реализуется через два типа трансмембранных рецепторов, которые присутствуют на всех ядерных клетках организма млекопитающих – TNFR и FasR. Взаимодействие TNF-α с внутриклеточными адапторными белками FasR инициирует апоптоз клетки, а с TNFR активирует NFκB, запуская тем самым вторичный цикл синтеза TNF-α [4].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что на фоне D-GalN исходные и конформационно измененные формы ЛПС чумного микроба, независимо от их исходной токсичности, в условиях макроорганизма обладают приблизительно одинаковой TNF-α индуцирующей активностью. Видимо, в присутствии D-GalN ЛПС каскадно активирует всю сеть цитокининдуцирующих клеток печени, при этом путь передачи сигнала от TNF-α на Fas-рецепторы является доминантным, что приводит к апоптозу гепатоцитов и гибели макроорганизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Бородин Т.Н., Беспалова И.А., Пасюкова Н.И., Тынянова В.И. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV76 для белых мышей, сенсибилизированных D-галактозамином. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 1:74–6.
2. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В., Ерёмченко Н.С., Веркина Л.М., Тынянова В.И. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. *Биотехнология.* 2001; 4:53–8.
3. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Писанов Р.В., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Анисимов Б.И., Мишанькин Б.Н. Токсичность препаратов липополисахаридов из культуры *Yersinia pestis* EV76, выращенной при 28 °C и 37 °C. *Биотехнология.* 2003; 6:10–6.
4. Хаитов Р.М., Игнатова Г.А., Сидорова И.Г. Иммунология. М.: Медицина; 2000. 430 с.
5. Galanos C., Freudenberg M.A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:5939–43.
6. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties.

Acta Nature. 2012, 4(13):45–58.

References

1. Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Borodina T.N., Bespalova I.A., Pasyukova N.I., Tynyanova V.I. [Toxicity of *Yersinia pestis* EV76 to D-galactosamine sensitized LPSs white mice]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 1:74–6.
2. Sokolova E.P., Marchenkov V.I., Demidova G.V., Zyuzina V.P., Bespalova I.A., Pavlovich N.V., Ereimenko N.S., Verkina L.M., Tynyanova V.I. [Plague agent murine toxin complexes with modified *Yersinia pestis* LPS-forms and LPSs of other bacteria]. *Biotehnologiya*. 2001, 4:53–8.
3. Tynyanova V.I., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P., Pisanov R.V., Bespalova I.A., Borodina T.N., Anisimov B.I., Mishan'kin B.N. [LPS preparations' toxicity, obtained from *Yersinia pestis* EV76 culture grown at 28 °C and 37 °C]. *Biotehnologiya*. 2003, 6:10–6.
4. Khaitov R.M., Ignat'eva G.A., Sidorova I.G. [Immunology]. M.: "Meditsina", 2000. 430 p.
5. Galanos C., Freudenberg M.A., Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76:5939–43.

6. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Nature*. 2012, 4(13):45–58.

Authors:

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bespalova I.A., Borodina T.N., Tynyanova V.I. 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:

Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Тынянова В.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 05.03.14.

Е.В.Куклев, В.А.Сафронов, А.А.Лопатин, А.С.Раздорский

РАЗРАБОТКА КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ «ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

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

Разработана компьютерная программа «Эпидемический потенциал природных очагов чумы Российской Федерации», обеспечивающая автоматизированную оценку степени эпидемической опасности природных очагов чумы для пребывающего на их территории населения. Программа оптимизирует принятие управленческих решений посредством обеспечения руководителей подразделений Роспотребнадзора полной и актуальной информацией о санитарно-эпидемиологической ситуации по чуме на всей территории природных очагов РФ и повышения качества визуального представления данных, требуемых для принятия решений в сфере обеспечения биологической безопасности. В результате интеграции с компьютерной программой «Deductor» значение рассчитанного эпидемического потенциала по любому участку территории природного очага может быть ранжировано по величине потенциала с использованием шкалы цвета (от красного – максимальное значение, до фиолетового – минимальная величина). Программа создана на платформе Arc GIS для интеграции в состав автоматизированной информационно-аналитической системы обеспечения биологической безопасности в субъектах Российской Федерации.

Ключевые слова: природный очаг чумы, эпидемический потенциал, компьютерная программа.

E.V.Kouklev, V.A.Safronov, A.A.Lopatin, A.S.Razdorsky

Designing of the Software Program “Epidemic Potential of Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation”

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Designed has been a computer program “Epidemic potential of natural plague foci in the Russian Federation” applied for the automatized evaluation of the epidemic hazard level of natural plague foci in relation to the population residing on the territory of them. This software optimizes management decision making via provision of the Heads of the Rospotrebnadzor organizations with the comprehensive current data on the sanitary-epidemiological situation on plague across the whole territory of the natural foci in Russia, and by enhancing the quality of the visual data display, which are essential for the decision making in the sphere of biological safety provision. In consequence of integration into “Deductor” software program, counted value of epidemic potential for any location of the natural focus territory can be ranked correspondently using colorimetric scale (from red up violet color, for maximum and minimum rating, respectively). The program is designed on the base of Arc GIS Platform to be introduced into the automatized information analysis system for the provision of biological safety in the constituent entities of the Russian Federation.

Key words: natural plague focus, epidemic potential, computer program.

Дифференциация энзоотичной по чуме территории Российской Федерации по степени ее эпидемической опасности является одной из основных задач эпидемиологического надзора за чумой [1].

К настоящему времени под эпидемическим потенциалом природных очагов чумы (ЭП) понимают количественный показатель опасности заражения чумой в природном очаге в определенный момент времени; имеется компьютерная программа, математическая модель и методы количественной оценки эпидемического потенциала [2]. Однако данная компьютерная программа разработана без учета пространственной составляющей и требований географической информационной системы (ГИС), для ее использования в составе автоматизированной информационно аналитической системы обеспечения биологической безопасности, включающей многие программы и базу данных, требуется существенная переработка.

Нами разработан опытный образец компьютер-

ной программы «Эпидемический потенциал природных очагов чумы Российской Федерации». Данная программа разработана с учетом современных представлений о количественной оценке эпидемиологического риска и, в отличие от предыдущей, интегрируется с ГИС-сервером (Arc GIS). Ее использование обеспечивает повышение эффективности принятия управленческих решений посредством обеспечения руководителей подразделений Роспотребнадзора полной и актуальной информацией о санитарно-эпидемиологической ситуации по чуме на всей территории природных очагов Российской Федерации (РФ); своевременного информирования лиц, принимающих решения в сфере обеспечения биологической безопасности, о рисках возникновения и развития вспышек (эпидемий) чумы; сокращения временных и других затрат на подготовку достоверных и полных исходных данных для поддержки принятия решений при проведении профилактических (противоэпидемических) мероприятий; повышения

качества визуального представления данных, требуемых для принятия решений в сфере обеспечения биологической безопасности.

Начальными данными для программы являются: доля площади очага, занятая эпизоотией чумы в конкретный период времени (S); интенсивность эпизоотии (Y); доля участка очага, занятая поселениями основного носителя чумы (K); численность основного носителя чумы на 1 га и на 1 кв.км. или плотность колоний на 1 га (P); запас блох на 1 га (M1); индекс обилия блох в гнездах (M2); вирулентность штаммов возбудителя чумы задается в виде шифра очага (V); контакт человека с блохами диких грызунов в поле (большая песчанка (B11), малый-горный суслик (B12), полуденная и гребенщикова песчанка (B13), длиннохвостый суслик (B14); сурок (B15), пищуха, полевка (B16)); наличие грызунов в жилье человека (B21); наличие блох в жилье человека (B22); число индивидуальных верблюдов на семью (B31); численность государственных или кооперативных верблюдов (B32); официально организованный промысел животных (B41); браконьерство (B42); близость поселений основных носителей чумы к жилью человека (B51); распространенность игр детей и подростков с грызунами (B52); наличие в жилье человека кошек (B61); наличие в жилье человека собак (B62).

Работа программы, реализованной с помощью аналитической платформы «Deductor», начинается с импорта начальных данных. Далее, с помощью узла обработчика «Замена», осуществляется переход от значений каждого параметра к единой системе балльной оценки.

Следующим действием в данной программе является реализация в узле обработчика «Калькулятор» следующей формулы:

$$EP = (S \cdot Y + K \cdot (P + M1 \cdot M2)) \cdot V \cdot (B11 + B12 + \dots + B62)$$

Расшифровка показателей приведена выше (начальные данные).

Завершается работа программы экспортом полученного результата. Экспорт данных осуществляется в виде таблицы в единую с ГИС базу данных для дальнейшей визуализации при помощи тематической

карты эпидемического потенциала.

В результате интеграции с компьютерной программой «Deductor» значение рассчитанного эпидемического потенциала по каждому полигону (сектору первичного района или любому участку территории природного очага) может быть ранжировано по величине ЭП с использованием шкалы цвета (от красного – максимальное значение, до фиолетового – минимальная величина).

Данная компьютерная программа разработана как часть комплекса информационно-аналитической системы обеспечения биологической безопасности в субъектах Российской Федерации. Она может быть использована и как самостоятельный инструмент анализа для автоматизированного рабочего места аналитика в системе противочумных учреждений Российской Федерации.

Работа выполнена по Государственному контракту № 37-Д от 08.08.2013 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куклев Е.В., Солдаткин И.С., Хотько Н.И. Эпидемический потенциал природных очагов чумы и его оценка. В кн.: Эпидемиология и профилактика природноочаговых инфекций Саратов; 1981. С. 3–8.
2. Куклев Е.В., Лобанов К.Н., Куклев В.Е. Программа расчета величины эпидемического потенциала природного очага чумы. А.с. № 2000610423. Оpubл. 25.05.2000.

References

1. Kouklev E.V., Soldatkin I.S., Khot'ko N.I. [Epidemic potential of natural plague foci and its assessment]. In: Epidemiologia i Profilaktika Prirodnoochagovykh Infektsii. Saratov; 1981: С. 3–8.
2. Kouklev E.V., Lobanov K.N., Kuklev V.E. [Software program for counting epidemic potential value as refers to a natural plague foci]. Patent № 2000610423.

Authors:

Kouklev E.V., Safronov V.A., Lopatin A.A., Razdorsky A.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Куклев Е.В., Сафронов В.А., Лопатин А.А., Раздорский А.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 28.01.14.

А.В.Чернядьев¹, Л.Г.Дудина^{1,2}, С.Г.Литвинец¹, В.П.Черников³, А.А.Бывалов^{1,2}

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И *YERSINIA PESTIS* СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ БАКТЕРИОФАГАМИ

¹Вятский государственный университет, Киров, Российская Федерация; ²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация; ³ФГБУ НИИ морфологии человека, Москва, Российская Федерация

Проведено электронно-микроскопическое изучение динамики взаимодействия бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* со специфическими бактериофагами в условиях *in vitro*. Выявлены особенности в морфологических проявлениях указанных взаимодействий между исследованными видами микроорганизмов. Определены морфометрические характеристики использованных в опыте бактериофагов. Показано, что через 40 мин совместной инкубации бактерий *Y. pseudotuberculosis* со специфическим бактериофагом наблюдается появление персистирующих форм микробных клеток, в то время как при инфицировании клеток штамма EV бактериофагом Покровской это явление не обнаружено.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, бактериофаг, электронная микроскопия.

A.V.Chernyad'ev¹, L.G.Dudina^{1,2}, S.G.Litvinets¹, V.P.Chernikov³, A.A.Byvalov^{1,2}

Electron-Microscopic Investigation of Interactions between *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* Cells and Specific Bacteriophages

¹Vyatka State University, Kirov, Russian Federation; ²Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation; ³Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Carried out has been electron-microscopic investigation of dynamics of interactions between *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* cells and specific bacteriophages *in vitro*. Identified have been peculiarities in morphological manifestation of the interactions. Determined are morphometric characteristics of the bacteriophages utilized in the experiment. It is demonstrated that after 40 minutes of co-incubation of *Y. pseudotuberculosis* with specific bacteriophage emergence of persisting forms of microbial cells is observed, while in case of EV strain infecting with Pokrovskaya bacteriophage, this phenomenon is not detected.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, bacteriophage, electron-microscopy.

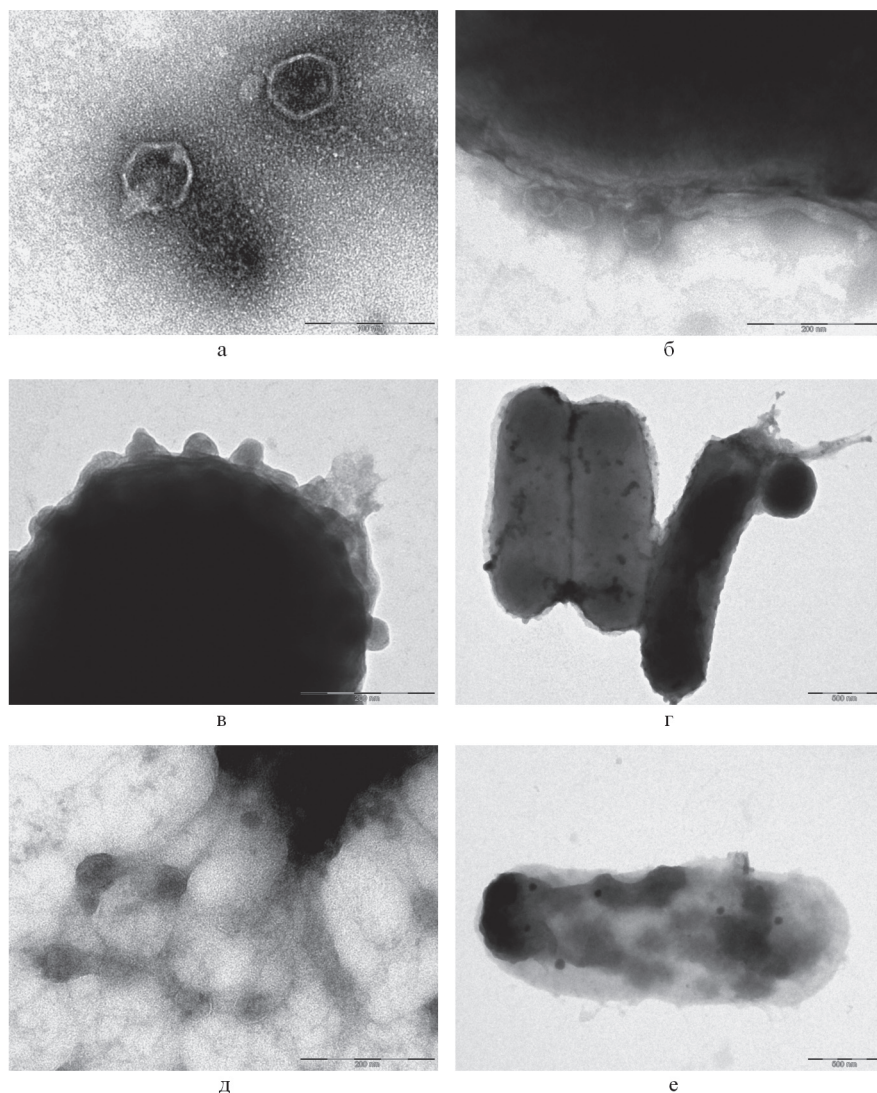
В последние годы в связи с резким обострением проблемы возрастания антибиотикорезистентности циркулирующих в природе штаммов возбудителей многих заболеваний бактериальной природы вновь возрастает интерес к применению в медицинской практике альтернативных подходов, основанных на принципах фаготерапии. Это относится и к инфекциям, вызываемым бактериями рода *Yersinia*. Для отработки схем и методов лечения этих заболеваний с помощью специфических бактериофагов необходимо проведение исследований, направленных на изучение механизмов взаимодействия в системе «фаг–прокариот» с использованием микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических и иных методов.

Целью данной работы являлось электронно-микроскопическое исследование взаимодействия бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* со специфическими бактериофагами в условиях *in vitro*.

В работе использовали бактерии *Y. pseudotuberculosis*, штамм 1b (кат. № 474) и *Y. pestis*, штамм EV, а также бактериофаги диагностические псевдотуберкулезный и чумной Покровской, полученные из коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Бактериальные культуры выращивали на плотной

питательной среде на основе питательного агара «Биотехновация» (БТН-агар, Россия) в течение 1 сут при температуре 37 и 27 °C для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* соответственно. Инкубацию микробных клеток и соответствующего бактериофага в соотношении 1:100 проводили при температуре 37 °C в течение 5, 20, 40, 60 и 180 мин, фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2,5 % раствором глутарового альдегида («Serva», Германия). Исследуемые препараты наносили на медные сеточки (200 меш), покрытые углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, проводили негативное контрастирование 2 % уранилацетатом. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование проводили CCD с помощью камеры Keen View («Olympus», Германия).

Как показали результаты просвечивающей электронной микроскопии, частица обоих фагов состоит из головки (икосаэдрического капсида) гексагональной формы на плоскости, размеры которой варьируют от 40 до 60 нм в диаметре, и короткого отростка длиной до 15 нм. Головка псевдотуберкулезной фаговой частицы имела немного вытянутую форму вдоль центральной оси (рис. 1, а). Размеры фагов псевдоту-



Электронно-микроскопическая картина динамики взаимодействия клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b со специфическим бактериофагом:

а – неадгезированные фаговые частицы; б–е – инкубация в течение 5, 20, 40, 60 и 180 мин соответственно

беркулезного и Покровской оказались следующими: диаметр головки вдоль центральной оси ($52,3 \pm 2,2$) и ($50,3 \pm 1,8$) нм, ширина – ($50,2 \pm 0,9$) и ($50,2 \pm 1,3$) нм, длина отростка – ($13,0 \pm 1,2$) и ($10,4 \pm 1,0$) нм. По принятой классификации [4] оба фага можно отнести к семейству Podoviridae, морфотип С1, к которому относятся большинство чумных литических бактериофагов, в том числе, как было показано ранее, и фаг Покровской [5].

В течение первых 5 мин инкубации бактериальной культуры *Y. pseudotuberculosis*, инфицированной специфическим фагом, уже наблюдалась адсорбция фаговых частиц на поверхности бактериальных клеток (рис. 1, б). Большая часть фагов к этому времени еще находится в межклеточном пространстве. На поверхности бактерий фаги располагались неравномерно и были представлены как небольшими группами, так и одиночными частицами. Большинство микробных клеток в этот период не имело видимых изменений, наблюдалось продолжение их роста и процессов деления. Инфицированные бактерии в большей степени проявляли склонность к формированию слоя внеклеточного матрикса, призванного защитить клетки от воздействия агрессивных факторов среды

[2]. По-видимому, это можно считать проявлением адаптивной реакции на адсорбцию фаговых частиц. Клетки, не атакованные фагами, защитного слоя не имели, либо он был выражен в меньшей степени. У единичных бактерий после 5 мин инкубации с фагом уже наблюдались локальные разрывы в оболочке, но клетки еще не разрушались полностью и не теряли своей формы.

После 20 мин инкубации инфицированной культуры *Y. pseudotuberculosis* в межклеточном пространстве встречались только отдельные фаговые частицы, на большинстве микробных клеток наблюдались адсорбированные фаги, расположенные относительно равномерно по поверхности бактерий. При этом головки фагов были окутаны достаточно плотным слоем матрикса и имели вид наростов или шишек на клеточной оболочке (рис. 1, в). Не исключено, что многие из них представляют собой уже вторичные фаги, которые при выходе из клеток несли на себе часть цитоплазматического коллоида и имели вид ватных комочков. На созревание к этому времени урожая вторичных фагов указывает и тот факт, что среди микробных клеток выявлялось некоторое количество мертвых особей, отличающихся значи-

тельно меньшей электронной плотностью. Меньшая плотность таких бактерий определяется тем, что они представлены почти исключительно клеточной оболочкой, т.к. основная масса их содержимого «выплеснулась» при выходе зрелых фаговых частиц.

При продолжении инкубации бактериальной культуры с фагом в течение 40 мин процессы, отмеченные на предыдущем этапе опыта, становились более выраженными. В частности, наблюдалось значительно большее количество мертвых клеток и бактерий с измененной морфологией (рис. 1, г). В то же время снизилось относительное количество микробов с адсорбированными фаговыми частицами, уменьшилось и среднее количество фагов, приходящихся на одну клетку. Это отчасти связано с тем, что фаговые частицы становятся менее различимы в связи с их большей экранировкой обволакивающим внеклеточным матриксом. В этот период отмечено также появление переживающих (персистирующих) форм бактерий, формирование которых является одним из проявлений защитной реакции микробной культуры на воздействие неблагоприятных факторов [1, 3]. Переживающие клетки отличаются сферической формой, меньшими размерами и более прочной оболочкой. Такие формы менее доступны в отношении адсорбции фагов и более устойчивы к воздействию их литических ферментов.

После 60 мин инкубации *Y. pseudotuberculosis* со специфическим бактериофагом в культуре наблюдались только отдельные живые микробные клетки; чаще они были покрыты адсорбированными фаговыми частицами, имеющими вид наростов или шишек на теле бактерии, редкие из них были защищены толстым слоем внеклеточного матрикса. Основная масса клеток имела искаженную морфологическую форму и различные повреждения оболочки, из которых «выплескивалось» содержимое микробов. В них часто можно было различить и сформированные фаговые частицы (рис. 1, д).

Через 3 ч инкубации в культуре *Y. pseudotuberculosis* наблюдали только мертвые, электронно-прозрачные клетки (рис. 1, е). Единичные жизнеспособные особи были представлены, в основном, переживающей формой бактерий.

Для инфицированной фагом Покровской культуры штамма EV *Y. pestis* характерно некоторое запаздывание динамики эффектов взаимодействия по сравнению с культурой *Y. pseudotuberculosis*, зараженной специфическим бактериофагом. К 60-й минуте инкубации регистрируемые различия были выражены в меньшей степени. В этот период стали явно заметны морфологические изменения клеток, разрывы их оболочек и выброс содержимого вместе со зрелыми фаговыми частицами. Отличительной чертой динамики взаимодействия культуры штамма EV с фагом было и то, что до 60-й минуты наблюдения включительно отмечено нарастание количества фаговых частиц на микробных клетках. К 3 ч

инкубации в культуре наблюдались только мертвые бактерии, однако на некоторых клетках можно было наблюдать относительно большое количество равномерно расположенных фагов. Появления переживающих форм микробов не зафиксировано. На протяжении всего опыта для микробных клеток штамма EV было характерно менее выраженное образование защитного слизистого слоя, в связи с чем фаговые частицы были менее экранированы и лучше выявлялись на поверхности бактерий вплоть до конца срока наблюдения.

Таким образом, электронно-микроскопически оценена динамика морфологических изменений бактерий рода *Yersinia* под действием специфических фагов. Показано, что в использованных условиях опыта скорость нарастания деструктивных изменений ниже в инфицированной культуре *Y. pestis* по сравнению с *Y. pseudotuberculosis*, в которой через 40 мин совместной инкубации с псевдотуберкулезным фагом отмечали появление персистирующих форм бактерий. Данного явления в суспензии клеток штамма EV, зараженной фагом Покровской, не отмечали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005. 367 с.
2. Павлова И.Б., Ленченко Е.М. Электронно-микроскопическое исследование адгезивности бактерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002; 1:3–6.
3. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов. Микробиология. 2006; 75(4):446–56.
4. Ackerman H.-W. Frequency of morphological phage description in the year 2000. Arch. Virol. 2001; 146:843–57.
5. Garcia E., Chain P., Elliot J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O., Lao V., Calendar R., Filippov A.A. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. Virology. 2008; 372:85–96.

References

1. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El'-Registan G.I. [Survival mechanisms of bacteria]. M.; 2005. 367 p.
2. Pavlova I.B., Lenchenko E.M. [Electron-microscopic investigation of bacterial adhesiveness]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2002; 1:3–6.
3. El'-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. [Adaptogenic functions of extracellular auto-regulators in microorganisms]. Mikrobiologia. 2006; 75(4):446–56.
4. Ackerman H.-W. Frequency of morphological phage description in the year 2000. Arch. Virol. 2001; 146:843–57.
5. Garcia E., Chain P., Elliot J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O., Lao V., Calendar R., Filippov A.A. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. Virology. 2008; 372:85–96.

Authors:

Chernyad'ev A.V., Dudina L.G., Litvinets S.G., Byvalov A.A. Vyatka State University. Kirov, Russian Federation.
Dudina L.G., Byvalov A.A. Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation;
Chernikov V.P. Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Об авторах:

Чернядьев А.В., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Бывалов А.А. Вятский государственный университет. Киров, Российская Федерация.
Дудина Л.Г., Бывалов А.А. Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар, Российская Федерация.
Черников В.П. ФГБУ НИИ морфологии человека. Москва, Российская Федерация.

Поступила 29.10.14.

А.В.Ямборко¹, Ю.В.Еремеева²**ДЕТЕКЦИЯ *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* В КЛЕЩАХ *IXODES ANGUSTUS* ИЗ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ**¹ФГБУН «Институт биологических проблем Севера» ДВО РАН, Магадан, Российская Федерация;²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Магаданской области», Магадан, Российская Федерация

Сообщается о выявлении *Anaplasma phagocytophilum* в клещах *Ixodes angustus* генодиагностическим методом. ДНК анаплазм была обнаружена в одном из девяти образцов имаго иксовых клещей, собранных с фоновых видов грызунов в пригороде города Магадана. Полученные данные могут указывать на существование природного очага гранулоцитарного анаплазмоза на юге Магаданской области, где возбудитель поддерживается в энзоотическом цикле: мелкие млекопитающие – *Ixodes angustus*.

Ключевые слова: *Anaplasma phagocytophilum*, анаплазмоз, *Ixodes angustus*, Магадан.

A.V.Yamborko¹, Yu.V.Eremeeva²**Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes angustus* Ticks Found in the Magadan Region**¹Institute of Biological Problems of the North, Magadan, Russian Federation; ²Center of Hygiene and Epidemiology in the Magadan Region, Magadan, Russian Federation

Reported is the event of detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes angustus* ticks using gene-diagnostic technique. *Anaplasma* DNA is identified in one of the nine samples of ixodic tick imago collected from common species of rodents in the suburbs of Magadan. The data obtained may be indicative of the existence of natural granulocytic anaplasmosis focus in the south of the Magadan Region where the agent persists in enzootic cycle: small mammals – *Ixodes angustus*.

Key words: *Anaplasma phagocytophilum*, anaplasmosis, *Ixodes angustus*, Magadan.

Гранулоцитарный анаплазмоз – трансмиссивный природно-очаговый зооноз, вызываемый облигатными внутриклеточными паразитами – риккетсиями *Anaplasma phagocytophilum*. Анаплазмы локализуются в цитоплазматических вакуолях белых кровяных клеток хозяина, главным образом, гранулоцитов [11]. Известно, что *A. phagocytophilum* вызывает заболевание человека и домашних животных (собак, кошек, лошадей и жвачных) [8]. Природным резервуаром инфекции служат млекопитающие, преимущественно микромаммалии. Векторами гранулоцитарного анаплазмоза в пределах всего нозоареала возбудителя являются иксовые клещи. В связи с этим, вид *A. phagocytophilum* практически повсеместно распространен в пределах ареалов его основных переносчиков [2]. Для иксовых клещей известна трансфазовая передача анаплазм, трансовариальная передача отсутствует [4, 6]. Поэтому ведущую роль в заражении клещей играет горизонтальный перенос возбудителя при питании на инфицированном хозяине.

Ixodes angustus многочисленный, но в тоже время слабо изученный вид иксовых клещей. Ареал этого голарктического вида трансконтинентален. В Палеарктике встречается преимущественно на Тихоокеанском побережье (прибрежные районы Магаданской области, юг Камчатки) и прилегающих островах (Сахалин, Хоккайдо, Курильские о-ва), также проникая и в континентальные районы Приморья и среднее Приамурье [5]. Неарктическая часть ареала более обширна. В Северной Америке распростра-

нен на западном побережье от Аляски на севере, до Мексики на юге. Далее на восток, ареал сужается в широтном направлении и достигает Атлантического побережья выше 40-й параллели [3]. В Магаданской области *I. angustus* обнаружен полвека назад В.Г.Беляевым [1] при обследовании Магадана и его окрестностей. Обычен на побережье Тауйской губы Охотского моря (юг Магаданской области), однако севернее 60° с.ш. иксовые клещи не встречаются. Основными прокормителями всех жизненных стадий *I. angustus* являются мелкие грызуны и насекомоядные [5].

В Северной Америке *I. angustus* служит переносчиком ряда патогенов, таких как *Borrelia burgdorferi* [9], *Babesia microti* [7] и *A. phagocytophilum* [10]. В палеарктической части ареала участие этого вида иксодид в поддержании природных очагов клещевых инфекций не изучено.

Материалом для работы послужили иксовые клещи, собранные с грызунов в июне–июле 2013 г. в пригороде Магадана (59°30' с.ш., 150°54' в.д.). Всего проанализировано девять образцов имаго *I. angustus*, находившихся на разных стадиях насыщения. Семь экземпляров клещей были сняты с красных полевков (*Myodes rutilus*), два – с красно-серой полевки (*M. rufocanus*). Молекулярно-генетические исследования выполнены в ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора. Образцы клещей анализировались индивидуально. Экстракция нуклеиновых кислот из образцов проводилась с использованием наборов реагентов «РИБО-преп» («АмплиСенс», ФБУН

ЦНИИЭ, Россия). Выявление РНК/ДНК возбудителей клещевых инфекций осуществляли с применением набора реагентов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis* / *E. muris*-FL» («АмплиСенс», ФБУН ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с инструкцией и методическими рекомендациями производителя.

В одном из девяти образцов обнаружена ДНК *A. phagocytophilum* (11,1 %). Данный экземпляр клеща был снят с красной полевки. РНК/ДНК других возбудителей не выявлена. Таким образом, результаты исследования указывают на возможность существования на юге Магаданской области природного очага гранулоцитарного анаплазмоза, в поддержании которого участвуют клещи *I. angustus* и их хозяева – мелкие млекопитающие. Известно, что имаго этого вида клещей могут присасываться к собакам, кошкам и человеку [12]. Учитывая широкую распространенность и многочисленность клещей *I. angustus* в окрестностях Магадана, можно предположить, что этот вид иксодид должен иметь некоторое ветеринарное и медицинское значение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев В.Г. К фауне эктопаразитов Магаданской области. Докл. Иркутск. противочумного ин-та. 1963; 5:180–5.
2. Васильева И.С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (*Ixodidae*). Эрлихиозы и анаплазмозы человека. РЭТ-инфо. 2006; 4:1–6.
3. Колонин Г.В. Мировое распространение иксодовых клещей. Род *Ixodes*. М.: Наука; 1981. 116 с.
4. Рар В.А., Ливанова Н.Н., Панов В.В., Астанин В.Б., Ливанов С.Г., Морозова О.В. Изучение генетического разнообразия анаплазм и эрлихий в паразитарных системах юга Западной Сибири и Урала. Бюлл. сибирской медицины. 2006; 5 (Приложение 1):116–21.
5. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*. В кн.: Фауна СССР. Паукообразные. Л.: Наука; 1977. Т. IV(4). 396 с.
6. Foley J., Nieto N.C., Adjemia J., Dabritz H., Brown R.N. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes* ticks, western United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(7):1147–50.
7. Goethert H.K., Lubelczyk C., LaCombe E., Holman M., Rand P., Smith R.P. Jr, Telford S.R. 3rd. *Enzootic Babesia microti* in Maine. *J. Parasitol.* 2003; 89(5):1069–71.
8. McQuiston J.H., McCall C.L., Nicholson W.L. Ehrlichiosis and related infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003; 223(12):1750–6.
9. Peavey C.A., Lane R.S., Damrow T. Vector competence of

Ixodes angustus (Acari: Ixodidae) for *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Exp. Appl. Acarol.* 2000; 24(1):77–84.

10. Rejmanek D., Freycon P., Bradburd G., Dinstell J., Foley J. Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing *Ixodes* tick species in the western United States. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(6):482–7.

11. Rikihisa Ya. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24(3):469–89.

12. Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A. Parasitic diseases of wild mammals. 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press. Ames; 2001. 563 p.

References

1. Belyaev V.G. [Concerning the fauna of ectoparasites in the Magadan Region]. *Dokl. Irkutsk. Protivochumn. Instituta.* 1963; 5:180–5.
2. Vasil'eva I.S. [Emerging tick-borne (Ixodidae) diseases. Human ehrlichioses and anaplasmoses]. *RET-info.* 2006; 4:1–6.
3. Kolonin G.V. [Dissemination and Distribution of Ixodic Ticks in the World. *Ixodes* Genus]. M.: Nauka; 1981. 116 p.
4. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V., Astanin V.B., Livanov S.G., Morozova O.V. [Studies of the genetic diversity of *Anaplasma* and ehrlichiosis agent in parasitological coenoses in the South of West Siberia and Ural]. *Byull. Sibir. Meditsiny.* 2006; 5(Appendix 1): 116–21.
5. Filippova N.A. [Ixodidae ticks of *Ixodinae* subfamily]. In: [USSR Fauna. Arachnids]. L.: Nauka; 1977. Vol. IV(4). 396 p.
6. Foley J., Nieto N.C., Adjemia J., Dabritz H., Brown R.N. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of *Ixodes* ticks, western United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(7):1147–50.
7. Goethert H.K., Lubelczyk C., LaCombe E., Holman M., Rand P., Smith R.P. Jr, Telford S.R. 3rd. *Enzootic Babesia microti* in Maine. *J. Parasitol.* 2003; 89(5):1069–71.
8. McQuiston J.H., McCall C.L., Nicholson W.L. Ehrlichiosis and related infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003; 223(12):1750–6.
9. Peavey C.A., Lane R.S., Damrow T. Vector competence of *Ixodes angustus* (Acari: Ixodidae) for *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Exp. Appl. Acarol.* 2000; 24(1):77–84.
10. Rejmanek D., Freycon P., Bradburd G., Dinstell J., Foley J. Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing *Ixodes* tick species in the western United States. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013; 4(6):482–7.
11. Rikihisa Ya. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24(3):469–89.
12. Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A. Parasitic diseases of wild mammals. 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press. Ames; 2001. 563 p.

Authors:

Yamborko A.V. Institute of Biological Problems of the North. 18, Portovaya St., 685000, Magadan, Russian Federation. E-mail: yambor84@inbox.ru.

Eremeeva Yu.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Magadan Region. 53, Yakutskaya St., 685000, Magadan, Russian Federation. E-mail: virus@magadancgsen.ru.

Об авторах:

Ямборко А.В. Институт биологических проблем Севера ДВО РАН. Российская Федерация, 685000, Магадан, ул. Портовая, д. 18. E-mail: yambor84@inbox.ru.

Еремеева Ю.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Магаданской области. Российская Федерация, 685000, Магадан, ул. Якутская, д. 53. E-mail: virus@magadancgsen.ru

Поступила 24.02.14.

**РЕЗОЛЮЦИЯ
XII МЕЖГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ СНГ «ВКЛАД ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ СОДРУЖЕСТВА
НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ В ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО
БЛАГОПОЛУЧИЯ НАСЕЛЕНИЯ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ»
(25–26 ноября 2014 г., Российская Федерация, г. Саратов)**

26 ноября 2014

г. Саратов

Участники XII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Вклад государств-участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» от Азербайджанской Республики, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан, Украины и Исполкома СНГ отметили значительный опыт сотрудничества государств-участников СНГ как одного из эффективных механизмов решения региональных проблем противодействия новым угрозам санитарно-эпидемиологическому благополучию населения и констатировали необходимость его дальнейшего развития.

Актуальность темы обусловлена возникновением и распространением ряда опасных инфекционных болезней в мире.

В 2014 г. Всемирной организацией здравоохранения две эпидемические ситуации в мире объявлены как чрезвычайные в области общественного здравоохранения, имеющие международное значение – вспышка полиомиелита в 10 странах Азии, Африки и Ближнего Востока и эпидемия лихорадки Эбола в странах Западной Африки с впервые зарегистрированными в ее истории выносами в другие страны и континенты.

Сохраняется эпидемиологическая напряженность в мире, связанная с продолжающейся эпидемией холеры на о. Гаити (более 700 тыс. заболевших) и в странах Африки, значительной по масштабам эпидемией лихорадки Чикунгунья, охватившей 33 страны Карибского бассейна (около 660 тыс. заболевших), вспышками новых инфекционных болезней – вызванная MERS-коронавирусом и вторая волна гриппа A(H7N9). Существует высокий риск распространения лихорадки денге, малярии и др.).

В Российской Федерации имеет место расширение ареала и рост заболеваемости лихорадкой Западного Нила (191 случай в 16 субъектах в 2013 г.). На территории стран СНГ угрозу эпидемиологическому благополучию населения Содружества представляет эпизоотическая активность ряда природных очагов чумы, уже приведшая к двум случаям заболевания чумой в 2014 г. (Киргизская Республика, Тянь-Шаньский природный очаг; Россия, Горно-

Алтайский природный очаг).

Участники конференции акцентируют внимание на том, что в большинстве докладов и опубликованных в сборнике 123 статьях конференции освещены и обсуждены конкретные предложения по усовершенствованию мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе на основе внедрения современных информационных, диагностических, профилактических технологий.

Участники конференции отметили обширную работу в государствах-участниках СНГ по решению задач, очерченных на предыдущих конференциях в плане обеспечения совместных ответных действий на ЧС санитарно-эпидемиологического характера, совершенствования всего комплекса мероприятий в рамках эпидемиологического надзора, санитарной охраны территорий на основе внедрения современных информационных, диагностических, профилактических, биотехнологических технологий. Созданы интерактивные базы данных, позволяющие оценить современное эпидемиологическое состояние природных очагов чумы (Россия, Казахстан), осуществлять мониторинг чрезвычайных ситуаций, в том числе эпидемиологического характера (Россия). Осуществляется внедрение ГИС-технологий в систему эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями на территории ряда субъектов Российской Федерации, в Казахстане, Армении.

На конференции рассмотрены вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в зонах стихийных бедствий, противоэпидемического обеспечения проведения массовых мероприятий с международным участием, оказания помощи в локализации вспышки лихорадки Эбола в Западной Африке. Отмечена положительная работа по функционированию мобильных формирований, предназначенных для оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера – СПЭБ Роспотребнадзора, мобильных диагностических групп Минобороны России, специализированных формирований государственного санитарного надзора (Республика Беларусь), высокая степень их организационной и материально-технической готовности.

В рамках совершенствования системных основ противодействия ЧС санитарно-эпидемиологического характера на национальном уровне, отвечаю-

щих требованиям ММСП (2005 г.), в Российской Федерации получен большой практический опыт и усовершенствована тактика использования модернизированных специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора при предупреждении и реагировании на ЧС: в зоне наводнения в Дальневосточном федеральном округе в 2013 г.; в Сибирском федеральном округе в 2014 г.; в ходе проведения летней оздоровительной кампании 2014 г. в Крымском федеральном округе; борьба с эпидемией лихорадки Эбола в Гвинейской Республике в 2014 г.

Разработана и апробирована тактика использования специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора в ходе обеспечения проведения массовых мероприятий при проведении: Универсиады-2013 в Казани; саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г.; XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи в 2014 г.

Затронуты вопросы совершенствования биологического мониторинга, экспрессного анализа воздуха на наличие возбудителей инфекционных болезней, санитарной оценки почв в отношении возбудителя сибирской язвы, проблема элиминации кори на фоне снижения уровня охвата иммунизацией и интенсивной миграции.

Участники конференции отмечают существенный вклад России в международную помощь здравоохранению стран СНГ. В Концепции государственной политики Российской Федерации в сфере содействия международному развитию (утв. Указом Президента Российской Федерации от 20 апреля 2014 г. № 259) укрепление национальных систем здравоохранения, ориентированных, в том числе, на борьбу с распространением инфекционных заболеваний, названо одним из приоритетных направлений в сфере содействия международному развитию, соответствующих национальным интересам России.

Программы помощи странам СНГ реализуются Роспотребнадзором в рамках выполнения Российской Федерацией обязательств, принятых на саммите «Группы восьми» (2006 г.), в соответствии с решениями Правительства России и направлены на укрепление национального потенциала в области профилактики инфекционных заболеваний, совершенствование мониторинга и гармонизацию подходов к профилактике и надзору за инфекционными заболеваниями в странах для совместного противодействия угрозам. Содействие международному развитию осуществляется в том числе в форме направления целевых взносов на реализацию международных программ и оказания технического содействия путем передачи знаний и опыта в целях развития кадрового потенциала. В сфере борьбы с инфекционными болезнями в регионе СНГ поддерживается позиция Российской Федерации как страны-донора международных программ развития.

В рамках подписанных в 2011–2012 гг. меморандумов о сотрудничестве в области борьбы с ин-

фекционными болезнями Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека оказывала помощь Армении, Белоруссии, Казахстану, Кыргызстану, Узбекистану, Азербайджану в реализации мер по противодействию полиомиелиту, тропическим болезням и другим инфекционным болезням в виде безвозмездных поставок лабораторного оборудования, диагностических препаратов и вакцин, подготовки специалистов по лабораторной диагностике и профилактике инфекционных болезней.

С 2013 г. финансируется трехлетняя программа содействия странам-партнерам (Армения, Азербайджан, Беларусь, Кыргызстан, Таджикистан и Узбекистан) в борьбе с ВИЧ/СПИД и вирусными гепатитами. В 2014 г. запущена программа оказания российской помощи странам СНГ в борьбе с корью (2014–2015 гг.). Распоряжением Правительства Российской Федерации от 07.10.2014 г. № 1965-р предусмотрено выделение финансовых ресурсов для оказания материально-технической поддержки странам СНГ в рамках внедрения ММСП (2005 г.) в период 2015–2016 гг. в виде поставок мобильных автолабораторий, лабораторного оборудования и расходных материалов, разработки учебных пособий, проведения региональных совещаний и конференций, подготовки кадров.

Как подчеркнуто в целом ряде докладов, противодействие вновь возникающим инфекциям и известным нозологическим формам, имеющим эпидемический и пандемический потенциал, связано с комплексным решением проблемы обеспечения биологической безопасности. Это требует единого правового, информационного и технологического поля на пространстве СНГ, создания межгосударственной системы мониторинга и контроля ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В настоящее время продолжается работа по инвентаризации нормативно-правовой базы сотрудничества в области здравоохранения, совершенствованию принятых ранее межгосударственных соглашений и адаптации их к существующим в государствах-участниках СНГ на текущий момент социально-экономическим условиям.

Принципиально важным направлением в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения остается создание и совершенствование системных основ предупреждения и ликвидации ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения, приведение стационарной сети и мобильных формирований противоэпидемической направленности государств-участников СНГ к уровню, адекватному для выявления и противодействия распространению новых (неизвестных), возвращающихся и распространяющихся на новые территории инфекционных болезней, ассоциируемых с ЧС.

Таким образом, основными задачами по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополу-

чия населения в современных условиях являются:

- совершенствование технологии и нормативно-методической базы информационного обмена между странами СНГ относительно эпидемиологических ситуаций, потенциально опасных в плане возникновения ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения;

- осуществление на единой методологической, технологической и организационной основе мониторинга и контроля ЧС с определением потенциальной опасности их возникновения на современной риск-логической основе;

- координация научных исследований в государствах-участниках СНГ по созданию системы противодействия ЧС на национальном уровне и на пространстве СНГ;

- изучение и нормативно-методическое закрепление в содержании эпидемиологического надзора эволюционных преобразований эпизоотического и эпидемического процессов и эволюции в представлениях о биоценотической структуре, эпизоотической и эпидемической активности природных очагов чумы;

- практическая реализация научных разработок в области широкого формата биологической безопасности;

- обеспечение готовности к проведению противоэпидемических мероприятий в случае заноса лихорадки Эбола в страны СНГ;

- развитие сотрудничества с ВОЗ в отношении эпидемиологического надзора и контроля, в том числе с участием российских СПЭБ, широкого спектра угроз биологического характера (актуальных, новых, возвращающихся, распространяющихся на новые территории инфекционных болезней), потенциально способных привести и реально создающих ЧС санитарно-эпидемиологического характера с тяжелыми социально-экономическими и политическими последствиями.

XIII Межгосударственную научно-практическую конференцию предложено провести на тему: «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.)» предложено провести в 2016 г.

РЕШЕНИЕ МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО СОВЕЩАНИЯ ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (27 ноября 2014 г., г. Саратов)

Во исполнение приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 999 от 08.10.2014 г. 27 ноября 2014 г. на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора проведено Межведомственное совещание по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (Пленум Координационного научного совета (КНС) по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации).

В совещании приняли участие представители учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Минздрава России, Российской академии сельскохозяйственных наук, Минобороны России.

Рассмотрены вопросы по организации эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными болезнями; диагностике, профилактике и лечению особо опасных инфекционных болезней; биомедицинским аспектам особо опасных и других опасных инфекционных болезней; биологической безопасности и противодействию биотерроризму.

Проведено обсуждение и утверждение отчетных за 2014 г. и плановых на 2015 г. материалов КНС.

Участники совещания констатируют, что в 2014 г. эпидемиологическая обстановка по ряду ин-

фекционных болезней в Российской Федерации остается нестабильной.

В настоящее время сохраняется высокая эпизоотическая и эпидемическая активность природных очагов чумы. Случаи заболевания в 2014 г. отмечены в США (8 случаев), Китае (3). В России в 2014 г. эпизоотии чумы зарегистрированы в Горно-Алтайском высокогорном и Прикаспийском песчаном очагах. В сентябре текущего года зарегистрирован случай заболевания чумой в Республике Алтай.

На сегодняшний день холера остается приоритетной проблемой мирового здравоохранения. Сохраняется эпидемиологическое неблагополучие в странах Центральной и Западной Африки – Нигерии, Гане, Демократической Республике Конго. Продолжается эпидемия холеры на Гаити, где по состоянию на ноябрь 2014 г. зарегистрировано 711442 случая заболевания и 8646 случаев смерти, в Доминиканской Республике – 31681 и 472 случая соответственно. Регистрируются случаи заболевания холерой на Кубе и в Мексике. В июне 2014 г. зарегистрирован занос холеры из Индии в Россию (Москва).

С декабря 2013 г. по настоящее время продолжается эпидемия болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ) в странах Западной Африки. По данным ВОЗ, на 20 ноября 2014 г. зарегистрировано 15145 случаев заболевания и 5420 случаев смерти.

В эпидемический процесс вовлечены 22 префектуры в Гвинее, все округа в Сьерра-Леоне и графства в Либерии. Отмечены выносы инфекционной болезни в приграничные государства – Нигерию, Сенегал, Мали, а также за пределы Африканского континента – Испанию и США, сопровождавшиеся случаями вторичного заражения. В 2014 г. осложнилась эпидемиологическая обстановка по лихорадке Эбола и в Демократической Республике Конго, где также зафиксирован 1 смертельный случай лихорадки Марбург у медработника.

В 2014 г. случаи заболевания, вызванные диким полиовирусом I типа, зарегистрированы в эндемичных странах – Пакистане, Афганистане и Нигерии (259 случаев), и еще в 6 сопредельных государствах – Камеруне, Сомали, Экваториальной Гвинее, Ираке, Эфиопии и Сирии (19 случаев).

Желтая лихорадка в 2014 г. регистрируется на Африканском континенте (Демократическая Республика Конго, 139 случаев) и в странах Латинской Америки – Бразилии (3 случая), Колумбии (1), Боливии (1) и Перу (21). В 2014 г. эпидемические проявления лихорадки денге регистрируются в Юго-Восточной Азии, Центральной и Южной Америке, а также странах Карибского бассейна.

В регионах восточного Китая и на Тайване сохраняется сложная обстановка по гриппу птиц А(Н7N9), где по октябрь 2014 г. отмечено 453 случая заболевания, в том числе 175 со смертельным исходом. Известно о 2 эпизодах выноса болезни за пределы материкового Китая – в Малайзию и Канаду.

Значительна по масштабам также продолжающаяся эпидемия лихорадки Чикунгунья, охватившая в 2014 г. 33 страны Карибского бассейна и Латинской Америки (более 700 тыс. заболевших).

В странах Ближнего Востока продолжают регистрироваться случаи заболевания новой коронавирусной инфекцией. По данным ВОЗ на ноябрь 2014 г., число больных достигло 932, в том числе 371 с летальным исходом. Около 85 % лабораторно подтвержденных случаев зарегистрировано в Саудовской Аравии.

Отмечена активизация эпидпроцесса ряда природно-очаговых инфекций, в том числе лихорадки Западного Нила. В 2014 г. отмечено 1820 случаев заболевания в США, 18 – в Канаде, 210 – в странах Европы, 27 – в России. В 2014 г. зарегистрировано 90 случаев заболевания с 2 летальными исходами Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ) в Российской Федерации (Республики Дагестан и Калмыкия, Ставропольский край, Волгоградская область). В Грузии зафиксировано 5 случаев заболевания КГЛ.

Российская Федерация в тесном партнерстве с другими странами, в рамках различных региональных объединений (СНГ, ШОС, ЕврАзЭС и др.), уделяет огромное значение разработке эффективных мер реагирования и минимизации последствий проявлений опасных инфекционных болезней. С уче-

том проведенной в последние годы модернизации материально-технической базы органов и учреждений, обеспечивающих санитарно-эпидемиологическое благополучие населения, достигнут принципиально новый уровень и возможности по оперативному реагированию на чрезвычайные ситуации эпидемиологического характера. Вместе с укреплением стационарных структур, проведена и модернизация мобильных противоэпидемических формирований (СПЭБ), имеющих в своем оснащении мобильные противоэпидемические комплексы, размещенные на базе 5 противочумных институтов Роспотребнадзора.

Разработана и успешно реализуется инновационная технология оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера с помощью СПЭБ, в том числе за рубежом, позволяющая выполнять в оперативном режиме и в автономных условиях весь спектр исследований, необходимых для оценки эпидемиологической и санитарно-гигиенической обстановки в зоне ЧС. Это позволило создать адекватные для современных угроз и вызовов биологического характера силы, осуществляющие в режиме реального времени мониторинг и контроль ЧС.

В настоящее время уже имеется существенный опыт практического применения модернизированных СПЭБ:

- при ликвидации последствий стихийных бедствий и антропогенных катастроф (масштабные наводнения на территории Дальневосточного федерального округа, 2013 г.; Сибирского федерального округа, 2014 г.);

- для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения во время проведения массовых мероприятий с международным участием (Универсиада-2013, Казань; саммит G20, Санкт-Петербург, 2013; Олимпиада-2014, Сочи);

- при локализации и ликвидации эпидемических проявлений особо опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии (оказание помощи Гвинейской Республике в борьбе с БВВЭ).

В связи с сохраняющейся угрозой заноса, возникновения и распространения опасных и особо опасных инфекций, связанной с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией в мире, наличием стойких природных очагов особо опасных инфекций на территории Российской Федерации и сопредельных государств, приоритетными направлениями деятельности учреждений КНС в 2014 г. являлись:

- решение проблемы обеспечения биологической безопасности в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)»;

- реализация отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной

заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг.;

- совершенствование эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными болезнями;

- совершенствование системы мониторинга возбудителей инфекционных и паразитарных заболеваний и ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе при проведении массовых мероприятий;

- создание отвечающих современным требованиям средств диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней в соответствии с «Сетевым графиком»;

- совершенствование технологий производства диагностических, профилактических и лечебно-профилактических медицинских иммунобиологических препаратов;

- изучение экологии, микробиологии возбудителей особо опасных и других инфекционных болезней, молекулярных основ их патогенности и иммуногенности;

- научное обоснование и совершенствование нормативно-методической базы обеспечения биологической безопасности.

Решение данных проблем невозможно без фундаментальных и прикладных разработок по эпидемиологии, микробиологии и иммунологии особо опасных болезней, активной научной поддержки практической деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Участники совещания отмечают существенный вклад Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в научное и организационно-методическое обеспечение разработки профильных проблем на международном, федеральном и региональном уровнях.

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2014 г. и Планом КНС по разработке и переработке нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за особо опасными болезнями на 2014 г. специалистами учреждений Координационного научного совета разработано 26 нормативно- и информационно-методических документов федерального уровня.

Активно продолжается работа по совершенствованию стратегии и тактики эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями.

Реализуется перевод паспортизации природных очагов чумы на электронную основу (ГИС-паспортизация) – осуществлена паспортизация Прикаспийского Северо-Западного степного и Прикаспийского песчаного природных очагов чумы.

Осуществлено организационное и методическое обеспечение информатизации эпидемиологического

надзора за актуальными инфекционными болезнями на административных территориях Российской Федерации (Астраханская область, Республики Калмыкия, Дагестан) с использованием комплекса технологий ГИС, глобального позиционирования (GPS-навигации) и дистанционного зондирования земли.

Разработаны критериальная основа, методика и алгоритм количественной оценки биологической безопасности в субъекте Российской Федерации.

Систематизирована терминологическая база, отвечающая концепции широкого формата биологической безопасности.

Осуществлено информационное обеспечение многоуровневой структуры функциональных элементов мониторинга и контроля чрезвычайных ситуаций биологического (санитарно-эпидемиологического) характера, являющейся методической основой для межведомственного взаимодействия.

Разработаны предложения по формированию законодательных основ биологической безопасности.

Осуществлено научно-практическое сопровождение обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения при подготовке и проведении массовых мероприятий с международным участием, научно обоснованы структура и информационное содержание нового понятия «потенциальная эпидемическая опасность массовых мероприятий с международным участием».

Определены принципы расчета совокупных и частных эпидемиологических рисков и ранжирования административных территорий по величине эпидемиологического риска при организации массовых мероприятий с международным участием.

Продолжено совершенствование тактики применения СПЭБ Роспотребнадзора в ходе практического использования данных формирований при:

- Обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территориях Сибирского федерального округа, пострадавших от подтопления в 2014 г.

- Обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи в 2014 г.

- Обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в период проведения летней оздоровительной кампании 2014 г. в Крымском федеральном округе.

- Борьбе с эпидемией лихорадки Эбола в Гвинейской Республике в 2014 г.

Получены новые данные в области эпидемиологического надзора за актуальными инфекционными болезнями, продолжены исследования эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве, позволяющие дать целостную характеристику сибиреязвенных почвенных очагов, прогнозировать возможность их активизации.

Установлена циркуляция на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага основ-

ного подвида чумного микроба, обуславливающая значительный рост потенциальной эпидемической опасности территории очага. Установлено широкое генотипическое разнообразие штаммов возбудителя чумы в Горно-Алтайском природном очаге, образующих три отдельных кластера, которые соответствуют участкам очаговости.

Установлено в полтора раза расширение ареала монгольской пищухи в Юго-Восточном Алтае (на 770 км²) за период 1978–2013 гг. Установлены новые границы Прикаспийского Северо-Западного степного и Прикаспийского песчаного очагов чумы.

Продолжены исследования по разработке и регистрации диагностических препаратов. В 2014 г. зарегистрированы 7 новых диагностических препаратов для выявления возбудителей бруцеллеза, туляремии, холеры, сибирской язвы, сапа, мелиоидоза, кокцидиоидомикоза.

Проведены доклинические испытания живой вакцины против оспы на основе аттенуированного штамма вируса осповакцины, культуральной микрокапсулированной вакцины против оспы для перорального применения (МикроВак), клинические испытания культуральной живой вакцины против пандемического гриппа A/H1N1pdm09 (2-я фаза).

Проведены работы по стандартизации производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина за счет внедрения методик количественного определения кДНК или антигена вируса бешенства штамма «Москва 3253».

Значительная роль отводится изучению структуры геномов актуальных штаммов возбудителей особо опасных инфекций. Проведено полногеномное секвенирование 40 штаммов *Yersinia pestis* из всех природных очагов чумы в Российской Федерации и большинства очагов стран СНГ и нуклеотидных последовательностей 6 штаммов возбудителя холеры, изолированных в Российской Федерации. Определены геноварианты штаммов *Y. pestis* из этих очагов. Внесены предложения по изменению существующей подвидовой систематики возбудителя чумы. Представлена динамика изменения молекулярно-генетических свойств штаммов геновариантов, необходимая для прогнозирования дальнейшего направления микроэволюции *Vibrio cholerae*. Проведено экспериментальное моделирование образования геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в процессе конъюгации.

Усовершенствованы системы молекулярной идентификации и алгоритм типирования возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, сапа, мелиоидоза, гистоплазмоза с применением высокоразрешающих технологий.

Изучен видовой состав и численность доминирующих членов почвенных биоценозов природных очагов чумы Прикаспия – простейших и нематод.

Проведен комплексный анализ иммунобиологических свойств поверхностных структур возбудителей особо опасных инфекций в условиях *in vivo* и

in vitro, в том числе на фоне применения иммуномодуляторов как основы для совершенствования схем специфической, экстренной иммунопрофилактики и лечения опасных инфекций.

Усовершенствованы методы получения и изучения поверхностных антигенов, в том числе с применением достижений нанотехнологии. Сформированы панели сывороток для последующего поиска иммунодоминантных антигенов возбудителей сибирской язвы и туляремии.

Проведена оценка динамики заболеваемости холерой в мире с использованием проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире». Полученные данные свидетельствуют о продолжающемся пандемическом распространении инфекции. Разработана ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 г. по 2014 г.».

Проведен ретроспективный и оперативный анализ эпидемических проявлений холеры в России с учетом типов административных территорий и оценкой показателей и данных, характеризующих интенсивность и другие параметры эпидемического процесса.

Изучены эколого-эпидемиологические и молекулярно-биологические закономерности проявления седьмой пандемии холеры в Сибири и на Дальнем Востоке.

Исследована распространенность интегративных конъюгативных элементов, несущих гены антибиотикорезистентности, в штаммах *V. cholerae* O1, выделенных в различных регионах РФ в 2009–2012 гг. Сформирован базовый набор характеристик MALDI-TOF MS профилей антибиотикоустойчивых штаммов.

Изучено действие имунофана на формирование поствакцинального иммунитета и выявлено его влияние на течение и исход инфекционного процесса у животных. Рекомендовано его использование для профилактики поствакцинального иммунодефицита и снижения степени выраженности инфекционного процесса при экспериментальной холере.

Продолжены работы, направленные на решение проблем обеспечения биобезопасности. Разработаны проекты методических указаний «Методы оценки эффективности фильтров вентиляционных систем и боксов микробиологической безопасности учреждений медико-биологического профиля, осуществляющих деятельность с использованием ПБА» и методических рекомендаций «Анализ аварийности при работе с патогенными биологическими агентами», «Подготовка культур возбудителей особо опасных микозов для исследования масс-спектрометрическим методом».

На заседаниях пленума Координационного научного совета рассмотрены материалы о выполнении плана научно-исследовательских работ и внедрения

результатов исследований в практику, а также документы на планируемые научные темы и план внедрения результатов НИР на 2015 г.

В рамках КНС в 2014 г. выполнялось 127 отраслевых тем. Завершено в 2014 г. 27 НИР, выполняемых по отраслевым заданиям, в том числе по проблемным комиссиям КНС: ПК 48.01 – 5, ПК 48.02 – 4, ПК 48.03 – 2, ПК 48.04 – 7, ПК 48.05 – 9. Все информационные карты на завершённые темы рекомендованы к утверждению.

Для внедрения в практику здравоохранения в 2014 г. разработано 235 наименований научной продукции. По результатам НИР в Роспатенте зарегистрировано 20 патентов, оформлено 28 заявок на изобретения.

На заседаниях проблемных комиссий КНС рассмотрено 18 регистрационных карт на темы, планируемые к исполнению с 2015 г. По ПК 48.01 – 2, рекомендовано включить в план – 2, ПК 48.02 – 4, рекомендовано включить в план – 4; ПК 48.03 – 2, рекомендовано – 2; ПК 48.04 – 5, рекомендовано – 5; ПК 48.05 – 5, рекомендовано – 5. Всего в план НИР на 2015 г. рекомендовано включить 17 тем. Планируемые НИР являются актуальными, отличаются научной новизной и современным методическим уровнем. По тематике КНС в 2015 г. будет выполняться 117 тем.

Для включения в план внедрения результатов НИР в практику в 2015 г. на федеральном, региональном и учрежденческом уровнях представлено 132 предложения, которые прошли экспертную оценку, скорректированы и приняты к исполнению.

Совещание отмечает, что все выполняемые в рамках координирующей деятельности совета научно-исследовательские работы соответствуют направлениям, обозначенным в утвержденном Президентом России концептуальном документе «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» (от 04.12.2003 г., № Пр-2194), решениям саммита «Группы восьми» (Санкт-Петербург, 15–17 июля 2006 г.), направленным на борьбу с инфекционными болезнями.

На основании результатов рассмотрения представленных материалов, **совещание решило:**

1. Приоритетными задачами деятельности учреждений КНС считать следующие:

- модернизация и совершенствование системы эпидемиологического надзора за опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями, путем расширения спектра инфекционных болезней (природно-очаговые вирусные, риккетсиозные) и внедрения современных информационных технологий;

- оптимизация функций референс-центров за счет повышения оперативности взаимодействия с территориями и обеспечения функции полноценного

прогнозирования по профилю своей деятельности в рамках трехуровневой системы лабораторной диагностики инфекционных болезней;

- совершенствование функционирования СПЭБ на основе оптимизации структуры и внедрения передовых диагностических технологий с учетом практического опыта работы, полученного при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения при ЧС природного характера, массовых мероприятиях с международным участием, а также при ликвидации эпидемических последствий БВВЭ (Гвинейская республика, 2014 г.);

- научное обеспечение совершенствования системы биологической безопасности на основе оптимизации нормативно-правовой базы в области биологической безопасности в РФ и усиления экспертных функций ПЧУ в области практического обеспечения контроля за биологической безопасностью на курируемых территориях;

- оптимизация производства МИБП за счет внедрения требований GMP, совершенствования биотехнологии производства, снижения экономических издержек и повышения потребительских качеств препаратов, форсирования научных исследований, направленных на разработку новых профилактических препаратов, освоение производства туляремийной и сибиреязвенной вакцин;

- совершенствование нормативно-методической базы, регулирующей коллекционную деятельность, создание национального банка данных молекулярно-генетических портретов возбудителей ООИ и других инфекционных болезней;

- оптимизация научной деятельности за счет усиления взаимодействия НИО с практическими организациями Роспотребнадзора и совершенствования экспертной функции при оценке планируемых НИР и их индикаторных показателей.

2. С учетом проведенной модернизации и укрепления материально-технической базы сети противочумных учреждений и ведущих научных центров ГНЦ ПМБ, ГНЦ ВБ «Вектор» и вышеизложенных задач необходима дальнейшая оптимизация организационной структуры учреждений по основной деятельности и обеспечивающей ее инфраструктуры (биологическая и физическая безопасность учреждения, усиление инженерно-технической службы).

3. Продолжить изучение эволюционных преобразований эпизоотического и эпидемического процессов, биоценотической структуры, эпизоотической и эпидемической активности природных очагов чумы и дальнейшее совершенствование тактики эпидемиологического надзора, включая эпизоотологический мониторинг чумы, другими природно-очаговыми инфекционными болезнями на основе ГИС-паспортизации.

4. Обеспечить совершенствование эпидемиологического надзора за холерой путем районирования территорий Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры на основе новых

критериев дифференциации территорий с учетом результатов мониторинговых исследований и рекомендаций учреждений Роспотребнадзора.

5. Продолжить исследования:

- по анализу полногеномных последовательностей и участков геномов возбудителей особо опасных и других инфекций для выявления молекулярных основ их патогенеза, механизмов сохранения во внешней среде, выявления вариабельных участков, перспективных для проведения молекулярной идентификации патогенов;

- по изучению экологии возбудителей особо опасных инфекций, выявлению природных резервуаров инфекций;

- по исследованию молекулярных механизмов взаимодействия возбудителей особо опасных и других инфекционных болезней с системами врожденного и адаптивного иммунитета хозяина в целях уточнения роли экзо- и эндогенных факторов в регуляции антиинфекционной резистентности макроорганизма.

6. Одобрить проект «Сетевого графика разработки и внедрения в практику диагностических препаратов для лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней на 2015–2018 гг.» и направить его в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека для утверждения. Считать приоритетным разработку в 2015 г. диагностических препаратов, питательных сред и других расходных материалов в рамках импортозамещения, а также тест-систем для выявления антител к вирусам денге (субтипов 1–4), вирусу желтой лихорадки, возбудителю сибирской язвы.

7. Поручить ФБУН ГНЦ ПМБ во взаимодействии с Референс-центрами Роспотребнадзора разработать в 2015 г. панель образцов для проведения внешнего контроля качества индикации ООИ бактериальной природы.

8. Поручить ФБУН ГНЦ ПМБ и ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»:

8.1. Разработать стандартные панели тест-штаммов, использующихся при испытании качества питательных сред и диагностических препаратов для выявления возбудителей ООИ.

8.2. Подготовить предложения по вопросам производства вакцинных препаратов.

9. Разработать алгоритм поддержания, сохранности и аттестации вирулентных тест-штаммов, использующихся при испытании иммуногенности живых вакцин и вакцинных штаммов против ООИ.

10. Продолжить совершенствование информационно-аналитического обеспечения по актуальным вопросам санитарной охраны территории и биологической безопасности.

11. Обеспечить подготовку кадров специалистов, допускаемых к работе с ПБА I–IV групп на основе новой методологии обучения с применением технологий, направленных на снижение рисков при подготовке персонала, а также инженерно-технических кадров по вопросам обеспечения биологической безопасности.

12. Одобрить проект предложений, внесенных учреждениями КНС, для включения в План основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2015 г. и направить в Роспотребнадзор.

13. Одобрить отчет о ходе выполнения плана работы Координационного научного совета в 2014 г.

14. Одобрить итоги выполнения плана НИР на 2014 г. и рекомендовать представленные ИК по завершенным на 2014 г. темам к утверждению.

15. Утвердить план НИР на 2015 г., включающий 117 тем, из них 18 вновь планируемые. Включить 132 предложения в план внедрения результатов НИР в практику здравоохранения на 2015 г. Считать выполнение плана КНС обязательным.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

При направлении статьи в редакцию журнала «Проблемы особо опасных инфекций» следует соблюдать следующие правила:

1. Присылать один распечатанный экземпляр статьи и электронную копию на компакт-диске или по электронной почте. Каждая статья должна иметь направление от учреждения, в котором она выполнена, экспертное заключение и лицензионный договор о предоставлении права использования произведения.

2. Размер статей (включая таблицы, рисунки, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 8 стр. (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, межстрочный интервал 1,5, поля 2 см), обзоров – 12–14 стр., кратких сообщений – 4 стр. Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: материалы и методы, результаты и обсуждение. К оригинальным, проблемным статьям, обзорам и кратким сообщениям должны прилагаться резюме и ключевые слова. Резюме и ключевые слова должны быть на русском и английском языках.

4. Резюме должно отражать основное содержание статьи (не менее 100 и не более 250 слов). Для оригинальных статей резюме должно быть структурированным. В нем должны быть отражены цели, материалы и методы и выводы. Использование сокращений и условных обозначений в резюме не рекомендуется.

5. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, названия учреждений – мест работы всех авторов, их должности и контактная информация (почтовый адрес с указанием индекса, телефон, адрес электронной почты). Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием фамилии, имени и отчества (полностью).

6. Количество иллюстраций не должно превышать 3 (либо 3 рис., либо 3 табл., либо 3 в совокупности).

7. Место расположения таблиц и рисунков в тексте отмечать ссылками на полях (только в распечатанных экземплярах).

8. Таблицы не должны дублировать графики, должны иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Числа в таблицах должны быть статистически обработаны. Цифровой материал из таблиц не должен повторяться в тексте статьи.

9. Рисунки должны быть четкими. Количество обозначений должно быть сведено к минимуму. Все объяснения следует давать в подрисуночной подписи.

10. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом («Руководство по систематике бактерий Берги», 9 изд.). Первый раз название микроорганизма пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род – только одной прописной буквой, вид – полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

11. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых сокращений, мер физических и математических величин и терминов) допускается только с первоначальным указанием полного названия.

12. Математические формулы должны быть тщательно выверены.

13. В списке литературы (в оригинальных статьях – не более 15 источников, проблемных и обзоров – не более

50, кратких сообщениях – не более 5–8) приводятся работы отечественных и зарубежных авторов за последние 10 лет и печатаются в алфавитном порядке (сначала русские авторы, потом – иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка (в квадратных скобках), а не на фамилию и годы.

В списке литературы приводятся авторы работы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>). Для книг и патентов давать точное название.

Например, *статьи в журналах*:

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N. Engl. J. Med. 2002; 347(4):284–7.

Необходимо перечислить всех авторов статьи.

Книги и другие монографии

Физические лица в качестве авторов:

Martin E.W. Hazards of medication. 2nd ed. Ruskin A., Napke E., Alexander S., Kelsey F.O., Farage D.J., Mills D.H., Elkas R.W., editors. Philadelphia: Lippincott; 1978. 686 p.

Редакторы, составители в качестве авторов:

Celli L., editor. The elbow: traumatic lesions. Warr A., translator. Vienna (Austria): Springer-Verlag; 1991. 203 p.

Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Не допускаются ссылки на издания, недоступные для большинства читателей. К ним относятся приказы, распоряжения, ведомственные издания и инструкции, ГОСТы, ТУ, тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов, авторефераты докторских и кандидатских диссертаций и неопубликованные работы.

14. Фамилии иностранных авторов при упоминании в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

15. Требования к электронным вариантам статей: файлы с текстом и подрисуночными подписями должны быть в формате DOC (редактор Microsoft Word) или RTF; рисунки и фотографии – в отдельных файлах в формате TIFF (разрешение – 300 пикс/дюйм); диаграммы и графики должны быть выполнены в программе Excel (в отдельных файлах в формате xls). Рисунки, фотографии, диаграммы и графики не вставлять в текст в программе Microsoft Word.

16. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

17. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять, а также публиковать их в виде кратких сообщений (4–5 стр. текста с резюме и литературой без рисунков и таблиц). Вся работа проводится по авторскому оригиналу. После сокращения работа направляется на согласование автору.

18. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование.

19. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

20. Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

410005, Саратов, Университетская, 46.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».

Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12.

E-mail: jour@microbe.ru

ЗАО «ЛАМИНАРНЫЕ СИСТЕМЫ»

TÜV: КУПИТЬ НЕЛЬЗЯ, СООТВЕТСТВОВАТЬ!

Бокс микробиологической безопасности II класса типа A2 производства ЗАО «Ламинарные системы» **прошел сертификационные испытания** на соответствие европейскому стандарту EN 12469:2000 в центре TÜV NORD (Гамбург, Германия), что подтверждено сертификатом № 44 330 13085601. Проверить подлинность сертификата можно на странице официального сайта центра <http://www.tuv-nord.com/en/safety/biotechnological-safety-1478.htm>, открыв документ [List of certified safety cabinets](#).

На сегодняшний день ЗАО «Ламинарные системы» – **единственный российский производитель** боксов микробиологической безопасности, **получивший подобный сертификат**.

Сертификат TÜV имеет высшую степень доверия немецких и европейских потребителей. Продать что-либо на рынке Западной Европы без TÜV практически невозможно. Это обусловлено тем, что сертификат нельзя купить – немецкие региональные союзы TÜV очень щепетильно относятся к своей репутации.

Процедура получения сертификата на бокс микробиологической безопасности II класса состояла из нескольких этапов. Сначала были определены директива и стандарты, по которым в дальнейшем проводилось тестирование бокса. На следующем этапе экспертами центра оценивалась техническая документация, а также проверялось наличие сертификатов на все материалы и комплектующие, используемые при производстве данного бокса. В результате этой проверки предприятию пришлось сменить нескольких поставщиков, продукция которых либо не прошла испытания, либо не имела соответствующих сертификатов. На третьем этапе предприятие ЗАО «Ламинарные системы» с инспекционным визитом посетили эксперты центра. Их задачей было убедиться, что оснащение производственной базы, квалификация персонала и система менеджмента качества предприятия позволяют производить серийное оборудование того же уровня, что и представленный для тестирования образец.

Далее были проведены испытания бокса в лаборатории сертификационного центра в Гамбурге. В первую очередь проверялась защитная эффективность бокса, а также материалы конструкции, качество покрытия, срабатывание визуально-звуковой сигнализации, герметичность корпуса, уровни шума, освещения и вибрации, приспособленность к очистке и дезинфекции и т.п. Бокс успешно прошел все испытания, подтвердив, что не уступает мировым аналогам ни по качеству, ни по материалам, а по конструктивному исполнению имеет даже ряд преимуществ. Например, выдвижной блок УФО, который на испытаниях подтвердил абсолютное соответствие требованиям стандарта EN 12469:2000, получил высокую оценку европейских экспертов за оригинальность, безопасность и надежность конструкции. А визуально-звуковая сигнализация, предупреждающая оператора о снижении защитных свойств бокса в результате случайного перекрытия отверстий передней перфорации столешницы, не имеет аналогов и не реализована пока ни у одного производителя в мире. Подробнее об особенностях и преимуществах конструкции бокса можно прочитать на сайте www.bmb221.ru.

В общей сложности процесс получения европейского сертификата длился 5 лет, начиная с предварительного аудита, проведенного специалистами немецкого центра сертификации в 2009 г., и заканчивая собственно получением сертификата в июне 2014. За это время конструкция бокса претерпела ряд существенных изменений в соответствии с требованиями европейского стандарта EN 12469:2000, и в настоящее время бокс микробиологической безопасности II класса типа A2 марки LAMSYSTEMS **полностью соответствует европейскому стандарту безопасности**.

Бесценный опыт, полученный специалистами ЗАО «Ламинарные системы» в процессе сотрудничества с европейскими экспертами, позволил по-новому взглянуть на некоторые аспекты производства всего серийного оборудования и пересмотреть подходы к созданию новых образцов продукции. Без ложной скромности можно сказать, что проделана огромная работа усилиями многих специалистов предприятия, чья квалификация и профессионализм позволили достичь по-настоящему впечатляющего результата.

www.lamsys.ru
sale@lamsys.ru
8 (3513) 544-744