

## Содержание выпуска

2015, 2

### [Количественная оценка потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием и ее апробация в условиях Универсиады-2013](#)

Онищенко Г.Г., Пяташина М.А., Удовиченко С.К., Топорков А.В., Куклев Е.В., Топорков В.П., Кутырев В.В.

Страницы: 5-8

## Эпидемиология

### [Оценка влияния мер противодействия на последствия локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций: изоляция](#)

Бачинский А.Г., Низолenco Л.Ф.

Страницы: 9-12

### [Организация работы и порядок лабораторной диагностики инфекционных болезней во время проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года](#)

Брагина И.В., Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Кузнецова И.В., Манин Е.А., Лямкин Г.И., Кутырев В.В., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Пархоменко В.В., Щербина Л.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Оробей В.Г., Завора Д.Л., Брюханов А.Ф., Елдинова В.Е., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Дерлятко С.К.

Страницы: 13-16

### [Результаты работы СПЭБ ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи](#)

Кузькин Б.П., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Ефременко Д.В., Манин Е.А., Котенев Е.С., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Дикова С.П., Лисицкая Я.В., Волынкина А.С., Пономаренко Д.Г., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Клиндухов В.П., Оробей В.Г., Кутырев В.В., Казакова Е.С., Куклев В.Е., Дятлов И.А., Карцев Н.Н.

Страницы: 17-21

### [Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г.](#)

Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н.

Страницы: 22-24

[Связь эпизоотической активности природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом и эпидемиологической ситуации в Ульяновской области](#)

Нафеев А.А., Вовкотеч П.Г., Хайсарова А.Н.

Страницы: 25-27

[О вспышке туляремии среди населения Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района в 2013 г.](#)

Остапенко Н.А., Соловьева М.Г., Казачинин А.А., Козлова И.И., Файзуллина Н.М., Ежлова Е.Б.

Страницы: 28-32

[Эпизоотическая ситуация в Крымском федеральном округе по результатам обследования в 2014 г.](#)

Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Шапошникова Л.И., Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Котенёв Е.С., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Самарина И.В., Белова О.А., Цапко Н.В., Ашибокров У.М., Агапитов Д.С., Самодед Т.Н., Куличенко А.Н.

Страницы: 33-36

[Организация и проведение эпизоотологического обследования в условиях массовых мероприятий \(на примере XXVII Всемирной летней универсиады 2013 г. в Казани\)](#)

Чекашов В.Н., Пяташина М.А., Яковлев С.А., Красовская Т.Ю., Шилов М.М., Захаров К.С., Шарова И.Н., Попов Н.В., Зиятдинов В.Б., Садреева Л.Ф., Гайнуллин А.А., Сайфуллина Г.Ш.

Страницы: 37-40

[Санитарная охрана территории в структуре обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения](#)

Шиянова А.Е., Топорков В.П., Ляпин М.Н., Карнауков И.Г.

Страницы: 41-45

## **Микробиология**

[Изучение состава клеточных антигенов патогенных буркхольдерий с использованием иммуноблоттинга](#)

Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И.

Страницы: 46-49

[Организация обследования и выявление возбудителя легионеллеза в объектах окружающей среды в период подготовки и проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи](#)

Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Портенко С.А., Гуськов А.С., Почтарева Е.С., Савельева И.В., Волынкина А.С., Савельев В.Н., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А., Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И., Щербина Л.И., Погудина О.А.

Страницы: 50-53

[Разработка амплификационных тест-систем для выявления возбудителя туляремии](#)

Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А.

Страницы: 54-57

[Характеристика штаммов туляремийного микроба, выделенных от больных людей и мелких грызунов во время эпидемии туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г.](#)

Павлов В.М., Козлова И.И., Мокриевич А.Н., Шутко О.Д., Тимофеев В.С., Миронова Р.И., Кузнецова Т.С., Файзуллина Н.М., Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Дятлов И.А.

Страницы: 58-62

[Особенности структуры генома токсигенного штамма \*Vibrio cholerae\* El Tor Инаба, выделенного в 2014 г. из открытого водоема в Ростове-на-Дону](#)

Писанов Р.В., Ежова М.И., Монахова Е.В., Черкасов А.В., Краснов Я.М., Водопьянов А.С., Кульшань Т.А., Ливанова Л.Ф., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Кругликов В.Д., Титова С.В.

Страницы: 63-67

[Новый коронавирус, вызывающий заболевание человека](#)

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

Страницы: 68-74

**Биотехнология, иммунология**

Ядрышковый аппарат лимфоцитов как индикатор функциональной активности лимфоидных органов при доклинической оценке вакцин

Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Курылина А.Ф.

Страницы: 75-78

Новый эффективный способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней

Захарова Т.Л., Михеева Е.А., Осина Н.А.

Страницы: 79-82

Оценка функциональной активности специфического противохолерного энтеросорбента

Овчинникова М.В., Исляева М.Н., Николаев В.Г., Бардахивская К.И., Никифоров А.К.

Страницы: 83-86

Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения

Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П.

Страницы: 87-91

Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя туляремии

Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Крупин В.В., Богачева Н.В., Кытманов А.А., Еремкин А.В., Тихвинская О.В., Вахнов Е.Ю.

Страницы: 92-94

Г.Г.Онищенко<sup>1</sup>, М.А.Патяшина<sup>2</sup>, С.К.Удовиченко<sup>3</sup>, А.В.Топорков<sup>4</sup>, Е.В.Куклев<sup>3</sup>, В.П.Топорков<sup>3</sup>,  
В.В.Кутырев<sup>3</sup>

## КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ И ЕЕ АПРОБАЦИЯ В УСЛОВИЯХ УНИВЕРСИАДЫ-2013

<sup>1</sup>Российская академия наук, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, Казань, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

В статье представлена методика количественной оценки потенциальной эпидемической опасности массового мероприятия с международным участием по актуальным инфекционным болезням, способным в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) вызвать чрезвычайную ситуацию санитарно-эпидемиологического характера. Установлено, что потенциальная эпидемическая опасность представляет собой совокупную величину риска заноса инфекционной болезни прибывающими участниками и гостями и риска ее распространения в месте проведения массового мероприятия. При дифференциации уровня потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием определены четыре градации степени эпидемиологического риска: высокий, средний, низкий и минимальный. Рассчитан уровень потенциальной эпидемической опасности XXVI Всемирной летней универсиады 2013 г. в Казани на модели такой опасной инфекционной болезни, как холера.

**Ключевые слова:** количественная оценка потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием, риски заноса и распространения инфекционной болезни, чрезвычайная ситуация санитарно-эпидемиологического характера международного значения.

G.G.Onishchenko<sup>1</sup>, M.A.Patyashina<sup>2</sup>, S.K.Udovichenko<sup>3</sup>, A.V.Toporkov<sup>4</sup>, E.V.Kouklev<sup>3</sup>, V.P.Toporkov<sup>3</sup>,  
V.V.Kutyrev<sup>3</sup>

## Quantitative Assessment of Potential Epidemic Hazard of Mass Events with International Participation and Methodology Approbation in the Context of Universiade-2013

<sup>1</sup>Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation; <sup>3</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>4</sup>Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Put forward is a methodology for quantitative assessment of potential epidemic hazard (PEH) as regards mass events with international participation in terms of the relevant infectious diseases capable of (in compliance with IHR, 2005) inducing emergency situation of sanitary epidemiological character. It is established that PEH is an aggregate risk of infection importation by incoming contestants and visitors and of its dissemination across the mass even location. As a result of PEH level differentiation identified have been four following grades: high, medium, low and minimum. Calculated has been a rate of PEH for the XXVI Worldwide Summer Universiade in Kazan, 2013, exemplified by such infectious disease as cholera.

**Key words:** quantitative assessment of potential epidemic hazard of mass events with international participation, risk of importation and dissemination of infectious disease, emergency situation of sanitary-epidemiological character of international concern.

Ранее нами было сформулировано понятие «потенциальная эпидемическая опасность массовых мероприятий с международным участием», рассмотрены два структурно-функциональных уровня его информационного содержания и представлена методика комплексной оценки эпидемиологического риска по таким критериям как «территория риска», «факторы риска», «время риска» и «контингенты риска» (качественные признаки) [7] в отношении инфекционных болезней, ассоциированных с ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения. Заблаговременная оценка эпидемиологических рисков при подготовке к массовым мероприятиям (ММ) позволит определить приоритетные направления, рассчитать силы, средства, организационный ресурс, методологический и технологический арсенал местной инфраструктуры здравоохранения и мобильных формирований с учетом наиболее ве-

роятных эпидемических угроз при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия и биологической безопасности при организации массовых мероприятий с международным участием.

Целью данного сообщения была разработка методики количественной оценки потенциальной эпидемической опасности ММ с международным участием в рамках второго уровня информационного содержания.

### Материалы и методы

Количественная оценка потенциальной эпидемической опасности (ПЭО) проводилась в соответствии с методическими рекомендациями «Организация санитарно-противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий с международным участием» (МР 3.1.0079/2-13) [4] и по разработанной нами ори-

гинальной методике. Для вычисления риска заноса болезней использованы данные официальных отчетов Всемирной организации здравоохранения, расчетные данные Департамента по экономическим и социальным вопросам Организации объединенных наций о численности населения в отдельных странах за период с 2009 по 2013 год, данные Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан о численности и составе участников Универсиады-2013. Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием общепринятых методов вариационной статистики с элементами системного анализа [2, 5], пакета программ Microsoft Excel (2003), а также аналитической платформы Deductor 5.3.

### Результаты и обсуждение

Методика количественной оценки уровня ПЭО включала оценку риска заноса (PЗ) каждой отдельно взятой инфекционной болезни приезжающими участниками и гостями в место проведения ММ и оценку риска ее последующего распространения (РР).

Для оценки риска заноса был определен перечень стран, эндемичных по анализируемой инфекционной болезни. Риск заноса из каждой эндемичной страны рассчитывался в соответствии с формулой:

$$PЗ_{стр1} = Z \times K \times N, \quad (1)$$

где Z – средний интенсивный показатель многолетней заболеваемости в пересчете на 1 человека, K – коэффициент сезонности, N – количество участников ММ из конкретной страны.

Расчет среднего показателя многолетней заболеваемости (Z) инфекционной болезнью проводился по формуле:

$$Z = \frac{\sum z}{T}, \quad (2)$$

где z – заболеваемость в стране-участнице ММ по годам в пересчете на 1 человека, T – продолжительность анализируемого периода (количество лет).

Величина коэффициента сезонности варьировала от 1 до 3. Максимальная величина (3) присваивалась при совпадении периода подъема сезонной заболеваемости на эндемичной территории и времени проведения ММ. Коэффициент сезонности был равен 2, если на эндемичной территории заболеваемость не имела четко выраженной сезонности (регистрируется в течение года). Коэффициент был равен 1, если время проведения ММ не совпадало с периодом подъема сезонной заболеваемости.

Расчет показателя  $PЗ_{стр}$  позволил определить территории, из которых опасность заноса инфекционной болезни была наибольшей. Оценка общего риска заноса конкретной нозологической формы в место проведения ММ рассчитывалась по формуле:

$$PЗ = PЗ_{стр1} + PЗ_{стр2} + \dots + PЗ_{стрn}. \quad (3)$$

При подсчете риска заноса в соответствии с формулой 3 были получены дробные и малые числовые значения. Для удобства анализа мы конвертировали числовые значения к бальному эквиваленту в соответствии с выбранным диапазоном значений. Выбор диапазонов осуществлялся линейно с помощью аналитической платформы Deductor 5.3. Переход к бальной системе оценки можно объяснить и тем, что данная система оценки является общепринятой, широко используется в различных нормативно-методических документах [1].

Полученному числовому значению риска заноса в интервале от 0 до 0,01 соответствовала градация в баллах от 1 до 5, значению от 0,011 до 0,1 – от 6 до 10 баллов, от 0,11 до 1 – от 11 до 25 баллов, от 1,1 до 7 – от 26 до 50 баллов. Таким образом, максимально возможная величина риска заноса инфекционной болезни составила 50 баллов.

Оценка риска распространения инфекционной болезни в месте проведения ММ осуществлялась на основе комплекса показателей (таблица). С этой целью нами были осуществлены выбор факторов и градация их по степени эпидемиологического риска методом экспертных оценок.

В отношении ряда показателей необходимо дать пояснения. При оценке показателя «Длительность выделения возбудителя из организма больного/носителя» нами учитывалась продолжительность инкубационного периода, длительность клинического течения болезни и возможного выделения возбудителя в период реконвалесценции или формирования носительства. К инфекционным болезням с коротким периодом выделения возбудителя отнесены нозологические формы, имеющие максимальную продолжительность инкубационного периода не более 7 дней и сопровождающиеся выделением возбудителя только

Показатели, определяющие риск распространения инфекционной болезни в месте проведения ММ

Показатель	Наименование показателя	Градация показателя, их балльная оценка	MAX (балл)
A	Наличие заносов инфекционной болезни в место проведения ММ	С распространением – 8 Без распространения – 4 Нет – 0	8
B	Наличие специфических переносчиков/носителей в месте проведения ММ	Есть – 7 Нет – 0	7
C	Ведущий механизм передачи инфекционной болезни	Аспирационный – 10 Фекально-оральный – 8 Трансмиссивный – 4 Контактный – 4 Искусственный – 2	10
D	Длительность выделения возбудителя из организма больного/носителя	Длительный – 6 Средний – 3 Короткий – 1	6
E	Природно-климатические факторы, способствующие распространению инфекционной болезни при ее заносе	Есть – 8 Нет – 2	8
F	Наличие средств специфической профилактики/лечения	Есть – 1 Нет – 3	3
G	Уровень готовности медицинской и лабораторной службы	Низкий – 8 Средний – 4 Высокий – 2	8



в период клинических проявлений болезни, к средней продолжительности – с продолжительностью выделения возбудителя до 1 месяца, длительным – при сохранении выделения возбудителя в период реконвалесценции и формировании носительства.

Показатель «Уровень готовности медицинской и лабораторной службы» определялся по двум группам критериев. В первую группу входили качественные показатели, отсутствие которых в учреждении указывает на неудовлетворительную его готовность. К ним относят наличие ежегодно корректируемого Комплексного плана по санитарной охране территории, наличие и реальность оперативных планов, схем взаимодействия и оповещения, наличие необходимых материалов. Для второй группы критериев используется балльная шкала, где каждому критерию соответствует определенное количество баллов (в диапазоне от 0 до максимального значения для данного критерия), которые выводятся экспертным путем. Сумма баллов, превышающая 75 (из 100 возможных), указывает на удовлетворительную готовность проверяемого учреждения. Такой подход к оценке готовности учреждений здравоохранения нормативно закреплен в действующих в настоящее время методических указаниях МУ 3.4.1030-01 «Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения» [3].

Конечную оценку риска распространения (РР) инфекционной болезни в период проведения ММ определяли по результирующей сумме всех расчетных показателей. Максимально возможная величина РР инфекционных болезней составила 50 баллов:

$$PP = A + B + C + D + E + F + G. \quad (4)$$

Уровень ПЭО ММ с международным участием в отношении спектра актуальных инфекционных болезней определялся как сумма показателей риска заноса и риска распространения, т. е.

$$ПЭО \text{ (балл)} = PЗ + РР. \quad (5)$$

Полученные результаты исследований были статистически обработаны современными методами с использованием общепринятых методов вариационной статистики и пакета программ Microsoft Excel (2003). Исходя из максимально возможной величины ПЭО (в 100 баллов) определены четыре градации уровня потенциальной эпидемической опасности ММ с международным участием: высокий (51–100 баллов), средний (45–50 баллов), низкий (21–44 балла) и минимальный (1–20 баллов). Определение границ уровней потенциальной эпидемической опасности проводилось с учетом величины среднего квадратического отклонения  $\sigma$  (сигма) от средней ариф-

метической.

Функциональность разработанной методики продемонстрирована при подготовке и проведении XXVII Всемирной летней универсиады 2013 г. в Казани. В качестве примера приводим расчет величины потенциальной эпидемической опасности Универсиады-2013 по отношению к холере.

В Универсиаде-2013 приняло участие 11778 спортсменов из 160 стран мира, при этом эндемичной по холере является 41 территория. Для оценки риска заноса холеры нами был рассчитан средний интенсивный показатель многолетней заболеваемости в пересчете на 1 человека для каждой страны-участницы, где регистрируются эпидемические проявления инфекционной болезни за последние 5 лет (с 2009 по 2013 год). В связи с отсутствием данных о количестве и составе прибывающих гостей, рассчитывался риск заноса болезни только с участниками Универсиады-2013.

Что касается сезонного аспекта, установлено, что подъем заболеваемости на эндемичных территориях связан с сезоном муссонов/дождей. В странах Юго-Восточной Азии, Центральной и Восточной Африки этот период приходится на летние месяцы, Южной Африки – зимне-весенние. В странах Американского региона и Западной Африки вспышки инфекционной болезни часто не имели четко выраженного сезонного характера [8]. Таким образом, с учетом времени проведения Универсиады-2013 в Казани (июль) коэффициент сезонности равный 3 определен для стран Юго-Восточной Азии, Восточной и Центральной Африки, 2 – стран Американского региона и Западной Африки, 1 – Южной Африки.

Установлено, что странами, представляющими наибольшую опасность заноса холеры на ММ, являлись Гаити, Сомали, Зимбабве и Гана. Итоговый показатель риска заноса холеры составил 1,38, что в соответствии с выбранным диапазоном значений соответствовало 28 баллам.

При подсчете риска распространения холеры на территорию Республики Татарстан нами учитывались: наличие 4 эпизодов заноса болезни (с 1971 по 2014 год) в регион с возникновением вспышек (показатель А = 8 баллов), механизм передачи – фекально-оральный (показатель С = 8), длительный период выделения холерного вибриона из организма больных/носителей (показатель D = 6), наличие благоприятных условий внешней среды для роста и размножения холерного вибриона (показатель E = 8), наличие эффективных средств специфической профилактики и лечения (показатель F = 1), высокий уровень готовности медицинской и лабораторной службы Республики Татарстан к проведению противоэпидемических мероприятий в случае заноса холеры (показатель G = 2). В показателе В «Наличие специфических переносчиков/носителей в месте проведения массового мероприятия» холера как антропонозная инфекция получила оценку в 0 баллов. Критерии при оценке риска распространения были наделены различными баллами с точки зрения их эпидемиологи-

ческой значимости и подобраны таким образом, что в случае отсутствия какого-либо из указанных критериев он компенсировался за счет баллов по другим показателям. В частности, антропонозы при отсутствии показателя «Наличие специфических переносчиков/носителей в месте проведения массового мероприятия» получали большее количество баллов за счет механизма передачи.

Таким образом, риск распространения холеры в месте проведения Универсиады-2013 составил:

$$PP = 8+0+8+6+8+1+2=33.$$

Уровень ПЭО Универсиады-2013 по отношению к холере, определяемый как сумма риска заноса и распространения, был равен:

$$ПЭО_{(балл)} = 28+33=61$$

Величина ПЭО= 61 балл соответствует первой градации, т.е. уровень потенциальной эпидемической опасности Универсиады-2013 относительно холеры высокий.

Аналогичным образом была подсчитана ПЭО в отношении других инфекционных болезней, ассоциируемых с ЧС национального и международного значения. Результаты количественной оценки полностью соответствовали ранее полученным и опубликованным результатам оценки потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием в отношении актуальных инфекционных болезней по качественным признакам [6]. Высокий уровень ПЭО ММ с международным участием определен в отношении малярии, средний – лихорадки денге, низкий – желтой лихорадки, лихорадки Ласса, гриппа птиц А(Н7N9) и ближневосточного респираторного синдрома, минимальный – лихорадки Марбург и болезни, вызванной вирусом Эбола. На основе оценки ПЭО усовершенствован комплекс мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при ММ, включающий такие направления, как санитарная охрана территории, эпидемиологический надзор за природно-очаговыми и другими опасными инфекционными болезнями, противоэпидемическое обеспечение функционирования инфраструктуры ММ, что в конечном итоге обеспечило сохранение благополучной эпидемиологической обстановки во время проведения Универсиады-2013. Практические аспекты оценки ПЭО ММ с международным участием могут быть применены при подготовке к другим ММ, проведение которых запланировано на территории Российской Федерации. В перспективе предполагается усовершенствовать методический арсенал количественной оценки с охватом 1 и 2 уровней информационного содержания потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куклев Е.В., Кокушкин А.М., Кутырев В.В. Количественная оценка величины эпидемического потенциала природных очагов чумы и оптимизация эпидемиологического надзора за этой инфекцией. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2001; 5:10–3.
2. Марченко Б.И. Здоровье на популяционном уровне: статистические методы исследования. Руководство для врачей. Таганрог: Изд-во Сфинкс; 1997. 432 с.
3. Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения. МУ 3.4.1030-01. М.; 2001. 50 с.
4. Организация санитарно-противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий с международным участием. МР 3.1.0079/2-13. М.; 2013. 30 с.
5. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е изд. М.: Изд-во МГУ; 1970. 367 с.
6. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Сафронов В.А., Кедрова О.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:26–32.
7. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина; 2007. 480 с.
8. Emch M., Feldacker C., Islam M.S., Ali M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. *Int. J. Health Geogr.* 2008; 7:31.

## References

1. Kouklev E.V., Kokushkin A.M., Kutayev V.V. [Quantitative assessment of epidemiological potential of natural plague foci and optimization of epidemiological surveillance over this infection]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2001; 5:10–3.
2. Marchenko B.I. [Health Index at the National Level: Statistical Methods of Investigation. Guidelines for Medical Workers]. Taganrog: Publishing House "Sphinx"; 1997. 432 p.
3. [Management, support, and assessment of the anti-epidemic preparedness of health facilities to operate in case of emergence or importation of particularly dangerous infections, contagious viral hemorrhagic fevers, and infectious diseases of unknown etiology which pose a hazard to the population of the Russian Federation and international traffic]. MR 3.4.1030-01. M.; 2001. 50 p.
4. [Management of sanitary-antiepidemic support of mass events with international participation]. MR 3.1.0079/2-13. M.; 2013. 30 p.
5. Plokhinsky N.A. [Biometrics. 2nd Edition]. M.: Publishing House of MSU; 1970. 367 p.
6. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Safronov V.A., Kedrova O.V., Toporkov V.P., Kutayev V.V. [Evaluation of external and internal threats to sanitary-epidemiological welfare of the population in the context of mass sporting events]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2: 26–32.
7. Cherkassky B.L. [Risk in Epidemiology]. M.: "Prakticheskaya Meditsina"; 2007. 480 p.
8. Emch M., Feldacker C., Islam M.S., Ali M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns. *Int. J. Health Geogr.* 2008; 7:31.

## Authors:

- Onishchenko G.G. Russian Academy of Sciences. Moscow, Russian Federation.  
 Patyashina M.A. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan. 30, B. Krasnaya St., Kazan, 420111, Russian Federation. E-mail: org@16.rospotrebnadzor.ru  
 Udovichenko S.K., Kouklev E.V., Toporkov V.P., Kutayev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru  
 Toporkov A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

## Об авторах:

- Онищенко Г.Г. Российская академия наук. Российская Федерация, Москва.  
 Паташина М.А. Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан. Российская Федерация, 420111, Казань, ул. Б. Красная, 30. E-mail: org@16.rospotrebnadzor.ru  
 Удовиченко С.К., Куклев Е.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru  
 Топорков А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 10.03.15.



**А.Г.Бачинский, Л.Ф.Низоленко****ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МЕР ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ НА ПОСЛЕДСТВИЯ ЛОКАЛЬНЫХ ЭПИДЕМИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ИЗОЛЯЦИЯ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация*

Цель настоящей работы – показать возможности использования разрабатываемой в ГНЦ ВБ «Вектор» универсальной модели локальных, то есть развивающихся в замкнутой популяции эпидемий/высышек, при исследовании влияния различных ресурсных ограничений на скорость такой меры противодействия, как изоляция больных и контактных лиц. На основе расчетов динамики эпидемий для ряда инфекций: натуральной оспы, сибирской язвы, легочной и бубонной форм чумы, геморрагических лихорадок Эбола, Марбург, Ласса, Крымская-Конго показано, что наличие ресурсных ограничений изоляции может играть существенную роль в масштабах последствий эпидемий. Кроме того, особенно сильным оказывается влияние момента начала реализации мер противодействия, так как для трансмиссивных инфекций, наряду с изоляцией, важным фактором оказывается карантин. Модель доступна по адресу <http://vector-epimod.ru>.

*Ключевые слова:* эпидемия, математическая модель, особо опасные инфекции, изоляция.

**A.G.Bachinsky, L.F.Nizolenko****Impact Assessment of the Response Measures to Local Epidemics Induced by the Agents of Particularly Dangerous Infections: Isolation***State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation*

The paper discusses the opportunities of using universal model of local, evolving within a closed population, epidemics/outbreaks, developed at the premises of SRC VB "Vector", for investigations and assessment of the impact of various resource limitations on the countermeasure effectiveness, and in particular isolation of a patient and contact tracing and isolation. Based on the epidemic dynamics analysis for a number of infections such as smallpox, anthrax, pneumonic and bubonic plague, hemorrhagic Ebola, Marburg, Lassa, Crimean-Congo fevers, it is demonstrated that occurrence of resource limitations of isolation can have a significant impact on the scale of epidemic aftermaths. Moreover, the outset of response measures takes a severe effect, as one of the important for localization of arthropod-borne infection factors is quarantine, alongside with isolation. The computer based software model is available at <http://vector-epimod.ru>

*Key words:* epidemic, mathematical model, particularly dangerous infections, isolation.

**Материалы и методы**

В ГНЦ ВБ «Вектор» разрабатывается детерминистическая модель, предназначенная для описания массовых эпидемий острых инфекционных заболеваний, когда основными путями заражения являются как инфицирование из некоторого внешнего источника, так и контакт между людьми независимо от пола, возраста и других социально-демографических особенностей групп населения. В настоящий момент модель адаптирована к достаточно широкому кругу инфекций: натуральной оспе, сибирской язве, чуме (легочная и бубонная формы), туляремии, геморрагическим лихорадкам Эбола, Марбург, Ласса, Крымской-Конго (ККГЛ), сезонному гриппу. Подробное описание модели и данные о ее верификации опубликованы ранее [1, 2, 5].

**Результаты и обсуждение**

Как показывает опыт и как определено в нормативных документах, изоляция больных, контактных

и лиц, подозрительных на заболевание, является важной мерой противодействия. Даже для нетрансмиссивных инфекций своевременное выявление больных может приводить, например, к снижению смертности за счет лечения. Скорость изоляции зависит как от скорости выявления лиц, нуждающихся в изоляции, так и от доступности мест в госпитальных, куда могут быть изолированы эти лица. Скорость выявления этих лиц, в свою очередь, зависит от наличия медперсонала и бригад, способных оперативно производить трассировку и выявление людей, которые контактировали с больными. В случае необходимости нужно проводить так называемый «подворный обход».

Для оценки влияния изоляции на динамику эпидемий спланирован и проведен следующий числительный эксперимент. Динамика эпидемий рассчитывалась при массовом начальном инфицировании, наличии либо отсутствии таких ресурсных ограничений, как места изоляции, квалифицированный медперсонал, в том числе для поиска и изоляции/наблюдения (следовательно, и лечения)

Таблица 1

## Расчеты чисел инфицированных и умерших на 100-й день после начала эпидемии при наличии и отсутствии ресурсных ограничений по скорости изоляции

Показатель	Заболевание							
	Оспа	Чума	Туляремия	Сибирская язва	Геморрагические лихорадки			
					ККГЛ	Ласса	Марбург	Эбола
Число инфицированных при отсутствии мер противодействия	2438144 <sup>(2)</sup>	2664611 <sup>(2)</sup>	500	500	4732	2490988 <sup>(2)</sup>	3767 <sup>(2)</sup>	1509658 <sup>(2)</sup>
Число умерших при отсутствии мер противодействия	323723 <sup>(2)</sup>	2527558 <sup>(2)</sup>	134	286	1228	335731 <sup>(2)</sup>	401 <sup>(2)</sup>	316579 <sup>(2)</sup>
Число инфицированных при наличии ресурсных ограничений по всем показателям, определяющим скорость изоляции <sup>(1)</sup>	335021 <sup>(2)</sup>	2647247 <sup>(2)</sup>	500	500	680	135001 <sup>(2)</sup>	801	1161
Число умерших при наличии ресурсных ограничений по всем показателям, определяющим скорость изоляции <sup>(1)</sup>	14606 <sup>(2)</sup>	2454240 <sup>(2)</sup>	29	206	180	9045 <sup>(2)</sup>	169	863
Число инфицированных при отсутствии ресурсных ограничений по скорости изоляции	3321	3618	500	500	680	2787	798	1161
Число умерших при отсутствии ресурсных ограничений по скорости изоляции	392	3044	29	207	180	483	169	863
Число инфицированных при отсутствии ресурсных ограничений только по числу мест изоляции больных	289865 <sup>(2)</sup>	2646727 <sup>(2)</sup>	500	500	680	126446 <sup>(2)</sup>	801	1161
Число умерших при отсутствии ресурсных ограничений только по числу мест изоляции больных	12546 <sup>(2)</sup>	2453276 <sup>(2)</sup>	29	207	180	8511 <sup>(2)</sup>	169	863
Число инфицированных при отсутствии ресурсных ограничений только по числу мест изоляции контактных	68914 <sup>(2)</sup>	5627	500	500	680	56597 <sup>(2)</sup>	801	1161
Число умерших при отсутствии ресурсных ограничений только по числу мест изоляции контактных	3042 <sup>(2)</sup>	4437	29	207	180	4498 <sup>(2)</sup>	169	863
Число инфицированных при отсутствии ресурсных ограничений по наличию медперсонала и числу бригад для поиска больных и контактных	217394 <sup>(2)</sup>	2626986 <sup>(2)</sup>	500	500	680	3772	798	1161
Число умерших при отсутствии ресурсных ограничений по наличию медперсонала и числу бригад для поиска больных и контактных	9268 <sup>(2)</sup>	2417851 <sup>(2)</sup>	29	207	180	860	169	863

<sup>(1)</sup> Ресурсы при моделировании соответствуют условиям Новосибирской области.<sup>(2)</sup> Эпидемия не закончилась к 100-му дню расчетов.

больных, контактных и подозрительных на заболевание лиц.

В табл. 1 приведены результаты расчетов на 100-й день развития эпидемий. Параметры при моделировании соответствуют условиям Новосибирской области [3, 4]. Начальное число инфицированных определяется дозой возбудителя соответствующей инфицированию 500 чел. Предполагается, что внешний источник инфекции и вакцинация отсутствуют. В отличие от условий, принятых по умолчанию, ресурсные ограничения не снимаются с началом «жесткого» режима противэпидемических мероприятий (ПЭМ). Режимы ПЭМ, реализуемые в модели, подробно описаны ранее [2, 5].

Проведенные расчеты показывают (табл. 1), что, как и ожидалось, для нетрансмиссивных инфекций (туляремия и сибирская язва) зависимость от ресурсных ограничений, определяющих возможности изоляции, полностью отсутствует. Также отсутствует эта зависимость для лихорадок Крымской-Конго, Марбург и Эбола (за исключением сценариев, когда мер противодействия нет вообще). Последнее определяется относительно малыми масштабами вспышек этих инфекций, когда ресурсы Новосибирской

области не успевают исчерпаться для заданных условий расчетов. Поэтому для оценки влияния изоляции на ход эпидемий этих и других трансмиссивных инфекций были проведены специальные исследования, результаты которых излагаются ниже. Для легочной формы чумы при ограниченной изоляции эпидемия прекращается, фактически, только с исчерпанием чувствительных к инфекции лиц. Отношение числа инфицированных и умерших при наличии и отсутствии ресурсных ограничений превышает 500.

Для разных инфекций значимость различных ресурсных ограничений оказывается существенно разной. Для натуральной оспы и чумы решающим фактором оказалась изоляция контактных лиц. Однако в случае оспы важным также был дефицит медперсонала, для чумы же остальные факторы заметной роли не играли. Для лихорадки Ласса наиболее значимым оказался дефицит медперсонала, на втором месте — дефицит мест изоляции контактных.

Кроме самой возможности осуществлять изоляцию, которая может ограничиваться ресурсами, очень важным моментом является ее оперативность. Для демонстрации этого положения проведены расчеты, в которых начало реализации мер противодей-

Таблица 2

Расчеты чисел инфицированных и умерших на 100-й день после начала эпидемии для разных сроков реализации мер противодействия, включая изоляцию\*

Начало реализации ПЭМ в долях от принятого по умолчанию	Заболевание, начало ПЭМ, принятое по умолчанию					
	Оспа 20	Чума 4	Геморрагические лихорадки			
			ККГЛ 20	Ласса 16	Марбург 20	Эбола 20
0	609 114	2302 1782	509 119	703 122	530 141	603 449
0,5	1134 173	3159 2422	530 125	1052 183	579 145	1161 863
<b>1</b>	<b>5537</b> <b>708</b>	<b>5899</b> <b>4494</b>	<b>819</b> <b>192</b>	<b>3285</b> <b>568</b>	<b>887</b> <b>179</b>	<b>3181</b> <b>2367</b>
1,5	23187 3428	13085 9952	1233 341	8635 <sup>(1)</sup> 1508 <sup>(1)</sup>	1315 231	9550 7110
2	91091 <sup>(1)</sup> 12366 <sup>(1)</sup>	31073 23504	1436 420	26481 <sup>(1)</sup> 6275 <sup>(1)</sup>	1760 284	26882 20027
2,5	303154 <sup>(1)</sup> 267935 <sup>(1)</sup>	65255 <sup>(1)</sup> 49378 <sup>(1)</sup>	20265 90	63805 <sup>(1)</sup> 15168 <sup>(1)</sup>	2150 320	68855 <sup>(1)</sup> 51236 <sup>(1)</sup>
3	871263 <sup>(1)</sup> 105577 <sup>(1)</sup>	121608 <sup>(1)</sup> 92211 <sup>(1)</sup>	2380 743	165479 <sup>(1)</sup> 39560 <sup>(1)</sup>	2523 <sup>(1)</sup> 346 <sup>(1)</sup>	168223 <sup>(1)</sup> 121210 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Эпидемия не закончилась к 100-му дню расчетов.

\*Ресурсные ограничения снимаются, когда начинается «жесткий» режим ПЭМ.

Примечание: первая строка ячеек – число инфицированных, вторая строка ячеек – число умерших.

ствия варьировало от нуля (начало расчета с момента появления в популяции первых инфицированных) до момента, значение которого в три раза больше такового, принятого по умолчанию.

Такая схема принята потому, что для моделируемых инфекций очень различаются как инкубационные периоды, так и периоды «собственно болезни». Моменты реализации ПЭМ, принятые по умолчанию для каждой инфекции, определены, исходя из комплексного анализа многих данных литературы.

Итак, схема расчета та же самая, что была раньше, но присутствующие ресурсные ограничения снимаются, когда начинается «жесткий» режим ПЭМ, что предполагает мобилизацию недостающих ресурсов из других регионов. Оценки последствий эпидемий приведены в табл. 2.

Расчеты показывают, что для всех без исключения инфекций моменты начала реализации мер противодействия очень важны. Конечно, запаздывание с реализацией ПЭМ в два месяца маловероятно. Однако, даже «естественное» запаздывание, принятое по умолчанию, приводит к увеличению числа инфицированных и умерших от примерно двукратного для чумы, лихорадок Крымской-Конго и Марбург до пятикратного для лихорадок Ласса и Эбола и без малого в 10 раз для натуральной оспы.

Еще один фактор изоляции – ее скорость в отсутствие ресурсных ограничений. В модели приняты достаточно высокие скорости изоляции контактных и больных. Например, доля больных тяжелой формой натуральной оспы в стадии сыпи, изолируемых ежедневно при 1, 2, 3 уровнях ПЭМ [2] составляет 40, 60, 80 % соответственно. Для оценки влияния скорости изоляции на последствия эпидемий проведены расчеты динамики эпидемий чумы и натуральной оспы в отсутствие ресурсных ограничений для разных уровней скорости изоляции больных и контактных по отдельности: 0, 50, 80, 100 и 120 % от значений,

принятых по умолчанию. Массовая вакцинация, как и ранее, отсутствовала. При этом все значения скорости изоляции (больных в стадии продромы или «активной стадии», тяжелая и легкая формы болезни для разных уровней ПЭМ) изменялись одновременно. Результаты расчетов представлены в табл. 3.

Оказалось, что зависимость последствий эпидемий от скорости изоляции больных и контактных относительно слабая. Исключение составляет полное отсутствие изоляции больных или контактных. Дело, видимо, в том, что есть еще один фактор, влияющий на динамику эпидемий, а именно – карантин. Его интенсивность полагается равной 50 % для натуральной оспы и 60 % для чумы. А это значит, что скорость передачи инфекции сокращается на 50 и 60 % соответственно. Для чумы это означает, что среднее число инфицируемых от одного больного, даже в отсутствие других ПЭМ, становится меньше единицы. Этот эффект наступает для чумы (при запаздывании

Таблица 3

Расчеты чисел инфицированных и умерших на 100-й день после начала эпидемии для разных уровней скорости изоляции больных и контактных в отсутствие ресурсных ограничений

Уровни скорости изоляции по отношению к принятым по умолчанию, %	Заболевание			
	Натуральная оспа		Чума	
	Изоляция больных	Изоляция контактных	Изоляция больных	Изоляция контактных
0	12033 <sup>(1)</sup> 1339 <sup>(1)</sup>	9944 <sup>(1)</sup> 1784 <sup>(1)</sup>	22276 <sup>(1)</sup> 17330 <sup>(1)</sup>	1910117 <sup>(1)</sup> 1388154 <sup>(1)</sup>
50	6540 <sup>(1)</sup> 774 <sup>(1)</sup>	5469 725	9186 7283	8795 6938
80	5450 650	5150 638	5642 4432	5377 4195
<b>100</b>	<b>5023</b> <b>605</b>	<b>6418</b> <b>761</b>	<b>4447</b> <b>3478</b>	<b>4447</b> <b>3478</b>
120	4698 572	6283 730	3661 2853	3865 3047

<sup>(1)</sup> Эпидемия не закончилась к 100-му дню расчетов.

Примечание: первая строка ячеек – число инфицированных, вторая строка ячеек – число умерших.

момента реализации ПЭМ в 4 дня), примерно на 10-е сутки, и эпидемия постепенно затухает.

Таким образом, проведенные расчеты дают возможность оценить влияние роли изоляции на последствия эпидемий. Показано, что важными факторами являются наличие ресурсных ограничений, время реализации и скорость изоляции больных и контактных лиц. При этом для разных инфекций важными могут оказаться разные ресурсные ограничения. За исключением чумы и натуральной оспы ресурсов Новосибирской области оказывается практически достаточно, чтобы эффективно погасить эпидемии, вызываемые инфекциями, для которых проводились расчеты. Естественно, все выводы о достаточности/недостаточности ресурсов справедливы только в рамках, предлагаемых по умолчанию, наборов параметров. Специалист эпидемиолог имеет возможность изменять эти параметры для интересующих его возбудителей сообразно своим представлениям об их эпидемиологии, патогенезе, профилактике и лечении. Получаемые таким образом результаты могут позволить более рационально планировать противоэпидемические мероприятия. Поскольку модель доступна в сети Интернет, любой специалист в области эпидемиологии, но не имеющий опыта моделирования эпидемий, может провести такие же расчеты и оценить влияние других факторов на динамику моделируемых эпидемий.

Работа частично поддержана из средств ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

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

## 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/document/> (дата обращения 30.10.2013).
4. Окончательные итоги Всероссийской переписи населения 2010 года. URL: [http://www.perepis-2010.ru/results\\_of\\_the\\_census/results-inform.php](http://www.perepis-2010.ru/results_of_the_census/results-inform.php) (дата обращения 30.10.2013).
5. Bachinsky A.G., Nizolenko L.Ph. A Universal Model for Predicting Dynamics of the Epidemics Caused by Special Pathogens. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013:467078. DOI: 10.1155/2013/467078.

## References

1. Bachinsky A.G. [Mathematical model of local smallpox epidemic with due regard of counter-measures 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 epidemic 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 Oct 2013). Available from: <http://54.rosпотребнадзор.ru/document/>.
4. [Final Results of the National Population Census, 2010] (cited: 30 Oct 2013). Available from: [http://www.perepis-2010.ru/results\\_of\\_the\\_census/results-inform.php](http://www.perepis-2010.ru/results_of_the_census/results-inform.php).
5. Bachinsky A.G., Nizolenko L.Ph. A Universal Model for Predicting Dynamics of the Epidemics Caused by Special Pathogens. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013:467078. DOI: 10.1155/2013/467078.

## Authors:

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

## Об авторах:

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

Поступила 03.03.14.



И.В.Брагина<sup>1</sup>, Б.П.Кузькин<sup>1</sup>, Е.Б.Ежлова<sup>1</sup>, Ю.В.Демина<sup>1</sup>, А.Н.Куличенко<sup>2</sup>, Д.В.Ефременко<sup>2</sup>,  
О.В.Малецкая<sup>2</sup>, И.В.Кузнецова<sup>2</sup>, Е.А.Манин<sup>2</sup>, Г.И.Лямкин<sup>2</sup>, В.В.Кутырев<sup>3</sup>, С.А.Портенко<sup>3</sup>,  
Т.Ю.Красовская<sup>3</sup>, В.В.Пархоменко<sup>4</sup>, Л.И.Щербина<sup>4</sup>, В.П.Клиндухов<sup>5</sup>, Т.В.Гречаная<sup>5</sup>, С.Ч.Тешева<sup>5</sup>,  
В.Г.Оробей<sup>6</sup>, Д.Л.Завора<sup>7</sup>, А.Ф.Брюханов<sup>7</sup>, В.Е.Елдинова<sup>8</sup>, Ю.В.Юничева<sup>8</sup>, О.М.Пиликова<sup>8</sup>,  
С.К.Дерлятко<sup>8</sup>

## ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ И ПОРЯДОК ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ XXII ОЛИМПИЙСКИХ И XI ПАРАЛИМПИЙСКИХ ЗИМНИХ ИГР 2014 ГОДА

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Краснодар, Российская Федерация; <sup>5</sup>Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар, Российская Федерация; <sup>6</sup>Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи, Сочи, Российская Федерация; <sup>7</sup>ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Сочи, Российская Федерация; <sup>8</sup>ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Новороссийск, Российская Федерация

В статье анализируется система организации лабораторной диагностики инфекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи. Рассматривается выполненная работа в предолимпийский период по подготовке лабораторных баз, участвующих в исследовании клинического материала, разработке нормативно-методической базы, ориентированной на особенности ситуации, определению диагностической мощности лабораторий, прогнозированию возможного объема лабораторных исследований по различным группам инфекционных болезней. Представлен порядок организации работы на различных этапах лабораторной диагностики, взаимодействия и реагирования в случае возникновения чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия. Рассматривается роль ГИС и текущего мониторинга эпидемиологической ситуации в странах-участниках и регионе проведения Олимпийских игр в организации лабораторного обеспечения.

**Ключевые слова:** Олимпийские игры, инфекционные болезни, мониторинг инфекционных болезней, лабораторная диагностика, специфическая индикация микроорганизмов, полимеразная цепная реакция.

I.V.Bragina<sup>1</sup>, B.P.Kuz'kin<sup>1</sup>, E.B.Ezhlova<sup>1</sup>, Yu.V.Demina<sup>1</sup>, A.N.Kulichenko<sup>2</sup>, D.V.Efremenko<sup>2</sup>, O.V.Maletskaia<sup>2</sup>,  
I.V.Kuznetsova<sup>2</sup>, E.A.Manin<sup>2</sup>, G.I.Lyamkin<sup>2</sup>, V.V.Kutyrev<sup>3</sup>, S.A.Portenko<sup>3</sup>, T.Yu.Krasovskaya<sup>3</sup>,  
V.V.Parkhomenko<sup>4</sup>, L.I.Shcherbina<sup>4</sup>, V.P.Klindukhov<sup>5</sup>, T.V.Grechanaya<sup>5</sup>, S.Ch.Tesheva<sup>5</sup>, V.G.Orobey<sup>6</sup>,  
D.L.Zavora<sup>7</sup>, A.F.Bryukhanov<sup>7</sup>, V.E.Eldinova<sup>8</sup>, Yu.V.Yunicheva<sup>8</sup>, O.M.Pilikova<sup>8</sup>, S.K.Derlyatko<sup>8</sup>

## Management of Work and Procedure for the Laboratory Diagnostics of Infectious Diseases during the Winter XXII Olympics and XI Paralympics, 2014

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute Stavropol, Russian Federation; <sup>3</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>4</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; <sup>5</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; <sup>6</sup>Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi, Sochi, Russian Federation; <sup>7</sup>Infectious Diseases Hospital No2 at the Premises of the Ministry of Healthcare in the Krasnodar Territory, Sochi, Russian Federation; <sup>8</sup>Black Sea Plague Control Station of the Rospotrebnadzor, Novorossiysk, Russian Federation

Analyzed is the management system for laboratory diagnostics of infectious diseases during the XXII Olympics and XI Paralympics, 2014 in Sochi. Reviewed is piece of work, executed in the pre-Olympic period as regards provision of laboratory facilities deployed for clinical material investigation, development of normative and regulatory documentation which considers peculiarities of the situation, identification of diagnostic capacities of the laboratories, and forecasting of the probable volume of laboratory studies by reference to various groups of infections. Put forward is the procedure for arrangement of work at the different stages of laboratory diagnostics, cooperation and response in case of emergency situation in the sphere of sanitary-epidemiological welfare of the population. Discussed is the role of geo-information system and current means of monitoring over epidemiological situation in the participating states and in the region of the Olympics in laboratory support organization.

**Key words:** Olympic Games, infectious diseases, monitoring of infectious diseases, laboratory diagnostics, specific indication of microorganisms, polymerase chain reaction.

При подготовке к крупным международным мероприятиям, предполагающим приезд большого числа участников и гостей из разных частей света, особое внимание уделяется профилактике инфекционных за-

болеваний и готовности к своевременному реагированию на вспышки инфекций. При этом существующие эпидемиологические риски связаны как с местными нозологическими формами, так и с возможным заносом



сом инфекций с других территорий [3, 4, 8].

При организации лабораторной диагностики в период XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи (Олимпийских игр) учитывался недавний опыт проведения Универсиады-2013 в Казани [2]. На подготовительном этапе решались следующие задачи: разработка соответствующей нормативно-методической базы; определение перечня и задач лабораторий, выполняющих исследование клинического материала; определение возможного (максимального) объема исследований за весь период, диагностической мощности лабораторных баз в сутки; выстраивание алгоритма взаимодействия между лабораториями; обеспечение постоянного мониторинга эпидемиологической ситуации в странах-участниках и регионе проведения Олимпийских игр.

**Организация лабораторной диагностики, работа в предолимпийский период.** Основным документом по организации лабораторной диагностики был «Порядок лабораторного обеспечения диагностики инфекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в г. Сочи» [7], разработанный с учетом опыта Универсиады-2013. Для врачей общей практики и специалистов, участвующих в исследовании клинического материала, было подготовлено методическое пособие [6], а также разработаны методические рекомендации [3].

Был определен перечень контингентов, подлежащих обследованию с забором материала для лабораторно-диагностических исследований, к которым относились [6, 7]:

- участники, гости и персонал при обращении в медицинские учреждения Олимпийских объектов, не нуждающиеся в направлении для стационарного лечения;

- участники и персонал при оказании стационарной медицинской помощи, а также гости, доставленные службой скорой медицинской помощи по направлению медицинских организаций олимпийских объектов;

- жители и гости Сочи, а также персонал при обращении в амбулаторно-поликлинические учреждения, не нуждающиеся в направлении для стационарного лечения;

- жители и гости Сочи при обращении в амбулаторно-поликлинические учреждения, нуждающиеся в дальнейшей госпитализации или госпитализированные для стационарного лечения;

- руководители государственных, спортивных и иных делегаций (VIP).

Для выбора направления диагностических исследований использовался подход, предложенный ВОЗ (Руководство по сбору клинических образцов во время полевых исследований вспышек WHO/CDS/CSR/EDC/2000.4), в соответствии с которым определены девять основных клинических синдромов и соответствующие каждому из них инфекционные болезни: синдром острой диареи, острый респираторный синдром, острый дерматологический синдром, синдром

острой геморрагической лихорадки, острый желтушный синдром, острый неврологический синдром, острый «системный» синдром, острый офтальмологический синдром, острый урологический синдром.

Основным учреждением, выполняющим лабораторную диагностику в период Олимпийских игр, была ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края. За исследование материала от контактных лиц отвечало Сочинское отделение ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» Роспотребнадзора.

Для усиления лабораторной базы Сочи и расширения ее диагностических возможностей по направлениям диагностики особо опасных инфекций (ООИ), проведения идентификации, генотипирования и секвенирования штаммов патогенов была задействована специализированная противоэпидемическая бригада Ставропольского противочумного института [1].

Материал от больных и контактных в СПЭБ должен был направляться в следующих случаях [6, 7]:

- при подозрении на ООИ (все контингенты и клинические синдромы);

- при заболеваниях неясной этиологии, при атипичном течении заболевания (все контингенты и клинические синдромы);

- от VIP – руководящего состава государственных, спортивных и иных делегаций (все клинические синдромы, кроме урологического);

- при синдроме острой геморрагической лихорадки (все контингенты);

- при остром «системном» синдроме – участники и персонал Олимпийских Игр при оказании стационарной медицинской помощи;

- при необходимости усиления лабораторий Сочи.

Таким образом, в проведении лабораторной диагностики инфекционных болезней были задействованы три лабораторных базы, для каждой из них определен круг задач, в соответствии с которыми строилась дальнейшая подготовка.

**Определение возможных объемов лабораторных исследований, диагностической мощности лабораторий.** Предварительный расчет показал, что в случае осложнений эпидемиологической обстановки при проведении Олимпийских игр объем лабораторных исследований клинического материала может достигать до 14100 проб, в том числе 5700 – на острые кишечные инфекции, 5100 – на воздушно-капельные и 3300 – на другие группы инфекций. При этом в сутки количество анализируемых проб может достигать до 400 и более. Готовность к лабораторной диагностике ООИ должна предусматривать не менее 200 исследований по каждой нозологии, на холеру – до 3000, экзотические инфекции для территории Российской Федерации – не менее 50 [6, 7].

В ходе проводимых штабных и полевых учений была определена диагностическая (пороговая) мощность задействованных лабораторных баз по методам исследований в сутки [7]:

- ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края: ПЦР – 160 проб, иммунологические – 200, бактериологический – 200;

- ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» Роспотребнадзора – ПЦР: 150 проб, иммунологические – 200, бактериологический – 300;

- СПЭБ: ПЦР – 200 проб, иммунологические – 200–500, бактериологический (возбудители I–II групп патогенности) – 40, бактериологический (возбудители III–IV групп патогенности и холеры) – 300.

Рассчитанная суточная диагностическая (пороговая) мощность лабораторий свидетельствовала об имеющемся резерве на случаи ухудшения эпидемиологической ситуации, увеличения инфекционной заболеваемости в период Олимпийских игр.

**Порядок организации работы на различных этапах лабораторной диагностики.** Забор клинического материала от больных, нуждающихся в стационарном лечении, осуществлялся на базе ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» и ГБУЗ «Краевая больница № 4» Министерства здравоохранения Краснодарского края. В сопроводительном документе указывались фамилия, имя, отчество, возраст больного, адрес (страна проживания и адрес фактического пребывания), предварительный клинический диагноз, дата и время начала заболевания и взятия материала, характер материала для исследования, примененные антибиотики (дата и доза), фамилия и должность медицинского работника, забравшего материал. Доставку проб для проведения лабораторной диагностики обеспечивало учреждение, в котором проводился забор материала. Предварительный и окончательный ответ по результатам исследований направлялся немедленно после их получения в учреждение, откуда был доставлен материал.

В случае подозрения на ООИ забор проб клинического и/или секционного материала должны были осуществлять медицинские работники в присутствии специалиста СПЭБ. При этом доставка проб осуществлялась автотранспортом СПЭБ в сопровождении полицейской машины [5, 6, 7].

При выявлении возбудителя ООИ информация незамедлительно должна была направляться в Оперативный штаб Роспотребнадзора в Краснодарском крае и Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (в Москву).

Лабораторная диагностика инфекционных болезней, включая этапы забора и доставки материала, выполнение исследований и сообщение результата, в период Олимпийских игр осуществлялась в круглосуточном режиме. При проведении диагностических исследований в соответствии с разработанными нормативно-методическими документами в качестве приоритетных применялись методы специфической индикации и, в частности, наиболее чувствительный из них – ПЦР, позволяющие проводить детекцию патогенов в максимально короткие сроки. При возмож-

ности применения нескольких методов индикации для получения достоверных результатов использовался принцип комплексной лабораторной диагностики (например, ПЦР+МФА или ПЦР+ИФА и др.) с ориентацией на наиболее чувствительный тест.

Положительный ответ, по данным методов специфической индикации (ПЦР), являлся основанием для оперативного принятия управленческих решений, проведения необходимых противоэпидемических и профилактических мероприятий с учетом анализа эпидситуации.

Окончательный ответ по результатам лабораторной диагностики выдавался после проведения полного микробиологического анализа, выделения и идентификации штамма [5, 6, 7]. При необходимости нативный материал и выделенные штаммы должны были направляться в референс-центры по соответствующим нозологиям.

Работа диагностических лабораторий в период Олимпийских игр была построена в постоянном взаимодействии. В случае превышения пороговой мощности лабораторной базы, необходимости задействования резервной базы, перераспределение потоков клинического материала для лабораторно-диагностических исследований должен был осуществлять Оперативный штаб Роспотребнадзора в Краснодарском крае.

**Организация мониторинга эпидемиологической ситуации.** При сборе эпидемиологического анамнеза особое внимание обращалось на прибытие больного из страны, неблагополучной по инфекционным болезням, нахождение больного на эндемичной территории (территория риска) во время сезонного подъема заболеваемости (время риска) в пределах инкубационного периода болезни, на наличие контакта с больным, страдающим аналогичным заболеванием, или контакта с заразным материалом, на имевшиеся укусы больного комарами, вшами, блохами, клещами (факторы риска), а также на другие возможные риски инфицирования, в том числе отношение больного к контингентам риска [3, 6, 7].

С целью минимизации риска трансграничного заноса инфекций гостями и участниками Олимпийских игр с сентября 2013 г. на официальном сайте ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора ([www.snipchi.ru](http://www.snipchi.ru)) действовала обновляемая в реальном времени страница об инфекционной заболеваемости в странах-участниках.

Ретроспективный анализ эпидемиологической обстановки в г.-к. Сочи свидетельствовал, что, в первую очередь, следует ожидать активизации местных нозологических форм инфекционных болезней (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом), а также инфекций, пик заболеваемости которыми приходится на зимнее время (ОРВИ, ОКИ вирусной этиологии).

В Ставропольском противочумном институте была внедрена географическая информационная система (ГИС), на платформе которой ежедневно размещались первичные извещения об инфекцион-

ных больных и информация об эпидемиологической ситуации в регионе проведения Олимпийских игр в целом. В итоге, была выстроена система мониторинга инфекционной заболеваемости, позволяющая своевременно принимать управленческие решения и определять направления лабораторно-диагностических исследований.

Таким образом, на подготовительном этапе были решены вопросы по организации лабораторной диагностики в период Олимпийских игр.

Разработанные нормативно-методические документы [5, 6, 7] определяли перечень и задачи лабораторных баз, выполняющих исследования клинического материала, порядок проведения лабораторной диагностики на всех этапах (от забора проб до выдачи результатов анализа) и взаимодействия. Учитывая особенности мероприятия, с целью обеспечения быстрого реагирования на ухудшение эпидемиологической обстановки, в качестве приоритетного использовали наиболее точный метод специфической индикации – ПЦР в реальном времени.

Сделанные расчеты возможных объемов лабораторных исследований позволили создать необходимые запасы питательных сред и диагностических препаратов, обеспечить необходимые мощности лабораторий. В период подготовки внедрена ГИС-программа для контроля эпидемиологической ситуации, проводился постоянный мониторинг инфекционной заболеваемости в регионе Олимпийских игр и странах-участниках. С учетом полученной информации осуществлялось оперативное планирование диагностических исследований. Была обеспечена готовность лабораторной службы к диагностике всех прогнозируемых нозологических форм инфекционных болезней, включая особо опасные и экзотические для территории Российской Федерации.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Зайцева О.А. Обеспечение готовности специализированных противоэпидемических бригад к работе при проведении массовых мероприятий. *Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол.* 2014; 1:76–80.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. XXVII Всемирная летняя универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Триада; 2013. 528 с.
3. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Зайцева О.А., Ефременко Д.В. Опыт стран-организаторов Олимпиад по обеспечению защиты от биологической угрозы. *Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол.* 2014; 1:70–5.
4. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Гризбевский Г.М., Клиндухов В.П. Обеспечение защиты от биологических угроз при проведении Олимпийских игр. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106):5–8.
5. Организация лабораторной диагностики инфекционных болезней, лабораторного контроля объектов окружающей среды при проведении массовых мероприятий. МР 4.2.0070/1-13. Ставрополь; 2013.
6. Организация и порядок проведения лабораторной диагностики инфекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 15.09.2014 г.).
7. Порядок лабораторного обеспечения диагностики ин-

фекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в г. Сочи.. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 12.09.2014 г.).

8. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Куклев Е.В., Кедрова О.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Попов Н.В., Князева Т.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка потенциальной эпидемической опасности международных массовых мероприятий по актуальным инфекционным болезням. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:29–39.

## References

1. Kulichenko A.N., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Zaitseva O.A. [Preparedness of specialized anti-epidemic teams to perform activities under the terms of mass events]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 1:76–80.
2. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [The XXVII Worldwide Summer Universiade, 2013 in Kazan. Sanitary-Epidemiological Welfare Provision]. Tver: Triada; 2013. 528 p.
3. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Zaitseva O.A., Efremenko D.V. [Experience of Olympics host countries in providing protection against biological hazard]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 1:70–5.
4. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Grizhevsky G.M., Klindukhov V.P. [Ensuring of protection from biological threats during Olympic games]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4(106):5–8.
5. [Management of infectious disease laboratory diagnostics and laboratory control of the ambient environment objects when performing mass events]. МР 4.2.0070/1-13. Stavropol, 2013.
6. [Management and procedure of infectious disease laboratory diagnostics during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympics, 2014 in Sochi] (cited 15 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>
7. [Procedure for laboratory support of infectious disease diagnostics during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympics, 2014 in Sochi] (cited 12 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>
8. Udoichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Kouklev E.V., Kedrova O.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Popov N.V., Knyazeva T.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. [Assessment of the potential epidemic hazard as regards international public events in terms of the currently important infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3: 29–39.

## Authors:

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

Kulichenko A.N., Efremenko D.V., Maletskaya O.V., Kuznetsova I.V., Manin E.A., Lyamkin G.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Kutyrev V.V., Portenko S.A., Krasovskaya T.Yu. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Parkhomenko V.V., Shcherbina L.I. Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory. Krasnodar, Russian Federation.

Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Tesheva S.Ch. Rosпотребнадзор Administration in the Krasnodar Territory. 100, Rashpilevskaya St., Krasnodar, 350000, Russian Federation. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Orobei V.G. Territorial Subdivision of the Rosпотребнадзор Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

Zavora D.L., Bryukhanov A.F. Infectious Diseases Hospital No2 at the Premises of the Ministry of Healthcare in the Krasnodar Territory. Sochi, Russian Federation.

Eldinova V.E., Yunicheva Yu.V., Pilikova O.M., Derlyatko S.K. Black Sea Plague Control Station. 90, Kunikova St., Novorossiysk, 353919, Russian Federation. E-mail: [novppchs@rambler.ru](mailto:novppchs@rambler.ru)

## Об авторах:

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

Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Малецкая О.В., Кузнецова И.В., Манин Е.А., Лямкин Г.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Кутырев В.В., Портенко С.А., Красовская Т.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Пархоменко В.В., Щербина Л.И. Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае. Российская Федерация, Краснодар.

Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Российская Федерация, 350000, Краснодар, ул. Рашилевская, 100. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Оробей В.Г. Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.к. Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Завора Д.Л., Брюханов А.Ф. Инфекционная больница № 2 Министерства здравоохранения Краснодарского края. Российская Федерация, Сочи.

Елдинова В.Е., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Дерлятко С.К. Причерноморская противочумная станция. Российская Федерация, 353919, Краснодарский край, Новороссийск, ул. Куникова, 90. E-mail: [novppchs@rambler.ru](mailto:novppchs@rambler.ru)

Поступила 09.12.14.



Б.П.Кузькин<sup>1</sup>, А.Н.Куличенко<sup>2</sup>, О.В.Малецкая<sup>2</sup>, Д.В.Ефременко<sup>2</sup>, Е.А.Манин<sup>2</sup>, Е.С.Котенев<sup>2</sup>,  
А.Г.Рязанова<sup>2</sup>, И.В.Кузнецова<sup>2</sup>, С.П.Дикова<sup>2</sup>, Я.В.Лисицкая<sup>2</sup>, А.С.Волынкина<sup>2</sup>, Д.Г.Пономаренко<sup>2</sup>,  
В.Е.Елдинова<sup>3</sup>, Е.А.Бойко<sup>3</sup>, В.П.Клиндухов<sup>4</sup>, В.Г.Оробей<sup>5</sup>, В.В.Кутырев<sup>6</sup>, Е.С.Казакова<sup>6</sup>, В.Е.Куклев<sup>6</sup>,  
И.А.Дятлов<sup>7</sup>, Н.Н.Карцев<sup>7</sup>

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ СПЭБ ФКУЗ «СТАВРОПОЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА В ПЕРИОД ПРОВЕДЕНИЯ XXII ОЛИМПИЙСКИХ И XI ПАРАЛИМПИЙСКИХ ЗИМНИХ ИГР В СОЧИ

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора, Новороссийск, Российская Федерация; <sup>4</sup>Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар, Российская Федерация; <sup>5</sup>Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи, Российская Федерация; <sup>6</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>7</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация

В статье подведены основные итоги деятельности специализированной противоэпидемической бригады ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи. Рассматриваются особенности организации работы диагностических лабораторий СПЭБ, представлены сведения по структуре и объему лабораторных исследований клинического материала и проб из объектов окружающей среды. Проанализирован опыт функционирования бригады во время крупного международного массового мероприятия. В результате сделано заключение, что действующая структура СПЭБ в период Олимпийских игр, укомплектование ее лабораторным оборудованием, созданный запас диагностических препаратов и тест-систем позволили решить целый комплекс разноплановых задач по лабораторной диагностике инфекционных болезней и индикации их возбудителей.

**Ключевые слова:** XXII Олимпийские XI Паралимпийские зимние игры 2014 г. в Сочи, специализированная противоэпидемическая бригада, лабораторные исследования, клинический материал, пробы из объектов окружающей среды.

B.P.Kuz'kin<sup>1</sup>, A.N.Kulichenko<sup>2</sup>, O.V.Maletskaia<sup>2</sup>, D.V.Efremenko<sup>2</sup>, E.A.Manin<sup>2</sup>, E.S.Kotenev<sup>2</sup>, A.G.Ryazanova<sup>2</sup>, I.V.Kuznetsova<sup>2</sup>, S.P.Dikova<sup>2</sup>, Ya.V.Lisitskaya<sup>2</sup>, A.S.Volynkina<sup>2</sup>, D.G.Ponomarenko<sup>2</sup>, V.E.Eldinova<sup>3</sup>, E.A.Boiko<sup>3</sup>, V.P.Klindukhov<sup>4</sup>, V.G.Orobey<sup>5</sup>, V.V.Kutyrev<sup>6</sup>, E.S.Kazakova<sup>6</sup>, V.E.Kuklev<sup>6</sup>, I.A.Dyatlov<sup>7</sup>, N.N.Kartsev<sup>7</sup>

## Performance of the SAET of the Stavropol Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor during the XXII Olympic and XI Paralympic Winter Games in Sochi

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>3</sup>Black Sea Plague Control Station of the Rospotrebnadzor, Novorossiysk, Russian Federation; <sup>4</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; <sup>5</sup>Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi, Sochi, Russian Federation; <sup>6</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>7</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

Given is a general overview of the SAET performance during the XXII Olympic and XI Paralympic Winter Games, 2014 in Sochi. Discussed are the peculiarities of work management of the SAET diagnostic facilities; represented are the data on the structure and scope of laboratory investigations of clinical material and environmental samples. Analyzed is the experience of operation under major international mass event. Consequently, it is concluded that current SAET structure, its stuffing and equipping, the laid-up stock of preparations and test-systems have allowed for coping with a diverse task complex in the laboratory diagnostics of infectious diseases and indication of their agents.

**Key words:** the XXII Olympic and XI Paralympic Winter Games, 2014 in Sochi, specialized anti-epidemic team, laboratory investigations, clinical material, environmental samples.

Участие специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в противоэпидемическом обеспечении XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи

(Олимпийские игры) позволило существенно расширить диагностические возможности и укрепить общую лабораторную сеть региона, а также создать дополнительные резервы на случай ухудшения эпидемиологической ситуации.

В данной работе подводятся и анализируются основные итоги деятельности СПЭБ и, непосредственно, ее диагностических лабораторий в период Олимпийских игр.

**Работа лабораторий СПЭБ.** Алгоритм функционирования СПЭБ во время проведения Олимпийских игр построен с учетом порядка исследования клинического материала и проб из объектов окружающей среды [6, 7], направлений деятельности, задач и общей структуры бригады [1]. Диагностическими лабораториями СПЭБ за весь период Олимпийских игр проведена следующая работа.

**Лаборатория индикации** (работа с возбудителями I–IV групп патогенности бактериальной и вирусной природы, штат 10 человек, методы исследования – ПЦР, иммунологические, микроэррей):

- исследование методами специфической индикации клинического материала и проб из объектов окружающей среды, в том числе по эпидемическим показаниям. Всего за период Олимпийских игр проведено 265 исследований;

- ПЦР-исследование проб горячей воды из разводящей сети на легионеллы, продуктов питания – на ОКИ, ректальных мазков от декретированного контингента – на ОКИ, воды централизованного водоснабжения и морской на вирусы – 10664 исследования;

- исследование продуктов питания на биологические токсины – 32 исследования;

- генотипирование и секвенирование штаммов возбудителей инфекционных болезней – 52 исследования.

**Лаборатория особо опасных инфекций** (работа с возбудителями I–II групп патогенности бактериальной природы, штат 6 человек, методы исследования – бактериологический, биологический, МФА, ИХ):

- выделение и идентификация культур возбудителей из клинического материала и проб из объектов окружающей среды, отобранных в том числе по эпидемическим показаниям – 18 исследований;

- МФА-исследование проб продуктов питания на ООИ – 366 исследований.

**Бактериологическая лаборатория** (работа с возбудителями острых кишечных и воздушно-капельных

инфекций бактериальной природы III–IV групп патогенности, штат 8 человек, методы исследования – бактериологический):

- выделение и идентификация культур возбудителей из клинического материала и проб из объектов окружающей среды, отобранных в том числе по эпидемическим показаниям – 81 исследование;

- выделение, количественное определение концентрации легионелл, их серогруппы из проб положительных в ПЦР (более  $1 \cdot 10^3$  ДНК-копий на литр) – 141 исследование;

- пробоподготовка ректальных мазков от декретированного контингента, выделение и идентификация культур возбудителей из проб положительных в ПЦР – подготовлено 996 проб, проведено 6 исследований;

- исследование проб от декретированного контингента на наличие золотистого стафилококка – 40 исследований;

- исследование морской воды на вибриофлору – 56 исследований.

**Санитарно-гигиеническая лаборатория** (выявление биологических токсинов, санитарно-показательных микроорганизмов III–IV групп патогенности, штат 3 человека, методы исследования – санитарно-микробиологические с применением автоматических анализаторов):

- пробоподготовка образцов пищевых продуктов – 183 пробы;

- исследование продуктов питания на санитарно-микробиологические показатели – 26 исследований.

Работа бригады осуществлялась в круглосуточном режиме без выходных с назначением ответственного дежурного в ночное время. Лаборатории индикации, особо опасных инфекций и бактериологическая функционировали в две смены.

Обобщенные результаты работы СПЭБ по лабораторному исследованию клинического материала и проб из объектов окружающей среды представлены в таблице.

**Обеспечение готовности к индикации неизвестного возбудителя.** Готовность к индикации возбудителей особо опасных, новых и возвращающихся инфекций, в том числе в случае совершения биоло-

Результаты работы СПЭБ по лабораторному исследованию клинического материала и проб из объектов окружающей среды в период Олимпийских игр (с 19.01.2014 по 20.03.2014 г.)

Вид исследований	Количество исследованных проб	Количество проведенных анализов	Количество нестандартных (положительных) проб
Вода горячая из централизованного водоснабжения на легионеллы	376	517	103 (выделено 33 культуры)
Вода морская, открытых водоемов на группу кишечных вирусов	31	159	2
Вода морская на вибриофлору	56	56	0
Скрининг продуктов питания на ПБА	183	1589	4
Клинический материал и обследование декретированных групп	1043	9237	29
Объекты окружающей среды по эпидемиологическим показаниям	28	107	5
Генотипирование и секвенирование штаммов	21 штамм	52	-
Переданные культуры для идентификации возбудителей	4 культуры	30	3 (токсины <i>S. aureus</i> )
Итого за весь период	1721	11747 (193 исслед./сут)	146



гического теракта, – приоритетная задача бригады. В преддверии Олимпийских игр на базе СПЭБ была проведена тестовая детекция неизвестного ПБА. Всего исследовано 3 пробы порошка на возможное наличие возбудителей ООИ вирусной и бактериальной природы: натуральной оспы, геморрагических лихорадок Эбола, Марбург, Ласса, Хунин, Мачупо, желтой лихорадки, чумы, сибирской язвы, туляремии, сапа, мелиоидоза, лихорадки Ку. Последовательная схема индикации неизвестного возбудителя включала: неспецифическую индикацию («сигнальный» метод) – применение портативных биологического и химического детекторов; специфическую индикацию возбудителей особо опасных вирусных инфекций (ПЦР); специфическую индикацию возбудителей особо опасных бактериальных инфекций (ПЦР, иммуносерологические методы); посев на питательные среды; постановку биопробы.

Сотрудники и подразделения, участвовавшие в тестовой детекции, продемонстрировали готовность к проведению данных работ. Выдача предварительного и окончательного ответов по результатам специфической индикации проведена в регламентированные сроки [2].

**Исследование клинического материала и проб из объектов окружающей среды по эпидемическим показаниям.** Предпринятые профилактические и противоэпидемические мероприятия в период подготовки и проведения Олимпийских игр позволили избежать осложнений эпидемиологической обстановки. Несмотря на прибытие в Сочи более 1,2 млн гостей и участников соревнований, удалось добиться снижения уровня суммарной инфекционной заболеваемости на 47 % по сравнению с аналогичным периодом 2013 г. Случаев заболевания особо опасными и природно-очаговыми инфекциями не зафиксировано. Лаборатория ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» Министерства здравоохранения Краснодарского края, отвечающая за исследование проб клинического материала, справлялась с имеющимся объемом анализов. В СПЭБ материал от больных за период Олимпийских игр направлялся несколько раз в сложных случаях, в том числе от иностранных граждан и руководящего состава государственных, спортивных и иных делегаций.

08.02.2014 г. на исследование поступили 2 пробы (мазок из носа, мазок из зева) от госпитализированного с симптомами ОРВИ с тяжелым течением в ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» иностранного гражданина, прибывшего из Африки. По результатам лабораторной диагностики, в пробах обнаружена РНК вируса гриппа А субтипа H1-swine.

Эпидемиологическая группа СПЭБ выезжала 18.02.2014 г. для участия в обследовании предполагаемого очага кишечного иерсиниоза, организации санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в очаге. Проведен отбор 25 проб продуктов питания и других объектов окружающей среды. В результате проведенных исследований в 7

пробах обнаружена ДНК *Yersinia enterocolitica* авирулентной формы, однако культура не выделена.

**Обследование объектов проживания и спортивных объектов на легионеллы.** В период подготовки к Олимпийским играм и межсоревновательный период проводились исследования на наличие легионелл в системах централизованного водоснабжения объектов проживания и проведения соревнований. Отбор и доставку проб осуществляли специалисты эпидемиологической группы СПЭБ. Согласно порядку лабораторного исследования проб из объектов окружающей среды [3], в целях обеспечения возможности проведения своевременных противоэпидемических мероприятий, ответ о выявлении и концентрации ДНК легионелл, а также заключение о необходимости проведения дезинфекционных и профилактических мероприятий выдавались по результатам ускоренного метода – ПЦР-анализа.

Всего обследовано 105 объектов (376 проб). На 37 в пробах воды обнаружена ДНК легионелл в концентрациях, требующих проведения профилактических мероприятий. На 11 объектах выявлен возбудитель легионеллеза при повторном исследовании, а на 5 – при третьем. Следует отметить, что концентрация ДНК легионелл снижалась при повторных исследованиях, что косвенно позволяло судить об эффективности профилактических мероприятий.

**Скрининговые исследования продуктов питания на наличие возбудителей особо опасных, острых кишечных инфекций и биологических токсинов.** В связи с существующим риском биотерроризма в СПЭБ проводился контроль пищевых продуктов, отобранных на наиболее значимых объектах, в местах питания спортсменов и официальных лиц, на возбудители ООИ – чумы, сибирской язвы (методом МФА), ОКИ – эшерихиозов, дизентерии, сальмонеллезов (методом ПЦР). Некоторые пробы также контролировались на наличие возбудителя листериоза (методом ПЦР) и присутствие биологических токсинов – стафилококковых, ботулинических, рицина (использовали биочип-анализаторы «Диagem» и «ePaTOX II», автоматический анализатор «mini VIDAS», ИФА, ИХ). В случае обнаружения возбудителя методами специфической индикации проводился бактериологический анализ. Всего исследовано 183 пробы, выполнено 1589 анализов. В одной пробе выявлена ДНК эшерихиозов, в одной – ДНК сальмонеллезов, из одной пробы выделена культура золотистого стафилококка, в пробе рыбы сырой (лосось) обнаружена ДНК, а затем выделена культура листерии. Продукцию изъяли из продажи и провели комплекс санитарно-гигиенических и профилактических мероприятий.

**Исследование воды на группу кишечных вирусов и вибриофлору.** За период Олимпийских игр дважды проводился контроль воды из 11 водозаборных объектов на группу кишечных вирусов (норо-, рото-, астро-, адено-, энтеровирусы, вирус гепатита А). Всего в СПЭБ исследовано 25 проб, все результа-

ты отрицательные.

Также на группу кишечных вирусов однократно проводился анализ морской воды, отобранной на 6 городских пляжах – в 2 пробах обнаружена ДНК аденовирусов. По результатам лабораторного исследования организованы профилактические мероприятия.

Еженедельно проводился мониторинг морской воды 8 пляжей на вибрифлору. Отбор и доставку проб осуществляли специалисты эпидемиологической группы СПЭБ. Все результаты лабораторных исследований были отрицательные.

**Профилактическое обследование декретированных групп на возбудителей острых кишечных инфекций.** Учитывая особую значимость проблемы обеспечения пищевой безопасности Олимпийских игр, с целью выявления возможных источников инфекций проводились внезапные обследования декретированного контингента – работников общественного питания спортивных объектов (соревновательных и не соревновательных) на кишечную группу инфекций (дизентерия, сальмонеллез, энтероинвазивный эшерихиоз, кампилобактериоз, адено-, рото-, норо-, астро-, энтеровирусные инфекции). Всего методом ПЦР исследованы пробы от 996 человек, у 21 из них обнаружены возбудители ОКИ (14 – РНК энтеровирусов, 3 – ДНК сальмонелл, 3 – ДНК кампилобактерии, 1 – РНК астровирусов). При выявлении ДНК патогенов бактериальной природы проводился бактериологический анализ.

Бактериологическим методом обследованы 20 человек на наличие золотистого стафилококка (смыв из носа, смыв из зева), у 4 из них выделен возбудитель.

Сотрудники с положительным результатом лабораторной диагностики отстранялись от работы до прохождения лечения и повторного исследования.

**Идентификация, генотипирование и секвенирование штаммов возбудителей инфекционных болезней.** СПЭБ в период Олимпийских игр выполняла функции Центра индикации возбудителей и диагностики опасных инфекционных болезней ЮФО Роспотребнадзора, возложенные на ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, обеспечивая весь комплекс необходимых исследований.

Проведена идентификация и характеристика свойств 4 штаммов (три штамма – *Staphylococcus aureus*, один – *Listeria monocytogenes*), переданных из Сочинского отделения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае». Показано, что 3 штамма *S. aureus* являлись продуцентами стафилококкового энтеротоксина.

Оснащение СПЭБ оборудованием позволило проводить генотипирование и фрагментарное секвенирование штаммов возбудителей инфекций. Всего генотипирован 21 штамм, 9 из них – *Legionella pneumophila* (семь штаммов серогруппы 1 и два – серогрупп 2–14), 4 – *Escherichia coli* (последовательности генов энтерогеморрагических

*E. coli* не выявлены), 7 – *S. aureus* (у одного штамма определена последовательность гена стафилококкового энтеротоксина А; у одного штамма выявлены последовательности генов, кодирующих синтез стафилококкового энтеротоксина А и токсина синдрома токсического шока).

Проведено мультилокусное секвенирование (по Сэнгеру) и филогенетический анализ фрагментов генома вируса гриппа А субтипа H1-swine, выявленного в материале от больного. Установлено, что последовательность входит в группу, представленную штаммами A/Indiana/167/2012(H1N1) (наиболее близкий штамм), A/Delaware/05/2010(H1N1), A/North Dakota/05/2011, циркулировавшими в США в 2010–2012 гг. Определение происхождения возбудителя позволило судить о его вероятном заносе с другой территории.

Таким образом, действующая структура СПЭБ, укомплектование ее лабораторным оборудованием, имеющийся запас диагностических препаратов позволили решить целый комплекс разноплановых задач по лабораторной диагностике инфекционных болезней и индикации их возбудителей в период Олимпийских игр.

Благодаря усилению состава бригады обеспечения круглосуточной посменной работы в течение всего срока и, как следствие, увеличена диагностическая мощность, что было необходимо. В отдельные дни число поступивших проб для ПЦР-анализа превышало значения пороговой мощности, а количество исследований достигало 700–800 в сутки.

С целью сокращения времени анализа в качестве приоритетных использовали методы специфической индикации и, в частности, наиболее чувствительный из них – ПЦР, а также автоматические анализаторы. Согласно разработанным нормативно-методическим документам [3, 4, 5, 6, 7] положительный ответ по данным ПЦР являлся основанием для оперативного проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий с учетом анализа эпидемиологической ситуации.

Использование для работы стационарных помещений (в том числе соответствующих уровню биологической безопасности BSL III) и лаборатории на автошасси, оснащение современным оборудованием для индикации, идентификации, генотипирования и секвенирования микроорганизмов позволило расширить диагностические возможности СПЭБ, доведя их, по сути, до возможностей научно-исследовательских институтов Роспотребнадзора. Это дало возможность проводить на месте практически весь спектр необходимых исследований по выявлению и характеристике патогенов. Впервые в условиях СПЭБ применена новая приборная база: биочип-анализаторы «Диagem» и «ePaTOX II» для выявления биологических токсинов, автоматическая электрофоретическая станция «Experion System» для генотипирования штаммов.

Предпринятые в период подготовки профилактические меры по санитарной охране, обеспечению пи-

щевой безопасности, профилактике инфекционных болезней с использованием современных средств лабораторной диагностики позволили избежать возможных проблем санитарно-эпидемиологического характера в период проведения Олимпийских игр. Основное количество лабораторных исследований было направлено на профилактическое обследование работников общественного питания, а также лабораторный контроль продуктов питания и воды централизованного водоснабжения.

Особенностью работы СПЭБ в период крупных международных (массовых) мероприятий являлось обеспечение готовности к детекции нового возбудителя, не характерного для данной местности и возбудителей с атипичными свойствами. При этом ключевым вопросом может быть возможность в кратчайшие сроки определить не только родовую и видовую принадлежность патогена, но и установить его происхождение, эпидемиологическую значимость. Поэтому дальнейшее использование методов молекулярной эпидемиологии в условиях СПЭБ, в том числе секвенирования, оправдано. В ряде случаев для обеспечения полномасштабных работ целесообразна функциональная переориентация лабораторных мобильных комплексов с учетом обеспечения биологической безопасности работ и дополнительное задействование палаточных модулей. Применение технологий генотирования в СПЭБ должно быть отражено в соответствующей нормативно-методической документации.

В итоге получен значимый положительный опыт функционирования бригады в период проведения массового мероприятия, использования усиленного состава с привлечением специалистов НИИ и других учреждений Роспотребнадзора, что должно учитываться при дальнейшем планировании и организации работы СПЭБ.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куличенко А.Н., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Зайцева О.А. Обеспечение готовности специализированных противоэпидемических бригад к работе при проведении массовых мероприятий. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2014; 1:76–80.
2. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. М.; 2006. 288 с.
3. Организация санитарно-противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий с международным участием. МР 3.1.0079/2-13.
4. Организация лабораторной диагностики инфекционных болезней, лабораторного контроля объектов окружающей среды при проведении массовых мероприятий. МР 4.2.0070/1-13.
5. Организация и порядок проведения лабораторной диагностики инфекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 15.09.2014 г.).
6. Порядок лабораторного обеспечения диагностики инфекционных болезней в период проведения XXII Олимпийских

зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 12.09.2014 г.).

7. Порядок лабораторного обеспечения исследований проб окружающей среды в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 12.09.2014 г.).

#### References

1. Kulichenko A.N., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Zaitseva O.A. [Preparedness of specialized anti-epidemic teams to perform activities under the terms of mass events]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 1:76–80.
2. Onishchenko G.G., editor. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents]. M.; 2006. 288 p.
3. [Management of sanitary-antiepidemic support of mass events with international participation]. МР 3.1.0079/2-13. М.; 2013. 30 p.
4. [Management of infectious disease laboratory diagnostics and laboratory control of the ambient environment objects when performing mass events]. МР 4.2.0070/1-13. Stavropol; 2013.
5. [Management and Procedure of infectious disease laboratory diagnostics during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympics, 2014 in Sochi] (cited 15 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>.
6. [Procedure for laboratory support of infectious disease diagnostics during the XXII Olympic Winter Games and XI Paralympics, 2014 in Sochi] (cited 12 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>.
7. [Procedures for the laboratory support of the environmental sample investigations during the XXII Olympics and XI Paralympics in the resort town Sochi, 2014] (cited 12 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>.

#### Authors:

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

Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Efremenko D.V., Manin E.A., Kotenev E.S., Ryazanova A.G., Kuznetsova I.V., Dikova S.P., Lisitskaya Ya.V., Volynkina A.S., Ponomarenko D.G. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Eldinova V.E., Boiko E.A. Black Sea Plague Control Station. 90, Kunikova St., Novorossiysk, 353919, Russian Federation. E-mail: [novpchs@rambler.ru](mailto:novpchs@rambler.ru)

Klindukhov V.P. Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory. 100, Rashpilevskaya St., Krasnodar, 350000, Russian Federation. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Orobey V.G. Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

Kutyrev V.V., Kazakova E.S., Kuklev V.E. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

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

#### Об авторах:

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

Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Ефременко Д.В., Манин Е.А., Котенев Е.С., Рязанова А.Г., Кузнецова И.В., Дикова С.П., Лисицкая Я.В., Волынкина А.С., Пономаренко Д.Г. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Елдинова В.Е., Бойко Е.А. Причерноморская противочумная станция. Российская Федерация, 353919, Краснодарский край, Новороссийск, ул. Куникова, 90. E-mail: [novpchs@rambler.ru](mailto:novpchs@rambler.ru)

Клиндухов В.П. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Российская Федерация, 350000, Краснодар, ул. Раппопортская, 100. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Оробей В.Г. Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.к. Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Кутырев В.В., Казакова Е.С., Куклев В.Е. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

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

Поступила 09.12.14.



Г.И.Лямкин, А.А.Худолеев, А.А.Хачатурова, А.Н.Куличенко

**ОБЗОР ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ  
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2014 г. И ПРОГНОЗ НА 2015 г.***ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»,  
Ставрополь, Российская Федерация*

В обзоре приведен анализ и оценка эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. Количество заболевших людей в 2014 г. превышает показатели 2013 г. на 7,7 %. Сохраняется негативная тенденция заболеваемости сельскохозяйственных животных (КРС и МРС) и количества зарегистрированных первичных неблагополучных по бруцеллезу пунктов. Самый высокий уровень заболеваемости бруцеллезом остается в Северо-Кавказском, Южном и Сибирском федеральных округах. В 2014 г. возросло количество заболевших бруцеллезом людей в Центральном и Дальневосточном федеральном округах. Дан прогноз по заболеваемости бруцеллезом людей на 2015 г.

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

G.I.Lyamkin, A.A.Khudoleev, A.A.Khachaturova, A.N.Kulichenko

**Review of Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2014,  
and Prognosis for 2015***Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation*

Represented is the analysis and assessment of epidemiological and epizootiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2014. Human morbidity rates in 2014 exceed the indexes of 2013 by 7.7 %. Negative trend in the live-stock animal incidence (cattle and small ruminants), as well as in the numbers of registered index potentially hazardous territories, as regards brucellosis, remains. The highest brucellosis morbidity rates are in the North-Caucasian, Southern and Siberian Federal Districts. The quantity of brucellosis cases among the population has increased in Central and Far-Eastern Federal Districts. Put forward is the prognosis on the human brucellosis morbidity rates for 2015.

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

С целью оценки эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогнозирования вероятного развития эпидемической ситуации в 2015 г. проведен анализ официальных статистических данных Роспотребнадзора и Россельхознадзора, а также материалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора по заболеваемости бруцеллезом в субъектах Российской Федерации за 2014 г. [3, 4].

В 2014 г. в Российской Федерации среди людей зарегистрировано 368 случаев впервые выявленного бруцеллеза, показатель заболеваемости на 100 тыс. населения (далее – ИП) равен 0,26, что на 7,7 % больше, чем в 2013 г. (341 случай, ИП – 0,24), в том числе детей в возрасте до 17 лет – 27 чел. (ИП – 0,10), что выше показателей предыдущего года на 7 случаев (в 2013 г. ИП – 0,07) (рис. 1).

Больные бруцеллезом люди регистрировались на территории 32 субъектов Российской Федерации семи федеральных округов.

Основная часть больных бруцеллезом (87,7 %) выявлена в субъектах Северо-Кавказского (62,7 %), Южного (13,6 %) и Сибирского (11,4 %) федеральных округов Российской Федерации.

В Северо-Кавказском федеральном округе (СКФО) в 2014 г. бруцеллез впервые обнаружен у 231 чел. (ИП – 2,43), из них в Республике Дагестан – 144 чел. (ИП – 4,9), в том числе у 15 детей в возрас-

те до 17 лет (ИП – 1,69). Заболеваемость людей бруцеллезом в республике в 2014 г. остается на прежнем высоком уровне (в 2013 г. зарегистрировано 142 случая). Количество случаев бруцеллеза у людей в Республике Дагестан было наибольшим в Российской Федерации, а заболевшие бруцеллезом дети составляют более половины от всех случаев бруцеллеза у детей данной возрастной группы.

В Ставропольском крае выявлено 76 случаев бруцеллеза (ИП – 2,73), что на 13 случаев больше,

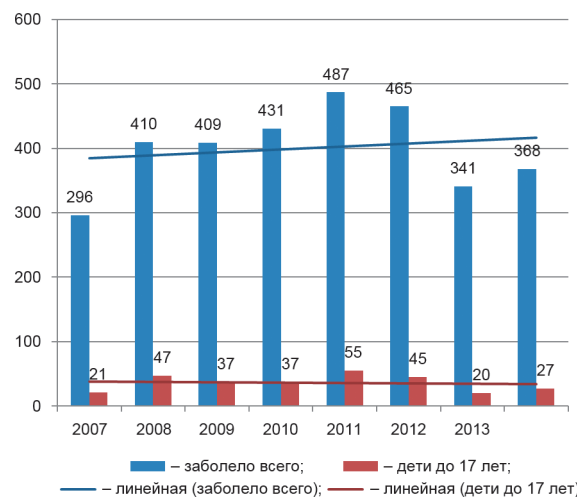


Рис. 1. Количество заболевших бруцеллезом людей в Российской Федерации в 2007–2014 гг.

чем в 2013 г.

В остальных субъектах СКФО регистрировались единичные случаи заболевания бруцеллезом среди взрослого населения (от 1 до 4 случаев).

В Южном федеральном округе (ЮФО) зарегистрировано 50 больных бруцеллезом (ИП – 0,36). Большая часть больных выявлена в Республике Калмыкия (26 чел.) и Астраханской области (14 чел.). Следует отметить, что ИП заболеваемости бруцеллезом в Республике Калмыкия по-прежнему остается самым высоким в Российской Федерации (ИП – 9,11).

В Сибирском федеральном округе зарегистрировано 42 случая впервые выявленного бруцеллеза (ИП – 0,22). Более половины случаев заболеваний пришлось на Республику Тыва и Забайкальский край (12 и 10 случаев соответственно).

В Центральном федеральном округе заболевания бруцеллезом установлены у 17 чел. (ИП – 0,08), 9 из которых жители Москвы.

В Дальневосточном федеральном округе зарегистрирована вспышка бруцеллеза в Еврейской автономной области – выявлено 13 случаев заболевания (ИП – 7,49). В целом по Дальневосточному федеральному округу в 2014 г. ИП заболеваемости бруцеллезом составил 0,27 (17 случаев).

В Приволжском и Уральском федеральных округах зарегистрировано 6 и 5 больных бруцеллезом, ИП при этом составил 0,02 и 0,04 соответственно. В Северо-Западном и Крымском федеральных округах случаев заболевания людей бруцеллезом не выявлено.

На территории СКФО и ЮФО в 2014 г. от людей изолированы 10 культур возбудителя бруцеллеза. В Референс-центре по мониторингу за возбудителем бруцеллеза штаммы бруцелл, выделенные в республике Калмыкия, идентифицированы как *Brucella melitensis* I биовар (3 штамма) и *B. melitensis* III биовар (2 штамма); в республике Дагестан – *B. melitensis* I биовар; в Ставропольском крае – *B. melitensis* III биовар (3 штамма) и *B. melitensis* I биовар (1 штамм).

Среди заболевших бруцеллезом в Российской Федерации преобладают мужчины работоспособного возраста, связанные по роду деятельности с обслуживанием сельскохозяйственных животных (работники молочно-товарных ферм, чабаны, зооветеринарные работники) в сельской местности.

Эпидемические проявления бруцеллеза на протяжении последних лет находятся в прямой зависимости от степени пораженности бруцеллезной инфекцией сельскохозяйственных животных эпидемически значимых видов крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота [1, 2].

По данным федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, в Российской Федерации отмечается ежегодное увеличение количества больных сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС [4] (рис. 2, 3).

Так, за первые три квартала 2014 г. выявлено

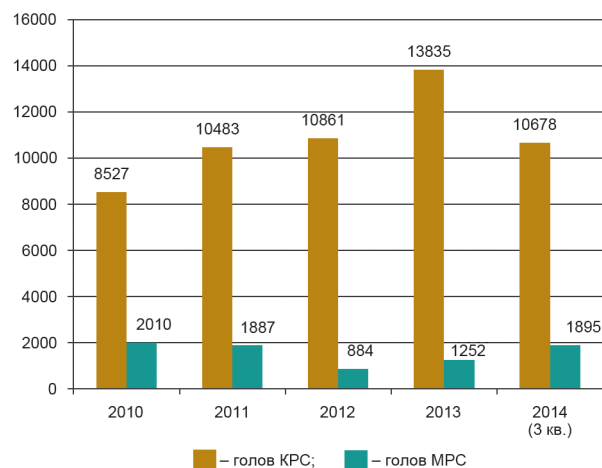


Рис. 2. Динамика заболеваемости бруцеллезом КРС и МРС в Российской Федерации в 2010–2014 гг. (абсолютные цифры)

520 неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС, 40 – МРС. Из них наибольшее количество неблагополучных по бруцеллезу пунктов, связанных с заболеваниями КРС, зарегистрировано на территориях СКФО и ЮФО: Карачаево-Черкесская (217), Чеченская республики (66), Республика Калмыкия (52), Ставропольский край (48), Астраханская область (21), Республика Дагестан и Краснодарский край (по 19), Волгоградская область (16), Ростовская область и Республика Ингушетия (по 9), Кабардино-Балкарская Республика (7).

Неблагополучные пункты по бруцеллезу МРС зарегистрированы в Республике Дагестан (10 пунктов), Краснодарском (6) и Ставропольском краях (5), Республике Хакасия, Саратовской и Свердловской областях (по 2), в Республиках Калмыкия, Тыва, Удмуртия, Красноярском крае, Астраханской, Ленинградской, Оренбургской, Ивановской, Кемеровской, Московской, Новосибирской, Смоленской и Ростовской областях (по 1).

Основное количество неблагополучных пунктов по бруцеллезу, связанных с заболеванием МРС

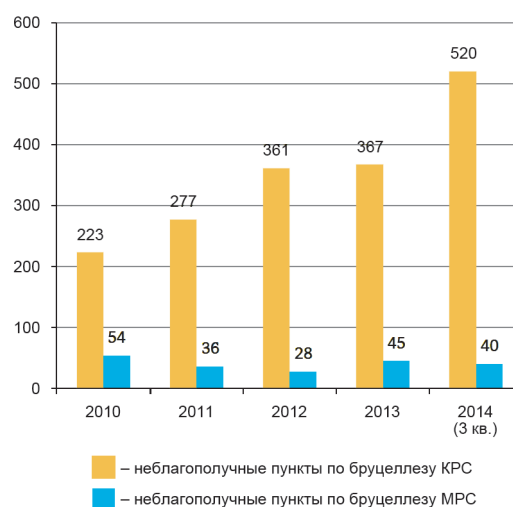


Рис. 3. Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС в Российской Федерации в 2010–2014 гг.



и КРС, как и в 2013 г., выявлено в субъектах СКФО и ЮФО.

Таким образом, эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу является следствием неблагоприятной эпизоотической обстановки, которая не имеет тенденции к стабилизации.

Эпидемиологический прогноз по бруцеллезу в Российской Федерации на 2015 г. определяется, с одной стороны, сохраняющейся многолетней негативной тенденцией роста числа больных сельскохозяйственных животных эпидемически значимых видов и неблагоприятных по бруцеллезу пунктов, и, как следствие, вовлечением в эпизоотический процесс контингентов лиц, профессионально связанных с уходом и разведением крупного и мелкого рогатого скота, а также с производством мясной и молочной продукции. С другой стороны, в связи с началом реализации в 2015 г. региональных программ импортозамещения, в том числе в животноводческой отрасли сельского хозяйства, прогнозируется расширение рынков сбыта отечественной животноводческой продукции внутри страны с вовлечением в экономическую деятельность новых поставщиков и потребителей, и, как следствие, повышение риска попадания продукции животноводства из традиционно неблагоприятных по бруцеллезу регионов СКФО, ЮФО, СФО в регионы страны, где ранее бруцеллез сельскохозяйственных животных и людей не регистрировался, либо уровень заболеваемости был спорадическим. Возникает высокая вероятность несанкционированной торговли продукцией животноводства на стихийных рынках, в том числе с использованием возможностей нестационарной и мобильной торговли.

В условиях действия экономических санкций по отношению к Российской Федерации, определенную эпидемиологическую настороженность вызывает вероятная переориентация как торговых сетей, так и отдельных специализированных предприятий и предпринимателей на новых поставщиков животноводческой продукции из стран Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу КРС и МРС, что, в свою очередь, потребует скоординированных действий ветеринарной и санитарно-эпидемиологической служб по контролю поступающей продукции на потреби-

тельский рынок.

С учетом обозначенных выше факторов, которые в случае их реализации могут негативно повлиять на эпидемиологическую ситуацию по бруцеллезу в стране, можно прогнозировать уровень заболеваемости бруцеллезом в 2015 г. в пределах 370–420 случаев.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнева С.И., Тихенко Н.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1(115):21–4.
2. Лямкин Г.И., Головнева С.И., Худолеев А.А., Чеботарева Е.Н., Шакирова Л.И., Куличенко А.Н. Обзор эпизоотической и эпидемической ситуации по бруцеллезу в российской федерации в 2013 г. и прогноз на 2014 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2(116):29–32.
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2014 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия (сайт). URL: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=2938](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938) (дата обращения 10.03.2015).
4. Эпизоотическая ситуация в РФ. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (сайт). URL: <http://fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html> (дата обращения 10.03.2015).

## References

1. Lyamkin G.I., Manin E.A., Golovneva S.I., Tikhenco N.I., Kulichenko A.N. [Epidemiologic situation on brucellosis in the Russian Federation in 2012 and prognosis for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1(115):21–4.
2. Lyamkin G.I., Golovneva S.I., Khudoleev A.A., Chebotareva E.N., Shakirova L.I., Kulichenko A.N. [Survey of epizootologic and epidemiologic situation on brucellosis in the Russian Federation in 2013; Prognosis for 2014]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:29–32.
3. [Infectious morbidity in the Russian Federation over the period of January–December 2014] (cited 10 Mar 2015). Available from: [http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=2938](http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=2938).
4. [Epizootiological situation in the territory of the Russian Federation] (cited 10 Mar 2015). Available from: <http://fsvps.ru/fsvps/iac/rf/reports.html>.

## Authors:

Lyamkin G.I., Khudoleev A.A., Khachaturova A.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

## Об авторах:

Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Поступила 20.03.15.

А.А.Нафеев, П.Г.Вовкотеч, А.Н.Хайсарова

**СВЯЗЬ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ  
ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ  
И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ***ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», Ульяновск, Российская Федерация*

На основании проведенного ретроспективного анализа заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом (ГЛПС) и эпизоотологических данных численности и инфицированности мышевидных грызунов установлено изменение эпидемического потенциала природных очагов ГЛПС, что требует пересмотра объемов, форм и целей профилактических и противоэпидемических мероприятий. Цикличность колебаний численности мелких млекопитающих на территории Ульяновской области в среднем составляет 3 года. С 2011 по 2013 год наблюдалась разлитая депрессия среди грызунов. В этот период отмечалось снижение доли основного носителя (резервуара-хранителя) хантавирусов – рыжей полевки. Это послужило ведущим фактором в снижении активности эпидемического процесса, что проявилось снижением заболеваемости населения. Процессы, происходящие среди мышевидных грызунов, являются определяющими факторами в развитии эпидемического процесса, который формирует эпидемиологическую ситуацию по ГЛПС на территории субъекта.

*Ключевые слова:* геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусы, эпидемический процесс, эпизоотический процесс, мышевидные грызуны.

A.A.Nafeev, P.G.Vovkotech, A.N.Khaisarova

**Interdependence between Epizootic Activity of Natural Foci of Hemorrhagic Fever  
with Renal Syndrome (HFRS) and Epidemiological Situation in the Ulyanovsk Region***Center of Hygiene and Epidemiology in the Ulyanovsk Region, Ulyanovsk, Russian Federation*

Based on the results of retrospective analysis of HFRS morbidity and epizootiological data on the numbers and contamination of mouse-like rodents, revealed has been epidemic potential shift of the HFRS foci. It requires reconsideration of the scope, format, and objectives of preventive and anti-epidemic activities. Periodicity of fluctuations in the numbers of small mammals, habitant in the territory of the Ulyanovsk Region, makes up three years on average. Since 2011 up to 2013 generalized depression in the abundance rates was observed. The period was marked by the reduction of the segment of main Hantavirus carrier – common red-backed vole. It was the key factor for epidemic process activity decrease, which in its turn resulted in the decrease of morbidity rates among the population. Therewith, the transformations that affect the population of mouse-like rodents are the determinative factors in the evolution of epidemic process which shapes epidemiological situation on HFRS in the territory of the constituent entity.

*Key words:* hemorrhagic fever with renal syndrome, Hantaviruses, epidemic process, epizootic process, mouse-like rodents.

В последнее десятилетие в Российской Федерации отмечается активизация природных очагов ряда зоонозов, в частности туляремии (2013 г. – вспышка в Ханты-Мансийском автономном округе, заболело более 1 тыс. человек), геморрагической лихорадки с почечным синдромом (2008 г. – 9595 заболевших), клещевого вирусного энцефалита (2009 г. – 3721), иксодовых клещевых боррелиозов (2011 г. – 9597). Поэтому природно-очаговые инфекционные болезни, ввиду отсутствия по некоторым из них (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, иксодовые клещевые боррелиозы и др.) специфических средств профилактики (иммунизация), постоянно остаются одной из актуальных проблем в системе эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в Российской Федерации. Функционирование природных очагов инфекционных болезней имеет тесную связь с состоянием природной среды, изучение которой составляет основу экологического мониторинга.

В последние годы наблюдается формирование городских (урбанических) очагов, территориально связанных с активными природными очагами инфек-

ционных болезней. Так, на территории Ульяновской области наибольший интерес в изучении происходящих эпидемиологических изменений представляет, в первую очередь, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), природные очаги которой располагаются на территории всех 24 административных образований. В данном сообщении приведены результаты эпидемиологического ретроспективного анализа проявлений ГЛПС с 2008 по 2013 годы.

**Материалы и методы**

В статье использованы зоологические и эпидемиологические материалы, полученные за 6 лет (2008–2013 гг.). В качестве эпидемиологического показателя использовали абсолютное число заражений людей. Анализ случаев заболеваемости ГЛПС проводили с учетом регистрации их в статистических формах Госкомстата № 1, 2.

Зоологические и эпизоотологические исследования проводили в пунктах многолетних наблюдений. Показателем численности мышевидных гры-

зунов служил процент их попаданий в орудия лова. Учеты численности проводили 2 раза в год (апрель, октябрь). О сроках начала размножения судили по состоянию генеративных органов самок.

Добытых зверьков исследовали на присутствие хантавирусного антигена в легких непрямым методом иммунофлуоресценции. Наличие в организме зверьков антигена служило критерием оценки их инфицированности хантавирусами ГЛПС. В работе использовали общепринятые для диагностики хантавирусов методы [2] и коммерческие тест-системы Хантагност производства ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова».

Всего за 2008–2013 гг. было выставлено более 17000 ловушко-суток, количество отловленных грызунов составило 4814, в том числе 2183 (45,3 %) рыжей полевки – основного носителя возбудителя ГЛПС в Ульяновской области. Общий процент попадания мышевидных грызунов в орудия лова составил 28,1. Инфицированность рыжих полевок хантавирусом составила 5,5 %, прочих зверьков – 3,8.

### Результаты и обсуждение

Особенностью последних лет (2008–2013 гг.) в Ульяновской области является отсутствие регистрации вспышечной заболеваемости. По многолетним наблюдениям динамика заболеваемости ГЛПС имеет выраженный сезонный характер. Оценка проявлений эпидемического процесса ГЛПС проводили по двум периодам – 2008–2010 и 2011–2013 гг.

В период с 2008 по 2010 год в Ульяновской области зарегистрировано 594 случая заболевания ГЛПС (среднеобластной показатель 15,06 на 100 тыс. населения); с 2011 по 2013 год – 502 случая (среднеобластной показатель 12,99 на 100 тыс. населения). Снижение составило 15,5 %.

В работах многих авторов 80-х годов указывалось, что в повышении эпизоотической активности очагов ГЛПС увеличение численности носителей не всегда имеет первостепенное значение. Ряд авторов [1, 3], характеризуя эпидемический процесс хантавирусной инфекции в очагах Европейской территории России, отмечают зависимость пространственно-временных различий его активности от характера эпизоотического процесса в популяциях грызунов – носителей возбудителя инфекции – и ландшафтной структуры очага.

Для анализа зарегистрированной заболеваемости ГЛПС нами выбраны 12 административных территорий (таблица).

Из таблицы видно, что наибольшие изменения произошли в Павловском районе – рост заболеваемости с 4,3 до 17,8 на 100 тыс. населения и Новомалыклинском районе – снижение заболеваемости с 33,8 до 7,5 на 100 тыс. населения.

При воздушно-пылевом и алиментарном путях передачи возбудителя ГЛПС заболеваемость прямо зависит от численности источников хантавирусов,

а эпидемическая ситуация при ГЛПС определяется интенсивностью эпизоотического процесса среди грызунов [4]. Наши данные подтверждают мнение этих специалистов. Так, в 2011–2013 гг. произошло общее снижение численности мышевидных грызунов в отловах на 38,3 %. Еще существеннее уменьшилась численность рыжей полевки – на 57,5 %. На этом фоне в Мелекесском и Ульяновском районах заболеваемость населения ГЛПС упала в 1,6 раза. Уменьшилось и количество населенных пунктов с больными людьми, например, в Мелекесском районе с 13 до 7.

Выявить четкую зависимость эпидемической ситуации от интенсивности заражения грызунов вирусом ГЛПС по нашим материалам не удалось. Так, в Ульяновске при интенсивности заражения грызунов 8,7 % в 2008–2010 гг. выявлено 167 человек, инфицированных вирусом ГЛПС, а в 2011–2013 гг. – 172 человека при зараженности зверьков 1,1 %.

Цикличность колебаний численности мелких млекопитающих на территории Ульяновской области в среднем составляет 3 года. В 2011–2013 гг. наблюдалась депрессия численности грызунов. В этот период отмечалось снижение доли в отловах основного носителя хантавирусов – рыжей полевки. Вероятно, это послужило ведущим фактором в снижении эпизоотической активности очагов ГЛПС в ряде районов области, что, в итоге, проявилось уменьшением заболеваемости населения.

Таким образом, процессы, происходящие в по-

Активность эпидемического процесса ГЛПС в административных образованиях Ульяновской области

Административные территории	Заболеваемость (средний показатель на 100 тыс. населения за 2008–2010 гг.)	Заболеваемость (средний показатель на 100 тыс. населения за 2011–2013 гг.)	Рост +, снижение - (раз) Ландшафт
Ульяновск	8,8	9,0	+1,02 Лесостепной
Барышский район	29,7	50,1	+1,7 Лесостепной
Инзенский район	19,2	29,6	+1,5 Лесной
Мелекесский район	91,0	54,9	-1,6 Лесостепной
Новомалыклинский район	33,8	7,5	-4,5 Остепненный
Новопасский район	4,4	10,5	+2,4 Лесостепной
Павловский район	4,3	17,8	+4,1 Лесной
Сенгилеевский район	14,6	37,1	+2,5 Лесостепной
Старомалыклинский район	55,0	19,9	-2,7 Лесной
Сурский район	33,6	11,8	-2,8 Лесостепной
Ульяновский район	17,5	10,9	-1,6 Лесостепной
Цильнинский район	10,7	3,6	-2,9 Остепненный

пуляциях мышевидных грызунов, являются определяющими факторами в развитии эпизоотического процесса в природных очагах ГЛПС, и, как следствие, формируют эпидемиологическую ситуацию по ГЛПС на территории Ульяновской области. Не исключается, что спад эпизоотической активности очага ГЛПС могут вызывать и такие факторы, как увеличение популяционной инфекционной чувствительности носителей или изменение биологических свойств самих хантавирусов, что требует дальнейшего изучения.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бернштейн А.Д., Апекина Н.С., Михайлова Т.В., Мясников Ю.А., Хляп Л.А., Коротков Ю.С., Гавриловская И.Н. Хантавирусная инфекция у диких грызунов – природных резервуаров. Характеристика инфекционного процесса. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2001; 3:22–6.
2. Методы лабораторной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом: Метод. рекомендации. М.; 1982.
3. Нафеев А.А., Шемятихина Г.Б. Эколого-эпидемиологи-

ческие подходы к надзору за геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 1:49–50.

4. Рябов С.В., Попов Н.В. Оценка эпизоотической активности природных очагов геморрагической лихорадки с почечным синдромом и прогноз заболеваемости. *Мед. алфавит. Эпидемиол. и гиг.* 2012; 3:9–14.

#### References

1. Bernshtein A.D., Apekina N.S., Mikhailova T.V., Myasnikov Yu.A., Khlyap L.A., Korotkov Yu.S., Gavrilovskaya I.N. [Hantavirus infection in wild rodents – the natural reservoirs. Characteristics of the infection progress]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2001; 3:22–6.
2. [Methods for the laboratory diagnostics of hemorrhagic fever with renal syndrome: Methodological recommendations]. M.; 1982.
3. Nafeev A.A., Shemyatikhina G.B. [Ecological-epidemiological approaches to the surveillance over hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 1:49–50.
4. Ryabov S.V., Popov N.V. [Assessment of epizootic activity of natural HFRS foci and forecasting of the morbidity rates]. *Med. Alfavit. Epidemiol. Gigiena.* 2012; 3:9–14.

#### Authors:

Nafeev A.A., Vovkotch P.G., Khaisarova A.N. Center of Hygiene and Epidemiology in the Ulyanovsk Region. 5, Pushkareva St., Ulyanovsk, 432005, Russian Federation. E-mail: nva@mv.ru

#### Об авторах:

Нафеев А.А., Вовкотеч П.Г., Хайсарова А.Н. Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области. Российская Федерация, 432005, Ульяновск, ул. Пушкарёва, д. 5. E-mail: nva@mv.ru

Поступила 19.05.14.



Н.А.Остапенко<sup>1</sup>, М.Г.Соловьева<sup>1</sup>, А.А.Казачинин<sup>1</sup>, И.И.Козлова<sup>2</sup>, Н.М.Файзуллина<sup>2</sup>, Е.Б.Ежлова<sup>3</sup>

## О ВСПЫШКЕ ТУЛЯРЕМИИ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ХАНТЫ-МАНСИЙСКА И ХАНТЫ-МАНСИЙСКОГО РАЙОНА В 2013 г.

<sup>1</sup>Управление Роспотребнадзора по Ханты-Мансийскому автономному округу – Югре, Ханты-Мансийск, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре», Ханты-Мансийск, Российская Федерация; <sup>3</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация

Природные очаги туляремии на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры сохраняют активность и жизнеспособность несмотря на удлинившиеся периоды эпидблагополучия. Резервуаром возбудителя является водяная полевка. В последние годы возбудитель туляремии обнаруживается у красной полевки и бурозубки. На территориях наиболее активных очагов расположены Ханты-Мансийск, Березовский, Ханты-Мансийский, Кондинский и Октябрьский районы. Крупные вспышки заболеваемости среди населения происходят с периодичностью до 30 лет. Трансмиссивный характер вспышек обуславливает их масштабность и интенсивность. Риск заражения подвержены все группы населения, независимо от возраста и профессии, включая детей до 1 года. В статье дано описание вспышки туляремии среди населения Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района в июле–октябре 2013 г. с числом пострадавших 1005 случаев. Приведен краткий ретроспективный анализ эпидситуации по туляремии в Ханты-Мансийском округе с 30-х годов прошлого века до начала вспышки. Представлен опыт организации противоэпидемических мероприятий по ликвидации вспышки туляремии.

**Ключевые слова:** туляремия, природный очаг, вспышка, вакцинопрофилактика, дезинфекционные мероприятия.

N.A.Ostapenko<sup>1</sup>, M.G.Solov'eva<sup>1</sup>, A.A.Kazachinin<sup>1</sup>, I.I.Kozlova<sup>2</sup>, N.M.Faizullina<sup>2</sup>, E.B.Ezhlova<sup>3</sup>

## Tularemia Outbreak among the Population of Khanty-Mansiisk and the Khanty-Mansiisk Region, Occurred in 2013

<sup>1</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra, Khanty-Mansiisk, Russian Federation; <sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra, Khanty-Mansiisk, Russian Federation; <sup>3</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

Natural tularemia foci in the territory of the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra are still active and sustainable ones despite of the extended periods of epidemiological welfare. Agent reservoir is the water vole. However, recently tularemia agent has been detected in the northern red-backed vole and common red-toothed shrew. Khanty-Mansiisk town, Berezhovsky, Khanty-Mansiisk, Kondinsky, and Otktyabr'sky Regions are situated in the territory of the most active foci. Serious outbreaks of infection among the population occur with an interval up to 30 years. Their transmissibility preconditions the scale and intensiveness. All cohorts are under the risk of exposure, irrespective of the age and occupation, including the infants. The paper discusses tularemia outbreak impact on the population of Khanty-Mansiisk and the Khanty-Mansiisk Region in July-October, 2013. Casualty toll is 1005 cases. Given is a brief retrospective analysis of epidemiological situation on tularemia since 1930-s up to the onset of the outbreak under investigation. Described is the experience in management of the response activities.

**Key words:** tularemia, natural focus, outbreak, preventive vaccination, disinfection activities.

Ханты-Мансийский автономный округ расположен в природном очаге туляремии пойменно-болотного типа, приуроченного к поймам рек Обь и Иртыш. Основным резервуаром и источником считаются водяная полевка, ондатра. Инфекцию распространяют комары. Многолетняя динамика заболеваемости с 30-х годов характеризуется достоверной тенденцией снижения со средней скоростью 1,4 % в год ( $t = 8,7$ ;  $P > 0,99$ ), которая обусловлена снижением амплитуды циклических подъемов заболеваемости и удлинением интервалов между ними. В период 1930–1950 гг. подъемы происходили через 3–4 года, максимальные показатели колебались от  $(111,4 \pm 8,9)$  до  $(194,5 \pm 14,5) \text{‰}_{0000}$ . С конца 50-х годов прошлого века в многолетней динамике (рис. 1) произошло удлинение периодичности циклов до 30 лет и интер-

валов между циклами до 20 лет, максимальные показатели составляли от  $(72,3 \pm 7,5)$  до  $(40,5 \pm 4,6) \text{‰}_{0000}$ . В межэпидемические периоды заболеваемость регистрировалась на спорадическом уровне или в виде небольших (до 26 случаев) вспышек.

За 1950–2012 гг. заболеваемость зарегистрирована в 15 из 22 муниципальных образований округа. Исходя из уровня заболеваемости, можно выделить следующие зоны:

- высокого риска развития вспышек – территории 5 муниципальных районов, где зарегистрировано 93,4 % случаев туляремии за указанный период времени (Ханты-Мансийск – 31,2 %, Кондинский – 24,3, Березовский – 17,7, Ханты-Мансийский – 11,8, Октябрьский – 8,4 районы);

- умеренного риска – Нижневартовск и Сургут-



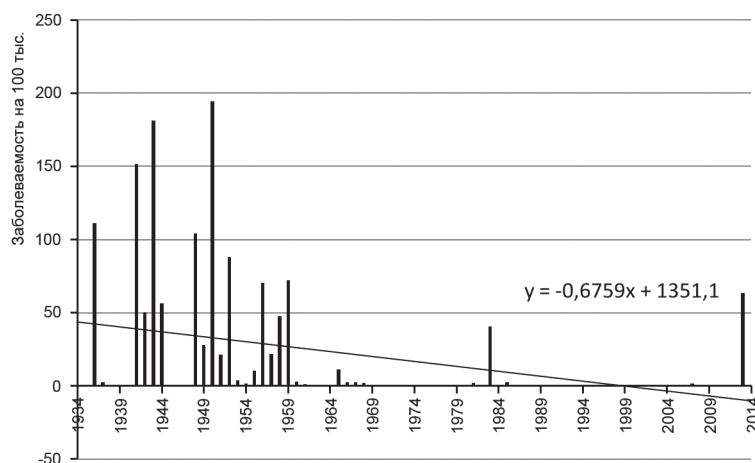


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости туляремией в Ханты-Мансийском автономном округе за период 1934–2013 гг.

ский район, где суммарно зарегистрировано 4,8 % случаев;

- низкого риска – территории 8 муниципальных образований, где регистрируются единичные (от 1 до 6) случаи заболевания (Нефтеюганский, Советский, Нижневартовский, Белоярский районы, города Сургут, Урай, Нефтеюганск, Мегион);

- свободные от туляремии – территории 7 муниципальных образований, где на текущий момент не зарегистрировано ни одного случая туляремии (города Нягань, Когалым, Радужный, Лангепас, Пыть-Ях, Югорск, Покачи).

В августе–сентябре 2013 г. в Ханты-Мансийске и Ханты-Мансийском районе произошла очередная крупная вспышка туляремии с трансмиссивным механизмом передачи. Целью работы является описание вспышки, оценка предвестников эпидемиологического неблагополучия, организации противоэпидемических мероприятий по ликвидации эпидемиологического неблагополучия и их эффективности.

### Материалы и методы

Проанализированы данные государственных статистических форм № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» за 20-летний период, № 60 «Журнал учета инфекционных заболеваний», № 357/у «Карты эпидемиологического обследования очага инфекционного заболевания», материалы оперативного эпидемиологического анализа вспышки и ретроспективного анализа заболеваемости туляремией, оперативные отчеты учреждений здравоохранения, органов власти муниципальных образований, дезинфекционных предприятий, представляемые в период вспышки, нормативно-методические документы, разработанные Управлением Роспотребнадзора по ХМАО–Югре. Использованы результаты эпизоотологических и лабораторных исследований, проведенных Центром гигиены и эпидемиологии в ХМАО–Югре, Иркутским противочумным институтом, Тюменским НИИ краевой инфекционной патологии, ГНЦ ПМБ (Оболенск).

Анализ отчетов проводился по специально раз-

работанным таблицам, статистическая обработка данных проведена с использованием программ Excel, ПС «Анализ популяционной заболеваемости».

### Результаты и обсуждение

В течение 20 лет (1993–2012 гг.), предшествующих вспышке, заболеваемость туляремией находилась на низком уровне, зарегистрировано 34 случая туляремии в 5 муниципальных образованиях автономного округа, в том числе 1 групповой очаг (пгт. Березово в 2007 г. – 22 случая). В 2010–2011 гг. в Ханты-Мансийске наблюдалось нашествие в город огромного количества водяной полевки. По данным эпизоотологических наблюдений в течение 5 лет произошло изменение структуры их видового состава: если в 2010 г. удельный вес рыжей полевки в структуре отловленных грызунов составлял 72,1 %, красной полевки – соответственно 27,9, то к 2013 г. это соотношение постепенно изменилось, доля красной полевки составила 92,4 %, рыжей полевки – 7,6. В ходе зоологических исследований в 2008–2013 гг. не отловлено ни одного экземпляра водяной полевки.

В ходе эпизоотологического мониторинга в целом по округу отмечалось нарастание с 2009 г. удельного веса грызунов, серопозитивных к туляремии, с 0,0 до 23,6 %. Непосредственно в Ханты-Мансийске и Ханты-Мансийском районе подобной тенденции не наблюдалось (таблица).

В 2010 г. миграция грызунов через Ханты-Мансийск, обнаружение серопозитивных к туляремии грызунов были расценены как предвестники эпиднеблагополучия, в связи с чем изданы постановление Главного государственного санитарного врача по ХМАО–Югре № 5/П от 7 мая 2010 г. «О мерах по борьбе с грызунами и профилактике заболеваемости туляремией в ХМАО–Югре», постановление главного государственного санитарного врача по Ханты-Мансийску и Ханты-Мансийскому району № 3/П от 27 апреля 2010 г. «О мерах по профилактике заболеваемости туляремией в г. Ханты-Мансийске и Ханты-Мансийском районе», регламентирующие противоэпидемические мероприя-

Результаты исследований мелких грызунов на антитела к туляремии

Территория	2009 г.			2010 г.			2011 г.			2012 г.			2013 г.		
	всего исследовано (абс.)	имеют антитела (абс.)	%	всего исследовано (абс.)	имеют антитела (абс.)	%	всего исследовано (абс.)	имеют антитела (абс.)	%	всего исследовано (абс.)	имеют антитела (абс.)	%	всего исследовано (абс.)	имеют антитела (абс.)	%
ХМАО–Югра	61	0	0	131	17	13,0	120	30	25,0	120	44	36,6	317	75	23,6
Ханты-Мансийск	5	0	0	8	3	37,5	11	2	18,2	27	13	48,1	133	21	15,8
Ханты-Мансийский район	5	0	0	31	7	22,6	10	0	0	17	0	0	87	9	10,4

тия. Правительством автономного округа в 2011 г. изданы распоряжение «О профилактике природно-очаговых инфекций с трансмиссивным механизмом передачи» с финансированием в объеме 20 млн руб., а в 2013 г. – постановление «Об организации мероприятий по проведению дезинфекции, дезинсекции и дератизации в ХМАО–Югре», определившее системный порядок проведения дезинфекционных работ в природном очаге. В 2013 г. для этих целей из окружного бюджета выделены денежные средства в сумме 68 млн руб.

В то же время, на фоне длительного отсутствия заболеваемости, происходило снижение объемов иммунизации. В связи с отказами населения от профилактических прививок принимались заниженные планы, выполнение их составляло от 20 до 60 %. В результате иммунная прослойка на начало 2013 г. по Ханты-Мансийску составляла 21 %, по Ханты-Мансийскому району – 68.

В период с 25 июля по 23 сентября 2013 г. (по датам регистрации – с 19 августа по 15 октября) в округе произошла трансмиссивная вспышка туляремии с числом пострадавших 1005 человек ( $63,4 \pm 3,9$ ) ‰. Переносчиками послужили кровососущие комары рода *Aedes*, источниками – грызуны (красные полевки, бурозубки).

Всем больным при обращении за медицинской помощью установлена средняя степень тяжести, ulcerогландулярная форма – 1004 больным, glandулярная форма – 1 больному. Заболевание проявлялось повышением температуры от 38,0 до 40,0 °C, ознобом, слабостью, ломотой в теле. Несколько человек отмечали диарею и рвоту. Через 3–4 дня после начала лихорадки у всех больных отмечалось увеличение и болезненность паховых, подмышечных, подчелюстных или шейных лимфоузлов. У многих больных наблюдался гиперемизированный след от укуса диа-

метром 7–20 мм с просветлением в центре, у некоторых – язвочка или вскрывшийся фурункул.

Первому заболевшему диагноз поставили через 24 дня после обращения за медицинской помощью. На момент направления первого экстренного извещения на случай туляремии (19 августа) количество заболевших составляло уже 89 чел., обратившихся за медицинской помощью – 15.

Максимальное число обратившихся (79 чел.) наблюдалось 26 августа, после чего стало постепенно уменьшаться, однако вспышка продолжалась до окончания сезона вылета комаров. Последний случай заболевания отмечен 23 сентября, обращения за медицинской помощью продолжались до 15 октября (рис. 2).

Эпицентром вспышки явился Ханты-Мансийск, где выявлено 955 больных, ( $1061,9 \pm 34,2$ ) ‰. Также заболевания зарегистрированы в 10 населенных пунктах Ханты-Мансийского района, расположенных вдоль р. Обь на расстоянии до 100 км ниже и выше по течению от Ханты-Мансийска; всего выявлено 37 случаев ( $231,3 \pm 37,9$ ) ‰. Зарегистрирован 1 случай на р. Иртыш в п. Горноправдинск, расположенном на расстоянии 100 км выше по течению от Ханты-Мансийска.

При анализе мест заражения установлено, что 34,8 % заболевших не покидали пределов города, остальные заразились на рыбалке, при посещении дач или мест отдыха в радиусе до 25 км от города.

В эпидемический процесс вовлечены все возрастные группы, в том числе в допрививочном возрасте (до 7 лет) – 56 детей ( $616,2$  ‰), из них в возрасте до 1 года – 3, 1–2 лет – 15. Наиболее высокая заболеваемость зарегистрирована в возрастных группах 50–59 ( $1407,36$  ‰) и 70–79 лет ( $1396,9$  ‰). Заболеваемость школьников составила  $1028,1$  ‰.

Прививку в течение 5 последних лет имели 5 че-

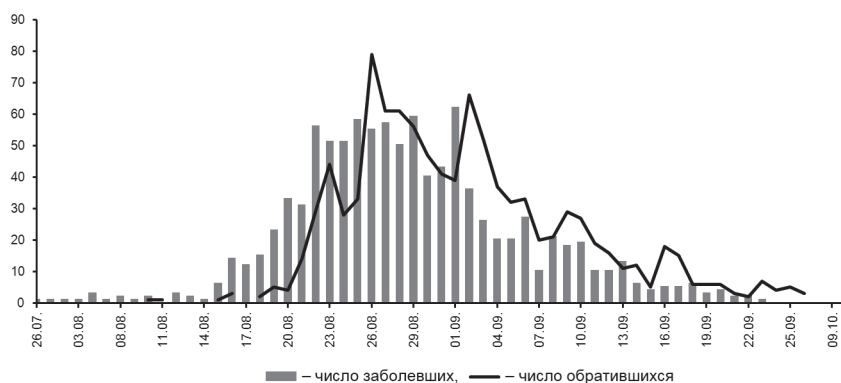


Рис. 2. Динамика заболеваемости туляремии в Ханты-Мансийском автономном округе (июль–октябрь 2013 г.)

людей из числа заболевших туляремией.

В результате исследований, проведенных ФБУН ГНЦ ПМБ, от 6 пациентов выделили культуру туляремийного микроба, принадлежащую к подвиду *holarctica*, тот же возбудитель выделен от 4 грызунов (красная полевка, бурозубка) – 16,7 % от общего числа исследованных животных. Специфические антитела к туляремийному микробу обнаружены у 43,6 % исследованных грызунов (Иркутский противочумный институт). Лабораторией Тюменского НИИ краевой инфекционной патологии в 7 пулах из 10 (ПЦР) обнаружен туляремийный микроб. В воде открытых водоемов следов инфекционного материала не обнаружено (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Таким образом, причинами вспышки туляремии являются постоянно существующие природные факторы риска (расположение в природном очаге туляремии), эпизоотия среди грызунов, природно-климатические особенности 2013 г., связанные с большим разливом и длительным стоянием воды. Позднее наступление весны и сдвиг периода высоких температур привели к одномоментности развития генераций. В период жаркой погоды в теле самок комаров сократились сроки созревания яиц, поэтому они сделали больше кладок, чем обычно. Большее число кровососаний привело к повышению возможности встречи самки комара с зараженным прокормителем и передачи возбудителя здоровой особи.

С целью организации противоэпидемических мероприятий Управлением Роспотребнадзора по ХМАО–Югре экстренно принят ряд нормативно-правовых актов, регламентирующих работу задействованных ведомств по локализации вспышки: распоряжение № 6/р от 19.08.2013 «О неотложных мерах по недопущению распространения туляремии на территории г. Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района», оперативный план по ликвидации групповой заболеваемости, утвержденный главами муниципальных образований Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района. Постановлением Главного государственного санитарного врача по Ханты-Мансийскому автономному округу № 9 от 25.08.2013 «Об усилении мероприятий по профилактике заболеваемости туляремией в ХМАО–Югре» всем муниципалитетам рекомендовано усилить профилактическую работу по туляремии.

После заседания межведомственной СПЭК при Правительстве ХМАО–Югры (постановление № 2 от 22.08.2013) распоряжением Правительства ХМАО–Югры № 444-рп выделено 5 млн руб. для проведения противоэпидемических мероприятий. Кроме того, средства выделены из муниципальных бюджетов Ханты-Мансийска (3,5 млн) и Ханты-Мансийского района (1,5 млн). Распоряжениями администраций Ханты-Мансийска № 218-р от 22.08.2013, п. Луговское Ханты-Мансийского района № 134-р от 29.08.2013 введен режим чрезвычайной ситуации в указанных населенных пунктах. Координация мероприятий и контроль их выполнения осуществлялся в

ежедневном режиме окружным штабом по ликвидации вспышки.

Вакцинация против туляремии позиционировалась как один из основных способов локализации вспышки. В экстренном порядке Департаментом здравоохранения закуплен тулярин, массовая иммунизация по эпидемическим показаниям населения города и района начата с 24 августа. Разработаны и утверждены главами муниципальных образований планы-графики вакцинации. В окружной больнице работали 3 стационарных прививочных кабинета с 8.00 до 20.00 без выходных, сформирована 41 прививочная бригада, к работе привлечены диспансеры и центр Анти-СПИД, 5 бригад из других муниципалитетов округа. Направлено обращение главного государственного санитарного врача по округу к руководителям организаций и предприятий Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района, письмо генеральному директору ООО «РН-Юганскнефтегаз» по защите лиц, работающих на месторождениях. На расширенном совещании руководителей учреждений и предприятий города обсуждена эпидемическая обстановка и перечень неотложных мер. Проведены родительские собрания для получения письменных согласий на прививку. В адрес руководителей организаций, где наблюдалась низкая явка на прививку, направлены письма.

Несмотря на высокую заболеваемость и беспрецедентную по масштабам информационную работу, у населения отмечалась низкая активность и множество отказов от прививок. За 2 мес. в Ханты-Мансийске и Ханты-Мансийском районе проведено 26596 туляриновых проб, привито – 20560 чел. Охват прививками населения на момент окончания вспышки в Ханты-Мансийске составил 53,4 %, в Ханты-Мансийском районе – 93,4.

Учитывая трансмиссивный характер вспышки, были приняты меры по снижению летающих форм кровососущих насекомых. Дезинсекция проводилась на территориях ДОУ, предприятий, мест массового отдыха за городом. Всего обработано 1555,37 га. Несмотря на проведенные мероприятия, укусы комарами продолжались вплоть до заморозков.

Дератизационные обработки в Ханты-Мансийске проведены на площади 1360,23 га, в том числе проведена барьерная дератизация по периметру города, обработаны места массового отдыха за пределами города, периметры садово-огородных кооперативов, адреса, где зафиксированы заражения людей, ДОУ, предприятия торговли и склады. В Ханты-Мансийском районе в августе дератизация проведена в 19 населенных пунктах, расположенных вдоль р. Обь на площади 324,84 га.

В ходе внеплановых проверок выполнения мероприятий по борьбе с грызунами, организованных Управлением Роспотребнадзора по ХМАО–Югре, на 41 объекте зафиксированы административные правонарушения. Контроль дератизационных мероприятий в природном очаге на территории Ханты-

Мансийского района показал низкую эффективность проводимых обработок. Информация о нарушениях направлена в администрацию Ханты-Мансийска и района, заместителю Губернатора автономного округа и озвучена на заседании оперативного штаба.

В сентябре издано постановление главного государственного санитарного врача по Ханты-Мансийскому автономному округу – Югре «О проведении сплошной дератизации на территории г. Ханты-Мансийска», разработан и утвержден Управлением Роспотребнадзора «Алгоритм проведения сплошной двукратной дератизации и однократной дезинсекции объектов на территории города Ханты-Мансийска». При проведении контроля эффективности сплошной дератизации, в ходе которой обработано 187,398 га, повторно выявлена высокая численность грызунов (до 26 особей на ловушко-сутки).

С целью информирования населения о методах и способах профилактики заражения напечатано 4000 листовок, которые были наклеены на афишных тумбах, остановках, в подъездах, привлечены управляющие домовые компании, раздавались населению с участием работников ДПС. Проводилась работа в социальных сетях, на форуме Ханты-Мансийска.

Произошедшая вспышка свидетельствует о том, что туляремия остается весьма актуальной проблемой для Ханты-Мансийского автономного округа и требует пристального и постоянного внимания, совершенствования эпизоотологического мониторинга, проведения дальнейших научных исследований для более точного прогнозирования возникающих рисков и проведения упреждающих мероприятий.

Таким образом, с конца 50-х годов прошлого столетия динамика заболеваемости туляремией в Ханты-Мансийском округе имеет достоверную тенденцию снижения. Произошло удлинение периодов между циклами эпидемического процесса с 3–4 до 20 лет, снижение максимальных показателей заболеваемости в периоды подъемов в 2,8 раза.

Риску заражения подвержены все группы населения, независимо от возраста и профессии, включая детей до 1 года, что характерно для очага пойменно-болотного типа.

Границы очага находились в пределах 100 км вдоль рек Обь и Иртыш выше и ниже по течению от

Ханты-Мансийска, включая территории внутри населенных пунктов и за их пределами в радиусе до 25 км. Территории риска – дачи, садово-огородные участки, места массового отдыха. В период последней вспышки резервуаром возбудителя туляремии в Ханты-Мансийском округе были красная полевка и бурозубки. Водяная полевка не обнаруживалась в процессе эпизоотологического мониторинга в течение 5 последних лет.

За 2 года до вспышек 1983 и 2013 гг. в городе наблюдалось нашествие грызунов, что можно считать прогностическим признаком ухудшения эпидемиологической ситуации. Проводимые дератизационные и дезинсекционные мероприятия не эффективны в силу особенностей гидрографии округа.

Длительное эпидемиологическое благополучие по туляремии и возникшее в результате этого пренебрежение возможной опасностью вызвали недооценку органами исполнительной власти и здравоохранения профилактических мер. Для изменения ситуации необходимо активизировать информационно-разъяснительную работу среди населения, регулярно проводить эпизоотологический и эпидемиологический мониторинг территорий.

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

#### Authors:

*Ostapenko N.A., Solov'eva M.G., Kazachinin A.A.* Rosпотребнадзор Administration in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra. 72, Roznina St., Khanty-Mansiisk, 628012, Russian Federation. E-mail: khanty@86.rosпотребнадзор.ru

*Kozlova I.I., Faizullina N.M.* Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra. 72, Roznina St., Khanty-Mansiisk, 628012, Russian Federation. E-mail: epid\_fgu3@xmao.su

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

#### Об авторах:

*Остапенко Н.А., Соловьева М.Г., Казачинин А.А.* Управление Роспотребнадзора по Ханты-Мансийскому автономному округу – Югре. Российская Федерация, 628012, Ханты-Мансийск, ул. Рознина, д. 72. E-mail: khanty@86.rosпотребнадзор.ru

*Козлова И.И., Файзуллина Н.М.* Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре. Российская Федерация, 628012, Ханты-Мансийск, ул. Рознина, д. 72. E-mail: epid\_fgu3@xmao.su

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

Поступила 30.06.14.



А.Ю.Попова<sup>1</sup>, Е.Б.Ежлова<sup>1</sup>, Ю.В.Демина<sup>1</sup>, Л.И.Шапошникова<sup>2</sup>, И.Л.Евстафьев<sup>3</sup>, Н.Н.Товпинец<sup>3</sup>,  
Е.С.Котенёв<sup>2</sup>, А.С.Волинкина<sup>2</sup>, Я.В.Лисицкая<sup>2</sup>, И.В.Самарина<sup>2</sup>, О.А.Белова<sup>2</sup>, Н.В.Цапко<sup>2</sup>,  
У.М.Ашибок<sup>2</sup>, Д.С.Агапитов<sup>2</sup>, Т.Н.Самодед<sup>3</sup>, А.Н.Куличенко<sup>2</sup>

## ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В КРЫМСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ОБСЛЕДОВАНИЯ В 2014 г.

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе», Симферополь, Российская Федерация

Территория Крымского полуострова является эндемичной по многим природно-очаговым инфекциям. В работе представлены результаты эпизоотологического обследования 8 административных районов Крымского федерального округа (КФО). Осуществлен учет численности мелких млекопитающих и иксодовых клещей, определен их видовой состав, проведен отбор проб полевого материала и лабораторные исследования на наличие возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. Установлено, что доминирующим видом клещей в сборах весной является *H. marginatum*, доминирующим видом мелких млекопитающих – мышь домовая. В сборах осенью преобладают *H. punctata* и полевка обыкновенная. Результаты лабораторного исследования полевого материала свидетельствуют о циркуляции на территории КФО возбудителей лихорадки Ку, клещевых пятнистых лихорадок, иксодового клещевого боррелиоза, грануляционного анаплазмоза человека, моноцитарного эрлихиоза человека, геморрагической лихорадки с почечным синдромом и лептоспироза.

**Ключевые слова:** эпизоотическая ситуация, природно-очаговые инфекции, иксодовые клещи, грызуны, насекомоядные, Крымский федеральный округ.

A.Yu.Popova<sup>1</sup>, E.B.Ezhlova<sup>1</sup>, Yu.V.Demina<sup>1</sup>, L.I.Shaposhnikova<sup>2</sup>, I.L.Evstaf'ev<sup>3</sup>, N.N.Tovpinets<sup>3</sup>, E.S.Kotenev<sup>2</sup>,  
A.S.Volynkina<sup>2</sup>, Ya.V.Lisitskaya<sup>2</sup>, I.V.Samarina<sup>2</sup>, O.A.Belova<sup>2</sup>, N.V.Tsapko<sup>2</sup>, U.M.Ashibokov<sup>2</sup>, D.S.Agapitov<sup>2</sup>,  
T.N.Samoded<sup>3</sup>, A.N.Kulichenko<sup>2</sup>

## Epizootic Situation in the Crimean Federal District as Follows from Epidemiological Survey Results, 2014

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the City of Federal Significance Sevastopol, Simferopol, Russian Federation

The territory of the Crimean Peninsula is an endemic one as regards various natural-focal infections. The paper contains the data on epizootiological survey of 8 administrative regions of the Crimean Federal District (CFD). Carried out has been small mammals and Ixodidae ticks census. Identified is their species composition. Performed have been the field samples collection and laboratory studies for the presence of bacterial and viral infection agents. Established is the fact that *H. marginatum* is a dominating species among the ticks, collected during the spring season, while the house mouse prevails among the small mammals. As for the autumn collection of samples, the dominating species are *H. punctata* and common vole, respectively. Laboratory investigation results indicate the circulation of the agents of Ku fever, tick-borne spotty fever, Ixodidae tick-borne borreliosis, human granulocytic anaplasmosis, monocytic ehrlichiosis, hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis.

**Key words:** epizootic situation, natural-focal infections, Ixodidae ticks, rodents, insectivores, Crimean Federal District.

В последнее десятилетие комплексные эпизоотологические обследования на Крымском полуострове с целью мониторинга природно-очаговых инфекций не проводились. В то же время известно, что территория Крыма эндемична по целому ряду природно-очаговых, в том числе и трансмиссивных инфекций: Крымской геморрагической лихорадке, лихорадке Ку, Марсельской лихорадке, клещевому боррелиозу (болезнь Лайма), геморрагической лихорадке с почечным синдромом, кишечному иерсиниозу, псевдотуберкулезу, клещевому энцефалиту, туляремии, лептоспирозу. Поэтому возобновление эпизоотологического мониторинга в КФО является одной из

главных задач при обеспечении эпидемического благополучия в регионе.

Основная цель данной работы – выявление природных очагов инфекционных болезней, определение их эпизоотической активности и эпидемического потенциала.

### Материалы и методы

В весенне-летний и осенний периоды 2014 г. были обследованы окрестности 26 населенных пунктов 8 административных районов (Бахчисарайского, Белогорского, Ленинского, Сак-

ского, Симферопольского, Судакского, Феодосийского и Черноморского), находящихся в различных ландшафтно-географических зонах: степной, предгорной, горной. Осуществлены учеты численности диких мелких млекопитающих, кровососущих членистоногих (иксодовых клещей), определен их видовой состав, проведены отборы проб полевого материала и лабораторные исследования на наличие возбудителей бактериальных и вирусных инфекций. Собранные в ходе эпизоотологического обследования образцы полевого материала (пулы клещей, суспензии головного мозга, легких, печени) были исследованы молекулярно-генетическим методом (ПЦР) на наличие ДНК/РНК возбудителей Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), лихорадки Ку, клещевого вирусного энцефалита (КВЭ), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), геморрагической лихорадки с почечным синдромом и лептоспироза с использованием коммерческих ПЦР-тест-систем.

### Результаты и обсуждение

За период эпизоотологического обследования с осмотренных животных и в открытых биотопах собраны иксодовые клещи (имаго и преимагинальные фазы), представленные 11 видами: *Hyalomma marginatum* – 16,8 % от общего количества иксодид, *Haemaphysalis punctata* – 31,6, *H. erinacei* – 0,2, *Rhipicephalus bursa* – 13,2, *R. turanicus* – 11,5, *R. rossicus* – 0,4, *R. sanguineus* – 0,2, *Ixodes ricinus* – 14,2, *I. redikorzevi* – 4,3, *Dermacentor marginatus* – 7,2, *D. reticulatus* – 0,4.

При обследовании районов (Черноморский, Сакский, Ленинский) КФО, находящихся в степной ландшафтной зоне, в весенне-летний период 2014 г. с крупного рогатого скота (КРС) собраны имаго *H. marginatum* и *H. punctata*. Индекс встречаемости основного переносчика возбудителя ККГЛ – имаго *H. marginatum* – на КРС составил 70,4 %, индекс обилия – 2,5. При обследовании природных биотопов на флаг собраны имаго *R. bursa* (69,3 % от общего количества), *R. turanicus* (16,0 %), *H. punctata* (14,7 %). Индекс обилия иксодид на 1 фл/км составил 30,0, что характерно для весеннего периода. В местах обитания *H. marginatum*, при отсутствии крупных прокормителей, на наблюдателя за 1 ч нападает в среднем 6 экз. имаго, что является эпидемически значимым показателем. Пик активности имаго *H. marginatum* в Крыму приходится на апрель-май, как и в других частях ареала этого вида клеща.

В весенне-летний период 2014 г. на территории горных ландшафтов (Судакский, Феодосийский районы) КФО отмечено большее видовое разнообразие иксодид, чем на территории районов степной равнинной части Крыма, что связано с расчлененно-

стью рельефа и высотной поясностью местности. В природных биотопах собраны имаго клещей 5 видов: *R. turanicus* (32,4 %), *R. bursa* (18,9 %), *H. punctata* (29,7 %), *I. ricinus* (13,5 %), *D. marginatus* (5,4 %). Индекс обилия на 1 фл/км составил 4,8. При учете на наблюдателя за 1 ч нападает в среднем 31 клещ, что является достаточно высоким показателем для этого времени года. Индекс встречаемости иксодид на домашних плотоядных (бездомные собаки) составил 100 %. Собранные клещи *R. turanicus* (98,6 %) и *H. punctata* (1,4 %).

В осенний период 2014 г. при эпизоотологическом обследовании территории Симферопольского и Белогорского районов КФО индекс встречаемости иксодид на КРС составил 100 %. Видовой состав представлен 6 видами: имаго и нимфы *H. punctata* (35,6 %), имаго *I. ricinus* (32,2 %), имаго *D. marginatus* (16,7 %), личинки и нимфы *R. bursa* (14,6 %), имаго *D. reticulatus* (0,6 %), имаго *H. marginatum* (0,3 %). С диких мелких млекопитающих (насекомоядные и грызуны) собраны 3 вида иксодовых клещей: имаго и нимфы *H. punctata* (71,1 %), имаго, личинки и нимфы *I. redikorzevi* (26,6 %), имаго и нимфы *I. ricinus* (2,3 %). Это соотношение особей разных видов иксодид характерно для осеннего периода. Имаго основного переносчика вируса ККГЛ – *H. marginatum* – в осенний период практически не встречается и лишь изредка представлено единичными экземплярами, как правило, самцами.

При эпизоотологическом обследовании территории предгорий и горных ландшафтов (Белогорский, Бахчисарайский, Симферопольский районы) в осенний период отмечено большее видовое разнообразие иксодид, чем весной на территории районов степной равнинной части Крыма (Черноморский, Ленинский, Сакский), что связано с иными ландшафтно-климатическими особенностями местности.

Состав мелких млекопитающих – носителей природно-очаговых инфекций – по данным мониторинга 2014 г. представлен 11 видами: полевка обыкновенная (*Microtus arvalis*) – 24,7 % от общего количества, полевка общественная (*Microtus socialis*) – 14,9, мышшь курганчиковая (*Mus spicilegus*) – 25,2, мышшь степная (*Sylvaeus witherbyi*) – 19,0, мышшь домовая (*Mus musculus*) – 6,4, мышшь желтогорлая (*Sylvaeus flavicollis*) – 5,3, мышшь малая лесная (*Sylvaeus uralensis*) – 0,2, хомячок серый (*Cricetulus migratorius*) – 3,5, крыса серая (*Rattus norvegicus*) – 0,2, белозубка малая (*Crocidura suaveolens*) – 0,4, белозубка белобрюхая (*Crocidura leucodon*) – 0,2 (по классификации Павленкова И.Я., Лисовского А.А., 2012 г.).

В весенне-летний период 2014 г. доминирующим видом среди мелких млекопитающих, отловленных в открытых биотопах, была мышшь домовая. Индекс доминирования этого зверька составил 44,9 %, процент попадания – 2,7. На долю полевки общественной и мышши степной приходится 25,6 и 24,3 % соответственно; при попадании их в орудия лова в 1,5 и 1,4 % случаев. Наиболее низкие показатели доми-

нирования установлены у хомячка серого и мыши курганчиковой: по 2,6 %, процент попадания – 0,2. Анализ результатов учета численности носителей показал, что в период проведения обследования она составила 6,0 %. В степных ландшафтах западного Крыма (Черноморский район) отмечен наиболее высокий процент попадания – 9,0, тогда как на территории Феодосийского (восточные горы) и Сакского (центральная степь) районов этот показатель был приблизительно одинаков и составил 5,9 и 4,7 соответственно.

В октябре 2014 г. установлено, что доминирующим видом среди мелких млекопитающих, отловленных в открытых биотопах, является полевка обыкновенная. Индекс доминирования этого зверька составил 29,9 %, процент попадания – 7,7. Доля других многочисленных видов (мыши курганчиковой и мыши степной) составила 27,0 и 18,8 % соответственно, при попадании их в орудия лова в 7,0 и 4,9 % случаев. Наиболее низкие показатели численности установлены у мыши желтогорлой и хомячка серого – 6,3 и 3,8 % соответственно, процент попадания – 1,6 и 1,0 соответственно. Остальные виды мелких млекопитающих (белозубка малая, белозубка белобрюхая, серая крыса) представлены единичными экземплярами.

По результатам осеннего эпизоотологического обследования установлено, что процент попадания грызунов составляет 25,9. В зоне степей (Симферопольский, Сакский районы) отмечен наиболее высокий показатель – 36,9 %, тогда как в зоне предгорий (Бахчисарайский район) он был самым низким – 18,9 %, в зоне гор (Симферопольский, Белогорский районы) – 22,8 %.

Результаты мониторинга носителей и переносчиков природно-очаговых инфекций на территории КФО свидетельствуют о том, что показатели численности как иксодид, так и диких мелких млекопитающих (грызунов), полученных при эпизоотологическом обследовании в 2014 г., остаются на уровне средних многолетних. Анализ ретроспективных данных позволяет установить, что доминирующим видом иксодовых клещей в сборах практически всег-

да являлся клещ *R. sanguineus* (39–75 % от общего количества клещей), субдоминанты были представлены клещами *H. marginatum* (10–35 %), *H. punctata* (6–22 %), *R. bursa* (4–19 %), количество которых зависит от места и времени сбора.

Таким образом, в результате эпизоотологического обследования районов Крымского федерального округа, проведенного в 2014 г., установлено, что весной в сборах доминирующим видом клещей-переносчиков возбудителей природно-очаговых трансмиссивных инфекций является иксодовый клещ *H. marginatum* (38,7 %), среди природных резервуаров – мышь домовая (44,9 %); в сборах осенью – *H. punctata* (45,3 %) и полевка обыкновенная (29,9 %).

Собранные в ходе эпизоотологического обследования иксодовые клещи исследованы молекулярно-генетическим методом (ПЦР) на наличие ДНК/РНК возбудителей Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), лихорадки Ку, клещевого вирусного энцефалита (КВЭ), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), группы клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), туляремии. Выявлена 61 положительная проба, что составляет 54,0 % от общего количества исследованного материала (табл. 1).

В 13 пробах иксодид обнаружены ДНК/РНК возбудителей нескольких инфекций. В одной пробе *H. marginatum* выявлен генетический материал возбудителей КПЛ и лихорадки Ку; в одной пробе *I. redikorzevi* – КПЛ и ИКБ; в двух пробах *R. bursa* и семи пробах *I. ricinus* – КПЛ и ГАЧ; в одной пробе *I. ricinus* – МЭЧ и ГАЧ; в одной пробе *I. redikorzevi* – КПЛ, ИКБ и ГАЧ. Среди проб, содержащих только один экземпляр клеща, результатов микст-инфекций не было.

Материал от диких мелких млекопитающих дополнительно исследовали на наличие генетических фрагментов возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) и лептоспироза; выявлены 23 положительные пробы (1,6 %).

При проведении исследования материала от

Таблица 1

Результаты лабораторных исследований иксодовых клещей на наличие ДНК/РНК возбудителей природно-очаговых инфекций

Вид клещей <sup>1</sup>	Количество проб с положительным результатом <sup>2</sup>					Итого проб по видам
	Лихорадка Ку	ИКБ	КПЛ	ГАЧ	МЭЧ	
<i>H. marginatum</i>	1	0	5	2	0	8
<i>H. punctata</i>	1	1	0	9	0	11
<i>D. marginatus</i>	0	0	0	4	0	4
<i>D. reticulatus</i>	0	0	0	1	0	1
<i>R. bursa</i>	0	0	2	2	0	4
<i>R. turanicus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>I. ricinus</i>	0	1	10	12	1	24
<i>I. redikorzevi</i>	0	5	2	1	0	8
Итого проб по инфекциям	3	7	19	31	1	61

<sup>1</sup>Результаты исследований по детекции ДНК/РНК *H. erinacei*, *R. rossicus* и *R. sanguineus* – отрицательные.

<sup>2</sup>Исследования клещей на наличие ДНК/РНК возбудителей остальных инфекций (КГЛ, ЛЗН, КЭ, туляремия) дали отрицательный результат.



Результаты исследования иксодовых клещей и мелких млекопитающих в административных районах КФО на наличие ДНК/РНК возбудителей природно-очаговых инфекций

Район обследования	Общее количество проб / Количество положительных проб, абс.							Итого положительных проб по районам
	Лихорадка Ку	ИКБ	КПЛ <sup>1</sup>	ГАЧ	МЭЧ	ГЛПС <sup>2</sup>	Лептоспироз <sup>2</sup>	
Бахчисарайский	81/0	81/8	12/0	81/0	81/0	69/0	71/2	10
Белогорский	56/0	56/0	29/9	56/29	56/1	27/0	27/2	41
Ленинский	7/0	7/0	7/0	7/0	7/0	0	0	0
Сакский	69/0	51/5	14/2	51/2	51/0	55/0	67/0	9
Симферопольский	84/0	84/2	17/3	84/0	84/0	67/1	76/6	12
Судакский	6/0	5/2	5/0	5/0	5/0	1/0	1/0	2
Феодосийский	25/ 2	18/0	18/4	18/0	18/0	7/0	19/2	8
Черноморский	19/1	11/0	11/1	11/0	11/0	8/0	26/0	2
Итого проб по инфекциям	347/3	313/17	113/19	313/31	313/1	234/1	287/12	84

<sup>1</sup>На наличие ДНК/РНК КПЛ исследовали только иксодовых клещей.<sup>2</sup>На наличие ДНК/РНК ГЛПС, лептоспироза исследовали только мелких млекопитающих.

диких млекопитающих на наличие ДНК/РНК возбудителей КГЛ, ЛЗН, лихорадки Ку, КВЭ, ГАЧ, МЭЧ, туляремии не обнаружено. При исследовании на ИКБ 10 проб были положительными (5 – мышь степная, 2 – мышь желтогорлая, 3 – хомячок серый), на ГЛПС – 1 проба (мышь степная), на лептоспироз – 12 проб (1 – мышь степная, 1 – мышь курганчиковая, 7 – полевка обыкновенная, 2 – полевка общественная, 1 – еж южный).

Таким образом, по данным лабораторных исследований полевого материала (табл. 2), отобранного в районах КФО, выявлена зараженность иксодовых клещей возбудителями лихорадки Ку (2,7 % от общего количества исследованных проб), КПЛ (16,8 %), ИКБ (6,2 %), ГАЧ (27,4 %) и МЭЧ (0,9 %); зараженность мелких диких млекопитающих возбудителями ИКБ (5,0 %), ГЛПС (0,4 %), лептоспироза (4,2 %).

Результаты лабораторного исследования полевого материала свидетельствуют о циркуляции возбудителей лихорадки Ку, КПЛ, ИКБ, ГАЧ, МЭЧ, ГЛПС и лептоспироза на территории КФО. Выявление маркеров возбудителей инфекционных болезней, уровень численности их носителей и переносчиков в сочетании с оптимальными условиями существования для всех сочленов паразитарных систем свидетельствует об активности природных очагов этих инфекций, обладающих определенным эпидпотенциалом.

Для уверенного прогнозирования эпизоотической обстановки, оценки эпидемического риска и профилактики природно-очаговых инфекций в регионе целесообразно:

- определить точки долговременного наблюдения – стационары;
- усилить эпизоотологический контроль на территории, особенно в периоды сезонной активности носителей и переносчиков природно-очаговых и трансмиссивных инфекций;
- обеспечить повышенную настороженность ме-

дицинского персонала в отношении возникновения заболеваний природно-очаговыми инфекциями;

- обеспечить готовность лабораторных баз к проведению исследований материала от больных, подозрительных на заболевание этими инфекционными болезнями, и больных с лихорадками неясного генеза;

- активизировать проведение информационно-разъяснительной работы среди населения по вопросам неспецифической профилактики;

- организовать семинары для медицинских работников по вопросам диагностики, клиники и профилактики природно-очаговых и трансмиссивных инфекционных болезней.

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

**Authors:**

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

Shaposhnikova L.I., Kotenev E.S., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Samarina I.V., Belova O.A., Tsapko N.V., Ashibokov U.M., Agapitov D.S., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Evshtaf'ev I.L., Tovpinets N.N., Samoded T.N. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Crimea and the City of Federal Significance Sevastopol. 67, Naberezhnaya St., Simferopol, 295034, Russian Federation.

**Об авторах:**

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

Шапошникова Л.И., Котенёв Е.С., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Самарина И.В., Белова О.А., Цапко Н.В., Ашибокров У.М., Агапитов Д.С., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Евстафьев И.Л., Товпинец Н.Н., Самодед Т.Н. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе. Российская Федерация, 295034, Симферополь, ул. Набережная, д. 67. E-mail: buz\_priemn@cge-crimea.ru

Поступила 16.03.15.



А.Е.Шиянова, В.П.Топорков, М.Н.Ляпин, И.Г.Карнаухов

**САНИТАРНАЯ ОХРАНА ТЕРРИТОРИИ В СТРУКТУРЕ ОБЕСПЕЧЕНИЯ  
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ НАСЕЛЕНИЯ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,  
Российская Федерация*

Показана взаимосвязь в структурном и функциональном отношениях санитарной охраны территории с эпидемиологическим надзором и государственным санитарно-эпидемиологическим надзором. Интегрируя в себе отдельные функции эпидемиологического надзора и федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора, но только в отношении определенного объекта – чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, санитарная охрана территории Российской Федерации является отдельным направлением проведения санитарно-профилактических (противоэпидемических) мероприятий, имеющим самостоятельную подцель. Специфика санитарной охраны территории – сочетание функций и возможностей мониторинга, надзора и контроля. Положения законодательных и нормативных документов, касающихся санитарной охраны территории, позволяют очертить ее основные организационные принципы: государственный характер мероприятий, независимость Роспотребнадзора в организационном, функциональном и материальном отношениях, трехуровневая иерархическая система, информационное взаимодействие.

*Ключевые слова:* санитарная охрана территории, санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.

A.E.Shiyanova, V.P.Toporkov, M.N.Lyapin, I.G.Karnaukhov

**Sanitary Protection of the Territories within the Frames of Sanitary-Epidemiological Welfare Provision***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Demonstrated is the structural and functional interrelation between sanitary protection of the territories, epidemiological monitoring, and the state sanitary-epidemiological surveillance. Sanitary protection of the territories (SPT) of the Russian Federation is a separate focus area authorizing sanitary prophylactic (anti-epidemic) activities, with a self-sustained sub-goal. It combines individual roles appertained to epidemiological monitoring and to federal sanitary-epidemiological surveillance, only in reference to a particular item – emergency situation in the sphere of sanitary-epidemiological welfare of the population. Specificity of the SPT is a balance between functionality and capacity of the monitoring, surveillance and control. Legislative and regulatory legal acts, which concern sanitary protection of the territory, provide the means for defining its basic organizational principles: country-wide activities, self-sufficiency and self-support of the Rospotrebnadzor, three-level hierarchical system, and information exchange.

*Key words:* sanitary protection of the territory, sanitary-epidemiological welfare of the population.

К санитарно-противоэпидемическим (профилактическим) мероприятиям, выполнение которых является одним из основных средств обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны, относится санитарная охрана территории Российской Федерации (в соответствии с Федеральным законом от 30.03.1999 г. № 52). Еще одним направлением по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения законодательно определен государственный санитарно-эпидемиологический надзор, являющийся составной частью контроля в сфере охраны здоровья граждан (Федеральные законы от 30.03.1999 г. № 52, от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ). Помимо этого, к атрибутам содержания санитарно-эпидемиологического благополучия населения отнесены также меры по совершенствованию эпидемиологического надзора, предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера, в том числе возникающих вследствие стихийных бедствий, антропогенных катастроф, и обеспечение биологической безопасности [7].

В литературе можно встретить некоторое отождествление понятий «санитарная охрана территории», «эпидемиологический надзор», «государственный санитарно-эпидемиологический надзор». Нами рассмотрена нормативно-правовая база в области санитарной охраны территории с целью определить ее взаимосвязь в структурном и функциональном отношениях с эпидемиологическим надзором и государственным санитарно-эпидемиологическим надзором.

Санитарная охрана территории Российской Федерации осуществляется на двух уровнях – национально-правовом и международно-правовом. Россия является участницей целого ряда международных договоров и соглашений, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в целом и санитарной охраны территории в частности. Ключевым документом, на положениях которого базируется концепция санитарной охраны территории Российской Федерации, являются Международные медико-санитарные правила. Вопросы санитарной охраны территории входят в повестку дня деятельности таких международ-

ных организаций как СНГ, ШОС, Таможенный союз ЕАЭС, двусторонних отношений сопредельных стран. Подробно международное сотрудничество в этой области освещено В.Ю.Смоленским и соавт. [8].

Федеральный уровень организации системы санитарной охраны территории Российской Федерации, правового регулирования проведения мероприятий в рамках санитарной охраны территории определен законодательно (Федеральный закон от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ); общие принципы, порядок организации и выполнения противоэпидемических мероприятий, осуществляемых в целях предупреждения заноса и распространения на территории Российской Федерации инфекционных болезней, представляющих опасность для населения и требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, устанавливаются нормативными документами федерального уровня.

Юридическое сопровождение вопросов санитарной охраны территории затрагивает различные отрасли права: административное, трудовое, в отдельных случаях – уголовное. Так, дисциплинарная, административная и уголовная ответственность за нарушение санитарного законодательства устанавливается ст. 55 ФЗ от 30.03.1999 г. № 52, административная ответственность за любое «правонарушение, посягающее на здоровье, санитарно-эпидемиологическое благополучие населения», предусмотрена Кодексом Российской Федерации об административных правонарушениях от 30.12.2001 г. (гл. 6, ст. 6.3); Уголовный Кодекс Российской Федерации от 13.06.1996 г. (ст. 236) устанавливает уголовную ответственность за нарушение санитарно-эпидемиологических правил, повлекшее по неосторожности массовое заболевание, отравление людей или смерть человека.

Функционально мероприятия по санитарной охране территории Российской Федерации подразделяются на:

- санитарно-карантинный контроль, проводимый в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации и регламентируемый постановлениями Правительства Российской Федерации от 16.02.2008 г. № 94, от 19.06.2012 г. № 612, от 30.06.2004 г. № 322;

- мероприятия на всей территории страны в рамках национального, регионального и территориального эпидемиологического надзора.

Эпидемиологический надзор в литературе рассматривается как современная форма организации противоэпидемической работы со всеми ее атрибутами, главными из которых являются сбор, анализ и оценка эпидемиологических данных, формулирование целей, принятие управленческих решений, а также как инструмент выявления новых нозологических форм болезней [2, 3, 4]. Материалы эпидемиологического анализа международных транспортных и туристических связей, данные о заболеваемости карантинными болезнями за рубежом, возможных путях их заноса должны быть, по определению И.Д.Ладного

и соавт. [5], основой методики осуществления мероприятий по санитарной охране. Не вызывает сомнения значимость использования для целей санитарной охраны территории данных мониторинга заболеваемости зоонозными, природно-очаговыми инфекционными болезнями, состояния природных очагов на территории страны для оценки возможности реализации эпидемических осложнений в случае завоза инфекции.

Санитарно-карантинный контроль, относящийся к мероприятиям по санитарной охране территории, одновременно является частью федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора (Федеральный закон от 30.03.1999 г. № 52). При внешнем сходстве в терминологическом обозначении с эпидемиологическим надзором эти два понятия имеют различное содержание: государственный санитарно-эпидемиологический надзор – одна из функций национального регулирования, реализуемая в отношении органов государственной власти, органов местного самоуправления, юридических лиц, индивидуальных предпринимателей и граждан в связи с осуществляемой ими деятельностью, а также в отношении продукции и услуг. Осуществляется данный вид надзора в соответствии с законодательством Российской Федерации о санитарно-эпидемиологическом благополучии населения. В то же время к отношениям, связанным с осуществлением федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора, организацией и проведением проверок юридических лиц, индивидуальных предпринимателей, за исключением осуществления санитарно-карантинного контроля, применяются положения Федерального закона от 26.12.2008 г. № 294-ФЗ «О защите прав юридических лиц и индивидуальных предпринимателей при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля» – эти положения устанавливают порядок организации и проведения проверок.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) – орган, уполномоченный осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор (постановления Правительства Российской Федерации от 15.09.2005 г. № 569, от 30.06.2004 г. № 322) – вправе осуществлять данный вид надзора в отношении неподчиненных органов, учреждений и организаций. Определенные полномочия имеют и иные органы государственной власти (МВД, Минобороны, ФСИН, ФСБ и др.) в отношении подчиненных им ведомств и организаций, составляя при организующей и координирующей роли Роспотребнадзора единую федеральную централизованную систему. Таким образом, мероприятия по санитарной охране территории Российской Федерации осуществляются также в рамках функционирования единой государственной системы государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

В качестве особенностей государственного санитарно-эпидемиологического надзора Н.В.Ласкина [6] выделяет сочетание в нем черт и надзора, и контроля при том, что эти две функции имеют четкие разграничения, показанные В.П.Беляевым [1]. Помимо возможности проведения надзора как в отношении подчиненных (особенность контроля), так и в отношении неподчиненных органов и учреждений (отсутствие отношений подчиненности надзирающих органов с поднадзорными характерны для надзора), это:

- право должностных лиц уполномоченных органов вмешиваться в оперативно-хозяйственную деятельность конкретного поднадзорного объекта (давать предписания об устранении выявленных нарушений санитарных правил, о прекращении реализации продукции и др.), что является признаком контроля, при надзоре такое вмешательство не допускается;

- возможность должностных лиц уполномоченных органов непосредственно применять меры государственного принуждения (признак контроля) или направлять в правоохранительные органы материалы о нарушении санитарного законодательства для решения вопросов о привлечении виновных к ответственности (признак надзора).

Эту же характеристику – сочетание функций и возможностей надзора и контроля – закономерно приобретает и санитарно-карантинный контроль. К вышеизложенному можно добавить, что санитарно-карантинный контроль осуществляется исключительно государственными органами, что является характерной чертой надзора. Таким образом, санитарная охрана территории интегрирует в себе мониторинговую, надзорную и контрольную функции (таблица).

Положения законодательных и нормативных документов, касающихся санитарной охраны территории, позволяют очертить ее основные организационные принципы:

- государственный характер мероприятий по санитарной охране территории;

- независимость Роспотребнадзора в организационном, функциональном и материальном отношениях, закрепленная законодательно на уровне правительства (Постановление Правительства Российской Федерации от 19.06.2012 г. № 612), которое непосредственно осуществляет руководство его деятельностью;

- принцип трехуровневой иерархической системы, показанный в диссертационной работе Ю.М.Федорова (2004 г.) и сохранившийся в ходе дальнейшего реформирования: федеральный уровень (Роспотребнадзор) – региональный уровень (Управления Роспотребнадзора по субъектам и по железнодорожному транспорту, ФБУЗ «ЦГиЭ» в субъектах Российской Федерации и на железнодорожном транспорте) – территориальный уровень (СКП, ПСКП, медицинские организации, территориальные отделы Управлений Роспотребнадзора, филиалы ФБУЗ «ЦГиЭ»);

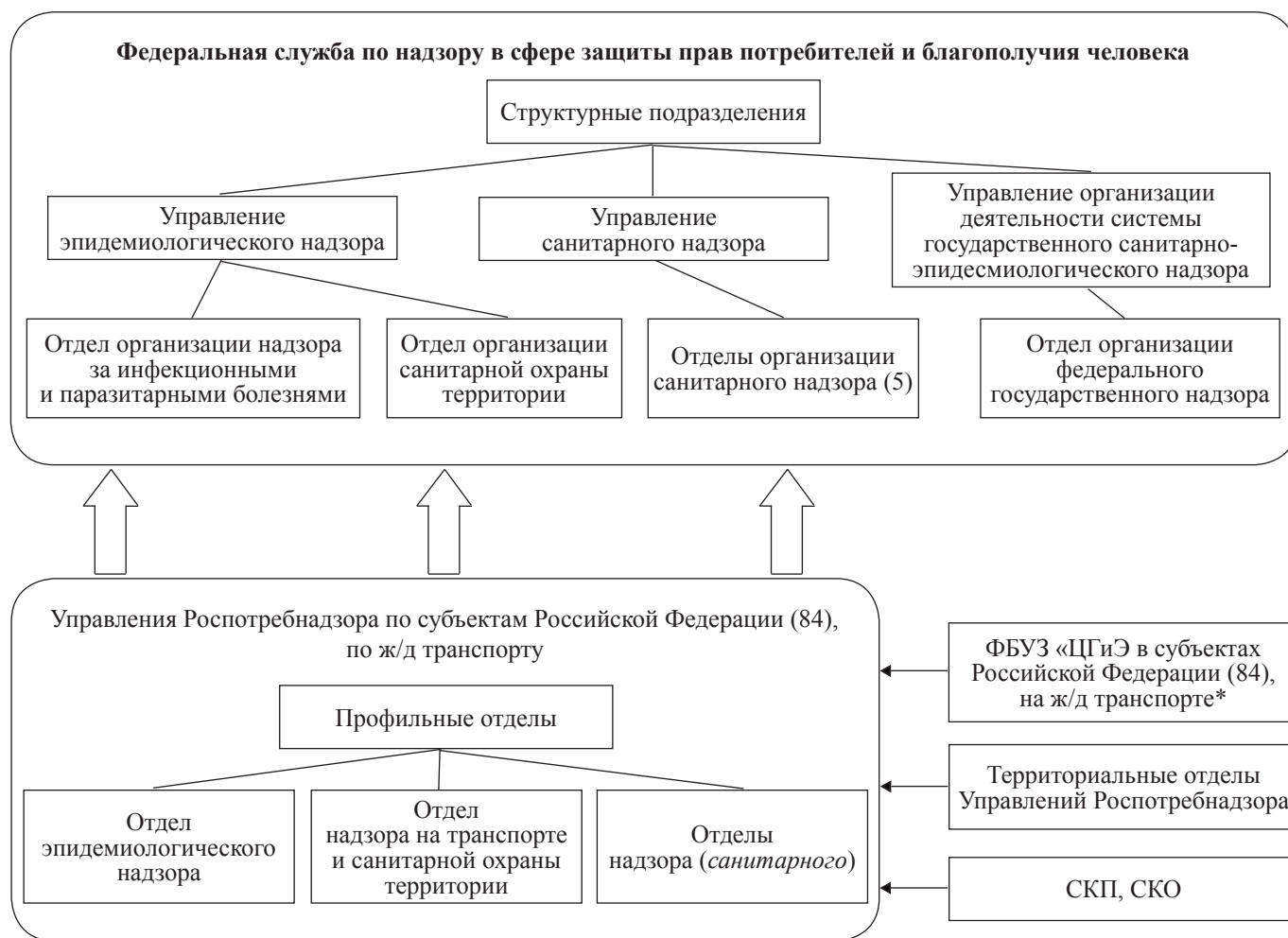
- принцип информационного сотрудничества научных и практических учреждений (обмен информацией, необходимой для принятия управленческих решений). Научное обеспечение мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации осуществляет Координационный научный совет по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. На уровне СНГ функционирует Координационный совет по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней.

Статичность организационных принципов просматривается от истоков становления санитарной охраны границ/территории. Динамические функциональные принципы показаны Ю.М.Федоровым (2004 г.) как основанные на этиологическом подходе к информированию Всемирной организации здравоохранения об инфекционных болезнях, представляющих угрозу международного характера, и оперативном выполнении максимального комплекса противоэпидемических мероприятий с минимальными экономическими затратами в случае их выявления

**Специфика функций при осуществлении эпидемиологического надзора, санитарной охраны территории и федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора**

Функции	Эпидемиологический надзор	Санитарная охрана территории	Федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор
<b>Мониторинг</b>			
заболеваемости за рубежом	–	+	–
инфекционной заболеваемости в России	+	+	–
международных транспортных и торговых связей России	–	+	–
<b>Надзор</b>			
в отношении звеньев эпидемического процесса	+	+	–
в отношении юридических и физических лиц	–	–	+
в отношении продукции	–	+	+
<b>Контроль</b>			
в отношении звеньев эпидемического процесса	–	+	–
в отношении юридических и физических лиц	–	+	+
в отношении продукции	–	+	+

\* В случаях, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории



Структурные подразделения Роспотребнадзора, осуществляющие контрольные и надзорные функции в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения:

\*Обеспечивают деятельность по осуществлению контрольно-надзорных функций

ния. Необходимо отметить при этом, что проведение первичных противоэпидемических мероприятий должно начинаться уже при подозрении на наличие инфекционной болезни, способной вызвать чрезвычайную ситуацию санитарно-эпидемического характера, до этиологического подтверждения диагноза (Методические указания МУ 3.4.2552-09).

Интеграция в санитарной охране территории мониторинговой, надзорной и контрольной функций, научной и практической составляющих определяет уникальность данной сферы деятельности. Санитарная охрана территории, являясь спецификой России и других стран постсоветского пространства, сформирована как государственная функция, государственный институт, базирующийся на законодательной основе, требующий согласованных усилий различных ведомств, использующий для выполнения поставленных задач помимо собственной и другие государственные структуры, в том числе правоохранительные.

С одной стороны, она интегрирует в себе отдельные функции эпидемиологического надзора и государственного санитарно-эпидемиологического надзора, являясь частью и того, и другого, но только в отношении определенного объекта – чрезвычайной

ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия. Эта функциональная взаимосвязь дополнена и структурным единством – полномочиями Роспотребнадзора в контроле за реализацией государственной политики в целом в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации с целью охраны здоровья и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения (Постановление Правительства Российской Федерации от 16.05.2005 г. № 303).

С другой стороны, несмотря на неразрывность с этими областями профилактической и противоэпидемической деятельности, все же нельзя включить санитарную охрану территории в состав того или другого. Их самостоятельность подчеркивается также тем, что осуществление мероприятий обеспечено деятельностью отдельных структурных подразделений в Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и в Управлениях Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации, обуславливающих внутриведомственную направленность информационных потоков (рисунок).

Итак, можно выделить в составе санитарно-эпи-



демонологического благополучия населения (цели его обеспечения) три направления проведения санитарно-профилактических (противоэпидемических) мероприятий, имеющих три самостоятельные подцели: подцель 1 – минимизация уровня заболеваемости контролируемых инфекционных болезней вплоть до их элиминации и эрадикации – эпидемиологический надзор; подцель 2 – предупреждение трансграничного завоза и распространения инфекционных и массовых неинфекционных болезней, создающих ЧС санитарно-эпидемиологического характера – санитарная охрана территории; подцель 3 – предупреждение роста и стабилизация инфекционной и неинфекционной заболеваемости на приемлемом уровне на основе государственного контроля исполнения нормативных актов санитарно-эпидемиологического характера – федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

Таким образом, санитарная охрана территории Российской Федерации, интегрируя в себе отдельные функции эпидемиологического надзора и федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора, является отдельным направлением проведения санитарно-профилактических (противоэпидемических) мероприятий, имеющим самостоятельную подцель.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляев В.П. К вопросу оптимизации контрольной деятельности. *Законодательство*. 2006; 6:74–8.
2. Беляков В.Д., Яфаев Р.Х. Эпидемиология. М.: Медицина; 1989. 416 с.
3. Беляков В.Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1985; 5:53–8.
4. Брес П. Действия служб общественного здравоохранения в чрезвычайных ситуациях, вызванных эпидемиями: практи-

ческое руководство. Женева: ВОЗ; 1990. 293 с.

5. Ладный И.Д., Гольд Э.Ю., Марчук Л.М., Богатырев О.Ф. Руководство по предупреждению заноса и распространения особо опасных инфекций. М.: Медицина; 1979. 208 с.

6. Ласкина Н.В. Комментарий к Федеральному закону от 30.03.1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения». Система Гарант; 2013. URL: <http://base.garant.ru/57731931/> (дата обращения 20.04.2014).

7. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 10:4–13.

8. Смоленский В.Ю., Топорков В.П., Карнаухов И.Г., Топорков А.В., Кутырев В.В. Организационные и методические аспекты международного сотрудничества при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(113):5–13.

#### References

1. Belyaev V.P. [Concerning optimization of supervisory activities]. *Zakonodatel'stvo*. 2006; 6: 74–8.
2. Belyakov V.D., Yafaev R.Kh. [Epidemiology]. M.: Meditsina; 1989. 416 p.
3. Belyakov V.D. [Epidemiological surveillance – authorizing basis of anti-epidemic activities]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 5: 53–8.
4. Bres P. [Functioning of Public Health Services under Emergency Situations Induced by Epidemics: Practice Guidelines]. Geneva: WHO; 1990. 293 p.
5. Ladny I.D., Gol'd E.Yu., Marchuk L.M., Bogatyrev O.F. [Guidelines on prevention of importation and dissemination of particularly dangerous infections]. M.: Meditsina; 1979. 208 p.
6. Laskina N.V. [Commentary on the Federal Law N 52-FL dated 30.03.1999 “On Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population”]. Electronic database for information and legal support “Garant”, 2013 (cited 20 Apr 2014). Available from: <http://base.garant.ru/57731931/>.
7. Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Lyapin M.N., Kutyrev V.V. [Conceptual basis for biological safety]. *Vestnik Ros. Akad. Med. Nauk*. 2013; 10: 4–13.
8. Smolensky V.Yu., Toporkov V.P., Karnaukhov I.G., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Organizational and methodological aspects of international cooperation for the provision of sanitary and epidemiological welfare of the population]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113): 5–13.

#### Authors:

Shiyanova A.E., Toporkov V.P., Lyapin M.N., Karnaukhov I.G. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

#### Об авторах:

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

Поступила 25.05.14.

Е.Б.Ежлова<sup>1</sup>, Ю.В.Демина<sup>1</sup>, А.Н.Куличенко<sup>2</sup>, С.А.Портенко<sup>3</sup>, А.С.Гуськов<sup>1</sup>, Е.С.Почтарева<sup>1</sup>,  
И.В.Савельева<sup>2</sup>, А.С.Волынкина<sup>2</sup>, В.Н.Савельев<sup>2</sup>, М.Е.Михайлова<sup>2</sup>, И.В.Кузнецова<sup>2</sup>, О.А.Бобенко<sup>2</sup>,  
Д.В.Ефременко<sup>2</sup>, Е.С.Казакова<sup>3</sup>, Т.Ю.Красовская<sup>3</sup>, В.Е.Куклев<sup>3</sup>, И.А.Касьян<sup>3</sup>, Е.А.Билько<sup>3</sup>,  
Е.В.Мицевич<sup>4</sup>, И.П.Мицевич<sup>4</sup>, М.Е.Платонов<sup>4</sup>, М.Г.Теймуразов<sup>4</sup>, О.В.Полосенко<sup>4</sup>, В.Е.Елдинова<sup>5</sup>,  
Е.А.Бойко<sup>5</sup>, В.И.Малай<sup>5</sup>, В.П.Клиндухов<sup>6</sup>, Т.В.Гречаная<sup>6</sup>, П.Н.Николаевич<sup>6</sup>, В.А.Бирюков<sup>6</sup>,  
И.И.Божко<sup>6</sup>, Л.И.Щербина<sup>7</sup>, О.А.Погудина<sup>8</sup>

## ОРГАНИЗАЦИЯ ОБСЛЕДОВАНИЯ И ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ XXII ОЛИМПИЙСКИХ И XI ПАРАЛИМПИЙСКИХ ЗИМНИХ ИГР В СОЧИ

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>4</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск, Российская Федерация; <sup>5</sup>ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Новороссийск, Российская Федерация; <sup>6</sup>Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар, Российская Федерация; <sup>7</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Краснодар, Российская Федерация; <sup>8</sup>Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи, Российская Федерация

В статье представлены данные об организации и проведении лабораторного контроля систем горячего водоснабжения спортивных объектов и объектов проживания на присутствие *Legionella pneumophila* во время XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 г. в Сочи. Обследованы 105 объектов, на 37 выявлены положительные образцы с концентрацией ДНК *L. pneumophila* от  $2,19 \cdot 10^2$  до  $3,92 \cdot 10^7$  геном-эквивалентов/л. Бактериологическим методом на 16 объектах обнаружена колонизация систем водоснабжения легионеллами, на одном – свыше  $1 \cdot 10^4$  КОЕ/л. Проведен сравнительный анализ результатов полученных при использовании метода ПЦР и бактериологического анализа. По результатам генотипирования семи выделенных штаммов легионелл серогруппы 1 и двух штаммов серогрупп 2–14 сделано заключение о генетической неоднородности штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в регионе г.-к. Сочи.

**Ключевые слова:** Олимпийские игры, легионеллез, *Legionella pneumophila*, микробиологический мониторинг, полимеразная цепная реакция, бактериологический метод, генотипирование.

Е.Б.Ezhlova<sup>1</sup>, Yu.V.Demina<sup>1</sup>, A.N.Kulichenko<sup>2</sup>, S.A.Portenko<sup>3</sup>, A.S.Gus'kov<sup>1</sup>, E.S.Pochtareva<sup>1</sup>, I.V.Savel'eva<sup>2</sup>,  
A.S.Volynkina<sup>2</sup>, V.N.Savel'ev<sup>2</sup>, M.E.Mikhailova<sup>2</sup>, I.V.Kuznetsova<sup>2</sup>, O.A.Bobenko<sup>2</sup>, D.V.Efremenko<sup>2</sup>,  
E.S.Kazakova<sup>3</sup>, T.Yu.Krasovskaya<sup>3</sup>, V.E.Kuklev<sup>3</sup>, I.A.Kas'yan<sup>3</sup>, E.A.Bil'ko<sup>3</sup>, E.V.Mitsevich<sup>4</sup>, I.P.Mitsevich<sup>4</sup>,  
M.E.Platonov<sup>4</sup>, M.G.Teimurazov<sup>4</sup>, O.V.Polosenko<sup>4</sup>, V.E.Eldinova<sup>5</sup>, E.A.Boiko<sup>5</sup>, V.I.Malay<sup>5</sup>, V.P.Klindukhov<sup>6</sup>,  
T.V.Grechanaya<sup>6</sup>, P.N.Nikolaevich<sup>6</sup>, V.A.Biryukov<sup>6</sup>, I.I.Bozhko<sup>6</sup>, L.I.Shcherbina<sup>7</sup>, O.A.Pogudina<sup>8</sup>

## Management of the Investigation and Detection of Legionellosis Agent in the Environmental Samples during the Preparation and Holding of the XXII Winter Olympics and XI Paralympics in Sochi

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>3</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>4</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; <sup>5</sup>Black-Sea Plague Control Station, Novorossiysk, Russian Federation; <sup>6</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; <sup>7</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation; <sup>8</sup>Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi, Russian Federation

Provided are the data on the management and carrying out of the laboratory control over the hot-water supply systems of the sports venues and accommodation areas for the presence of *Legionella pneumophila* during the XXII Olympics and XI Paralympics in Sochi, 2014. Inspected have been 105 facilities. The samples from 37 of them showed positive. *L. pneumophila* DNA concentration varies between  $2.19 \cdot 10^2$  and  $3.92 \cdot 10^7$  genome equivalents (g.e.)/l. By means of bacteriological investigation detected have been legionella colonies in the water supply systems of 16 facilities, at one of the items – the loading is over  $1 \cdot 10^4$  colony-forming units/l. Performed has been comparative analysis of the results obtained using PCR assay and bacteriological test. Based on the genotyping of 7 isolated strains serogroup 1 and 2 strains of 2–14 serogroups it is concluded that *L. pneumophila* strains circulating in the resort town Sochi are genetically heterogeneous.

**Key words:** Olympic Games, legionellosis, *Legionella pneumophila*, microbiological survey, polymerase chain reaction, bacteriological test, genotyping.

Эпидемические вспышки и спорадические случаи легионеллеза связаны с системами водоснабжения, кондиционирования и охлаждения, загрязненными *Legionella pneumophila* [2]. Особенную актуальность легионеллезная инфекция, или «болезнь путешественников», приобретает в период проведения международных массовых мероприятий, что связано с большим притоком людей, пользующихся услугами гостиничных комплексов, круизных лайнеров и т.п. Основой профилактики легионеллезной инфекции является проведение мониторинговых исследований уровня контаминации легионеллами потенциально опасных водных объектов, генерирующих мелкодисперсный водный аэрозоль (горячего водоснабжения, централизованных систем кондиционирования, бассейнов и т.д.), а также своевременное проведение профилактических и дезинфекционных мероприятий [3, 5]. Для обеспечения эпидемического благополучия в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в Сочи (далее Олимпийские игры) была задействована специализированная противоэпидемическая бригада (СПЭБ) Ставропольского противочумного института, усиленная специалистами ведущих НИИ и других учреждений Роспотребнадзора: ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФБУН ГНЦ ПМБ, ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах СКФО. Одной из задач СПЭБ было проведение лабораторных исследований объектов окружающей среды на наличие *L. pneumophila*.

Цель работы – анализ порядка организации и проведения лабораторного контроля систем горячего водоснабжения на наличие возбудителя легионеллеза во время Олимпийских игр.

### Материалы и методы

Лабораторный мониторинг контаминации систем горячего водоснабжения возбудителем легионеллеза проводили в соответствии с разработанным документом [1].

На подготовительном этапе для лабораторного контроля на наличие легионелл были выбраны 105 объектов, в том числе 7 спортивных объектов прибрежного кластера (дворец зимнего спорта «Айсберг», ледовый дворец «Большой», ледовая арена «Шайба», ККЦ «Адлер-арена»; керлинг-центр «Ледяной Куб», тренировочный комплекс для фигурного катания, тренировочный комплекс для хоккея), 4 не соревновательных объекта (центральный стадион «Фишт», аэропорт «Сочи», Главный медиа-центр, Горки медиа-центр) и 94 объекта проживания спортсменов и гостей (гостиницы, пансионаты и т.п.). В зависимости от размера объекта, количества жилых номеров (для объектов проживания) для каждого из них определено число контрольных точек (от 1 до 8). Отбор проб воды проводили из водопроводных кранов, душевых рожков.

Исследование проводили в соответствии с МУК 4.2.2217-07 «Выявление бактерий *L. pneumophila* в объектах окружающей среды» и ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб». При заборе материала контролировали температуру воды в системе горячего водоснабжения.

С целью сокращения сроков проведения исследований и своевременного осуществления профилактических и противоэпидемических мероприятий в качестве основного метода диагностики использовали ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов «ДНК-сорб-В» (ИнтерЛабСервис, Москва), постановку ПЦР – с применением тест-системы «АмплиСенс *Legionella pneumophila*-FL» (ИнтерЛабСервис, Москва). Пробы, в которых при постановке качественной ПЦР была обнаружена ДНК *L. pneumophila*, исследовали повторно методом количественной ПЦР, начиная с этапа выделения ДНК.

По результатам ПЦР выдавался ответ о выявлении и количестве ДНК легионелл в исследуемой пробе, а также заключение о необходимости проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий. При обнаружении в пробе ДНК легионелл в концентрации  $1 \cdot 10^2$ – $9 \cdot 10^3$  геном-эквивалентов/л (г.э./л) выдавалось предписание о проведении комплекса профилактических мероприятий, при обнаружении более чем  $1 \cdot 10^4$  г.э./л – дезинфекционных мероприятий.

Пробы, содержащие ДНК *L. pneumophila* в количестве, превышающем  $1 \cdot 10^3$  г.э./л, исследовали бактериологическим методом, анализ проводился в соответствии с МУК 4.2.2217-07. Генетическое типирование выделенных штаммов выполняли с помощью метода мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) по протоколу Европейской исследовательской группы по легионеллезу (ESGLI) Sequence-Based Typing protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila*, version 5.0.

### Результаты и обсуждение

Анализ воды из систем горячего водоснабжения на наличие легионелл проводили за 20 дней до открытия Олимпийских игр. За этот период было исследовано 376 проб, в том числе 30 проб, отобранных на спортивных объектах, 24 – на не соревновательных объектах и 322 – на объектах проживания.

При первичном обследовании 105 объектов (222 пробы) методом ПЦР положительные образцы выявлены на 37 (65 проб) с концентрацией ДНК *L. pneumophila* от  $2,19 \cdot 10^2$  до  $3,92 \cdot 10^7$  г.э./л. На основании полученных результатов были выданы предписания о необходимости немедленного проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий в соответствии с СП 3.1.2.2626-10. С целью контроля эффективности выполненных мероприятий данные объекты обследовались повторно (62 пробы), при этом возбудитель легионеллеза выявлен на 11 обь-



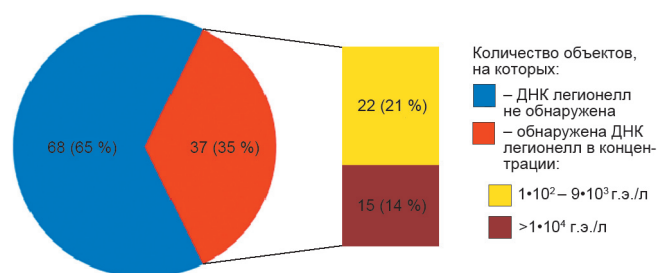


Рис. 1. Результаты обследования объектов на наличие в системах горячего водоснабжения ДНК *L. pneumophila* методом ПЦР

ектах (25 проб) с концентрацией ДНК легионеллы  $5,09 \cdot 10^2 - 9,03 \cdot 10^4$  г.э./л. На 5 объектах *L. pneumophila* обнаружена и при третьем исследовании (7 проб) с концентрацией ДНК возбудителя  $1,98 \cdot 10^2 - 7,81 \cdot 10^4$  г.э./л.

В межсоревновательный период и во время проведения Паралимпийских игр на наличие легионеллы повторно были обследованы 25 объектов, в том числе несоревновательных – 4, спортивных – 3, жилых – 18. Всего исследована 71 проба воды, выявлено 6 образцов с концентрацией ДНК легионеллы от  $1,36 \cdot 10^2$  до  $1,83 \cdot 10^3$  г.э./л.

Таким образом, по результатам ПЦР исследований контаминация систем горячего водоснабжения ДНК *L. pneumophila* выявлена на 37 объектах, из них спортивных – 4 (57 %), не соревновательных – 2 (50 %), жилых – 31 (32,9 %), рис. 1. При исследовании бактериологическим методом колонизация систем водоснабжения легионеллами обнаружена на 16 объектах: 1 – спортивном, 1 – не соревновательном, 14 – жилых объектах (рис. 2). Всего методом ПЦР исследовано 376 образцов воды. ДНК *L. pneumophila* в различной концентрации выявлена в 103 образцах (27,4 %). Для подтверждения результатов 75 проб, положительных в ПЦР, с концентрацией ДНК *L. pneumophila* более  $1 \cdot 10^3$  г.э./л исследованы бактериологическим методом. В результате из 33 проб (8,8 % от общего числа) выделены культуры, которые по совокупности морфологических, культуральных, серологических и генетических признаков идентифицированы как *L. pneumophila*, концентрация возбудителя составила от  $4 \cdot 10^1$  до  $2,18 \cdot 10^4$  КОЕ/л.

По результатам агглютинации с латекс-диагностикумом *Legionella latex test* (Oxoid) 7 культур были отнесены к 1-й серогруппе, 26 – к 2–14-й серогруппам.

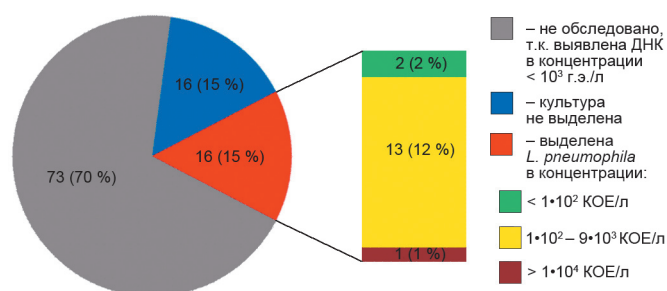


Рис. 2. Результаты обследования объектов на наличие в системах горячего водоснабжения *L. pneumophila* бактериологическим методом

Проведено MLST-типирование 7 штаммов 1-й серогруппы и 2 штаммов 2–14-й серогрупп. Среди штаммов 1-й серогруппы преобладал сиквенс-тип ST-1 (аллельный профиль: *flaA*-1, *pilE*-4, *asd*-3, *mip*-1, *mompS*-1, *proA*-1, *neuA*-1), являющийся наиболее распространенным в мире, к которому относились шесть изолятов. Еще один штамм 1-й серогруппы отнесен к сиквенс-типу ST-366 (аллельный профиль: *flaA*-2, *pilE*-10, *asd*-3, *mip*-3, *mompS*-9, *proA*-4, *neuA*-6). Аллельный профиль двух штаммов легионеллы 2–14-й серогруппы значительно отличался от штаммов 1-й серогруппы: *flaA*-3, *pilE*-10, *asd*-1, *mip*-28, *mompS* 14, *proA* 9, *neuA*-0.

В результате проведения MLST выявлена генетическая неоднородность штаммов *L. pneumophila*, циркулирующих в регионе г.к. Сочи. Данные о сиквенс-типах штаммов могут быть использованы при эпидемиологической расшифровке случаев заболевания легионеллезом.

При сравнении результатов ПЦР и бактериологических исследований установлено, что количество положительных результатов, полученных методом ПЦР, в 3,3 раза больше, чем культуральным методом. Концентрация ДНК возбудителя в пробе (г.э./л), выявленная с помощью ПЦР, также была, как правило, выше, чем концентрация микробных клеток (КОЕ/л), определенная при бактериологическом анализе. Это позволяет предположить выявление ДНК мертвых микробных клеток [3, 4, 5].

Опыт применения количественной ПЦР как основного метода при проведении мониторинговых исследований уровня контаминации систем горячего водоснабжения возбудителем легионеллеза показал, что его достоинством является сокращение сроков выполнения анализа до 1–2 сут, минимизация трудозатрат персонала и возможность своевременного проведения профилактических и дезинфекционных мероприятий. Однако выявлен низкий процент корреляции результатов ПЦР и бактериологического исследования. Возможность детекции ДНК мертвых микробных клеток при постановке ПЦР приводит к получению ложноположительных результатов и невозможности применения данного метода для контроля эффективности профилактических и дезинфекционных мероприятий. Существенные количественные различия между концентрацией геномных копий возбудителя, выявляемых в ПЦР, и числом колоний образующих единиц, определяемых при бактериологическом исследовании, свидетельствуют о необходимости более четкого определения места количественной ПЦР в схеме лабораторного анализа и разработки соответствующей нормативно-методической базы, регламентирующей роль генодиагностических методов при проведении мониторинговых исследований контаминации водных объектов *L. pneumophila*.

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



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Порядок лабораторного обеспечения исследований проб окружающей среды в период проведения XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. URL: <http://www.snipchi.ru> (дата обращения 12.09.14).
2. Тартаковский И.С., Темежникова Н.Д., Карпова Т.И. Легионеллез: проблемы и перспективы лабораторной диагностики. *Пробл. особо опасных инф.* 2005; 90:17–23.
3. Kao P.M., Tung M.C., Hsu B.M., Chiu Y.C., She C.Y., Shen S.M., Huang Y.L., Huang W.C. Identification and quantitative detection of *Legionella* spp. in various aquatic environments by real-time PCR assay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20(9):6128–37.
4. Bonetta Sa., Bonetta Si., Ferretti E., Balocco F., Carraro E. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(5):1576–83.
5. Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., Múrtula R., Martínez L., Catalán V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 85(2):124–30.

## References

1. [Procedures for the laboratory support of the environmental sample investigations during the XXII Olympics and XI Paralympics in the resort town Sochi, 2014] (cited 12 Sep 2014). Available from: <http://www.snipchi.ru>.
2. Tartakovsky I.S., Temezhnikova N.D., Karpova T.I. [Legionellosis: problems and prospects of laboratory diagnosis]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2005; 90:17–23.
3. Kao P.M., Tung M.C., Hsu B.M., Chiu Y.C., She C.Y., Shen S.M., Huang Y.L., Huang W.C. Identification and quantitative detection of *Legionella* spp. in various aquatic environments by real-time PCR assay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013; 20(9):6128–37.
4. Bonetta Sa., Bonetta Si., Ferretti E., Balocco F., Carraro E. Evaluation of *Legionella pneumophila* contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 108(5):1576–83.
5. Yáñez M.A., Nocker A., Soria-Soria E., Múrtula R., Martínez L., Catalán V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods.* 2011; 85(2):124–30.

## Authors:

Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Gus'kov A.S., Pochtareva E.S. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.  
 Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Volynkina A.S., Savel'ev V.N., Mikhailova M.E., Kuznetsova I.V., Bobenko O.A., Efremenko D.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Portenko S.A., Kazakova E.S., Krasovskaya T.Yu., Kuklev V.E., Kas'yan I.A., Bil'ko E.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Platonov M.E., Teimurazov M.G., Polosenko O.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)

Eldinova V.E., Boiko E.A., Malay V.I. Black Sea Plague Control Station. 90, Kunikova St., Novorossiysk, 353919, Russian Federation. E-mail: [novppchs@rambler.ru](mailto:novppchs@rambler.ru)

Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Biryukov V.A., Bozhko I.I. Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory. 100, Rashpilevskaya St., Krasnodar, 350000, Russian Federation. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Shcherbina L.I. Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory. Krasnodar, Russian Federation.

Pogudina O.A. Territorial Subdivision of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the Resort Town of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

## Об авторах:

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

Куличенко А.Н., Савельева И.В., Волынкина А.С., Савельев В.Н., Михайлова М.Е., Кузнецова И.В., Бобенко О.А., Ефременко Д.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru)

Портенко С.А., Казакова Е.С., Красовская Т.Ю., Куклев В.Е., Касьян И.А., Билько Е.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Мицевич Е.В., Мицевич И.П., Платонов М.Е., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: [info@obolensk.org](mailto:info@obolensk.org)

Елдинова В.Е., Бойко Е.А., Малай В.И. Причерноморская противочумная станция. Российская Федерация, 353919, Краснодарский край, Новороссийск, ул. Куникова, 90. E-mail: [novppchs@rambler.ru](mailto:novppchs@rambler.ru)

Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Бирюков В.А., Божко И.И. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Российская Федерация, 350000, Краснодар, ул. Рапишевская, 100. E-mail: [upravlenie@kubanrpn.ru](mailto:upravlenie@kubanrpn.ru)

Щербина Л.И. Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае. Российская Федерация, Краснодар.

Погудина О.А. Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Поступила 09.12.14.

Н.А.Осина, А.М.Сеничкина, Т.В.Бугоркова, С.А.Щербакова

## РАЗРАБОТКА АМПЛИФИКАЦИОННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

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

Разработан способ обнаружения ДНК туляремиального микроба методом ПЦР с электрофоретическим и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов. В качестве ДНК-матрицы выбраны гены *iglBC*, которые являются видоспецифичными для возбудителя туляремии. На основе полученных результатов созданы препараты для выявления ДНК туляремиального микроба в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с учетом результатов методом электрофореза и в режиме реального времени: «Ген *Francisella tularensis* – РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* – РГФ» соответственно. Определена форма комплектации данных тест-систем. Чувствительность и специфичность сконструированных наборов определена при исследовании бактериальных взвесей туляремиального микроба, суспензий органов мелких млекопитающих, клещей, блох, комаров, проб почвы, воды открытых водоемов, мокроты и крови человека, искусственно контаминированных возбудителем туляремии. Установлена высокая чувствительность –  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл и специфичность – 100 % разработанных тест-систем вне зависимости от вида исследуемого материала.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, ДНК, ПЦР в режиме реального времени, детекция, наборы реагентов.

N.A.Osina, A.M.Senichkina, T.V.Bugorkova, S.A.Shcherbakova

## Development of Amplification Test-Systems for Tularemia Agent Detection

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

Developed is the method for tularemia microbe DNA detection using PCR with electrophoretic and hybridization-fluorescent registration of results. *iglBC* genes have been chosen as DNA-matrixes, being species-specific ones for tularemia agent. Based on the results obtained constructed have been preparations for tularemia microbe DNA detection in biological material and environmental samples applying PCR with electrophoretic registration of results and real-time PCR: "Gene *Francisella tularensis* – REP" and "Gene *Francisella tularensis* RHF", respectively. Identified are the package contents to be included into the test-systems. Sensitivity and specificity of the designed panels are validated through investigations of tularemia agent bacterial emulsions and suspensions from small mammals' organs, from ticks, fleas and mosquitoes, as well as through studies of soil and surface water samples, sputum and human blood probes, experimentally contaminated with tularemia agent. Test-systems demonstrate high sensitivity ( $1 \cdot 10^3$  microbe cells/ml) and specificity (100 %), irrespective of the type of test material.

**Key words:** *Francisella tularensis*, DNA, real-time PCR, detection, reagent panels.

По данным Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году», за последние годы отмечается активизация природно-очаговых болезней, расширяется их ареал. В 2012 г. заболеваемость туляремией увеличилась по сравнению с 2011 г. в 2,2 раза. Последняя вспышка данной инфекции зарегистрирована в 2013 г. в Ханты-Мансийском автономном округе, где число заболевших составило 1005 человек. Кроме того, возбудитель туляремии, по причине высокой контагиозности, отнесен к наиболее опасным агентам биотерроризма [1].

Поэтому крайне важным остается своевременное выявление патогена в биологическом материале и объектах окружающей среды. Одним из наиболее перспективных подходов для индикации туляремиального микроба представляется полимеразная цепная реакция. Получены многочисленные подтверждения эффективности применения данного приема для выявления возбудителя туляремии в пробах крови, суспензиях клещей, органов мелких млекопитающих, а также для идентификации выделенных культур туляремиального микроба [3, 5, 6].

В отечественных и зарубежных документах по ла-

бораторной диагностике туляремии ПЦР рассматривается как один из методов индикации ДНК *Francisella tularensis* в исследуемом материале от человека и животных, объектах окружающей среды. Однако на момент начала исследования в Российской Федерации отсутствовали зарегистрированные диагностические препараты для генной диагностики туляремии, а в большинстве из представленных работ описаны только методические приемы по выявлению патогена.

Целью работы является разработка диагностических препаратов для выявления ДНК *F. tularensis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным и электрофоретическим учетом результатов.

## Материалы и методы

В работе использовано 173 штамма микроорганизмов, из них 101 – *F. tularensis* (подвидов *tularensis*, *holarctica* (биоваров *japonica*, *Ery<sup>r</sup>*, *Ery<sup>s</sup>*), *mediasiatica* и *novicida*) и 72 штамма гетерологичных микроорганизмов, представителей родов *Yersinia spp.* – 12, *Brucella spp.* – 10, *Bacillus spp.* – 10, *Escherichia spp.* – 10, *Vibrio spp.* – 8, *Salmonella spp.* – 10, *Pseudomonas spp.* – 12. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Штаммы микроорганизмов выращивали на питательных средах: *F. tularensis* – на среде питательной для выделения возбудителя туляремии FT (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), pH 7,2.; *Brucella spp.* – на эритроагаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2 при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч; *Yersinia spp.*, *Escherichia spp.* и *Bacillus spp.* – на среде Хоттингера, pH 7,2; *Vibrio spp.* – на агаре из сердечной мышцы, pH 7,6 при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Бактериальные взвеси клеток готовили в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл для *F. tularensis*,  $1,6 \cdot 10^9$  – для возбудителя бруцеллеза,  $1 \cdot 10^9$  – для других гетерологичных микроорганизмов. Для *V. cholerae* микробную взвесь готовили по отраслевому стандартному образцу мутности 5 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-86-П (5МЕ)), что соответствует  $1,1 \cdot 10^9$  м.к./мл. Затем проводили 10-кратные разведения подготовленных суспензий в 0,9 % растворе натрия хлорида до конечной концентрации *F. tularensis*  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^3$ ,  $1 \cdot 10^2$  м.к./мл, гетерологичных микроорганизмов  $1 \cdot 10^4$  м.к./мл. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем посева 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из разведений  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл на соответствующие плотные питательные среды.

Пробы суспензий печени и селезенки мыши, клещей, блох и комаров, крови и мокроты человека, почвы и воды открытых водоемов искусственно контаминировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ до конечной концентрации  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Дополнительно исследовали нативные образцы указанного биологического материала и объектов окружающей среды.

Обеззараживание проб осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «ДНК-сорб В», «Рибо-сорб», «Рибо-преп». Работу проводили в соответствии с инструкциями к указанным препаратам.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа RotorGene («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Терцик МС2 («ДНК-технология», Россия). Учет результатов осуществляли гибридационно-флуоресцентным методом с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени и с помощью электрофоре-за в 2 % агарозном геле.

### Результаты и обсуждение

Процесс конструирования амплификационных тест-систем включает в себя определение способа выявления ДНК патогена методом ПЦР, оценку специфичности и чувствительности реакции при исследовании чистых культур микроорганизмов, а также проб био-

логического материала и объектов окружающей среды, искусственно контаминированных возбудителем, комплектацию экспериментальных серий препарата и изучение его диагностической ценности и сроков годности. Поэтому первым этапом нашей работы стала разработка ПЦР с гибридационно-флуоресцентным и электрофоретическим учетом результатов для выявления ДНК туляремийного микроба.

Отличительной особенностью представителей рода *Francisella* (*F. tularensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis*, *F. hispaniensis*, *F. haliotica*) является их высокая степень генетического сходства. Так, гены 16S рДНК характеризуются высокой гомологией как между отдельными видами (*F. tularensis* и *F. philomiragia*), так и между близкородственными возбудителями туляремии микроорганизмами (*Wolbachia persica* и др. эндосимбионты клещей родов *Amblyomma*, *Ornithodoros* и *Dermacentor*) [4, 7]. Использованный ранее в качестве ДНК-мишени при выявлении туляремийного микроба методом ПЦР ген *lpaA*, кодирующий синтез предшественника мембранного белка 17 кДа (Tul4), обнаружен у штаммов *F. philomiragia*, а его последовательность схожа с участками генома эндосимбионтов клещей рода *Dermacentor* [2, 3, 5, 6]. Все это не позволяет рассматривать эти локусы как специфичные для *F. tularensis*.

Установлена возможность обнаружения ДНК *F. tularensis* методом ПЦР на основании амплификации фрагмента гена *fopA*, кодирующего белок внешней мембраны, и генов *iglBC*, отвечающих за синтез белков, необходимых для внутриклеточного роста патогена [2, 7]. Анализ нуклеотидных последовательностей данных локусов с помощью алгоритма BLAST и базы данных GenBank NCBI показал, что ген *fopA* у разных штаммов туляремийного микроба идентичен на 90 % и имеет мозаичную структуру, в которой гомологичные участки протяженностью 200–300 п.н. чередуются с аналогичными по размеру вариabельными. В то же время полиморфизм генов *iglBC* составляет всего 1 % и затрагивает 21 нуклеотид у всех подвидов. Поэтому в качестве ДНК-матрицы нами для дальнейшей работы выбраны *iglBC* гены.

С помощью программного обеспечения на сайте [www.genscript.com](http://www.genscript.com), программы GeneRanner 3.1., алгоритма BLAST и базы данных GenBank NCBI подобраны специфичные праймеры и зонд формата TaqMan. Характеристика выбранных олигонуклеотидов представлена в табл. 1.

Подобранные праймеры YFtl1s–YFtl1a обеспечивают амплификацию фрагмента *iglBC* генов размером 268 п.н., а для образования флуоресцентного сигнала в состав зонда с 5'-конца введена флуоресцентная метка ROX, а с 3'-конца – BHQ2.

В ходе последующих экспериментов определены оптимальные условия ПЦР с выбранными праймерами и зондом с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. Из данных табл. 1 видно, что нуклеотидная последовательность праймеров и зондов имеет высокое сходство с ДНК человека и мыши, поэтому особое внимание уделено определению специфичности реакции при исследова-



Таблица 1

Характеристика праймеров и зонда, подобранных на основе <i>iglBC</i> генов туляремиального микроба						
Наименование праймера	Размер, п.н.	% GC	Температура отжига, °C	Гомология с ДНК <i>F. tularensis</i> всех подвидов, %	Гомология с ДНК <i>F. philomiragia</i> / <i>F. noatunensis</i> , %	Гомология с ДНК человека/мыши, %
YFtlIs	26	46	58	100	15/19	69/65
YFtla	24	50	58	100	83/91	83/75
FT	25	44	62	100	40/40	68/68

нии нативных проб биологического материала, не содержащих ДНК возбудителя туляремии.

Материалом для анализа служили препараты ДНК, выделенные из бактериальных суспензий туляремиального микроба с концентрацией  $1 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^3$ ,  $1 \cdot 10^2$  м.к./мл, *Y. pseudotuberculosis* –  $1 \cdot 10^4$ , суспензий печени, селезенки белой мыши и клещей. Для проведения ПЦР использовали 3 фермента для обычной реакции: «ДиаТак-полимераза» (ИнтерЛабСервис, Россия), Taq ДНК-полимераза с буфером AS (СибЭнзим, Россия), Taq ДНК-полимераза рекомбинантная (Fermentas, США), 4 фермента для осуществления амплификации в режиме «горячего старта»: TaqF ДНК-полимераза (ИнтерЛабСервис, Россия), Hot-Start Taq ДНК-полимераза (СибЭнзим, Россия), Taq ДНК-полимераза Maxima Hot-Start (Fermentas, США), Syn Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами (Синтол, Россия), а также соответствующий для каждого фермента 10-кратный буферный раствор, 25 или 50 мМоль раствор магния хлорида, 25 мМоль раствор ДНТФ каждого из производителей, праймеры и зонд с концентрацией 100 пМоль/мкл. Для исключения возможных сложностей при комплектации готового препарата мы не применяли способ проведения реакции по типу «горячего старта», при котором компоненты реакционной смеси разделены слоем парафина.

Из представленных в табл. 2 данных видно, что наименьшее количество ложноположительных ответов при исследовании суспензии органов белой мыши и клещей отмечено при использовании Taq ДНК-полимеразы рекомбинантной (Fermentas, США), Hot-Start Taq ДНК-полимеразы (СибЭнзим, Россия), Syn Taq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами (Синтол, Россия), Taq ДНК-полимеразы Maxima Hot-Start (Fermentas, США).

Однако чувствительность реакции с некоторыми из этих ферментов не всегда составляла  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл. На основании полученных результатов для дальнейшей работы выбраны Hot-Start Taq ДНК-полимераза и Syn Taq ДНК-полимераза.

В дальнейших экспериментах варьировали концентрации праймеров от 8 до 15 пМоль, зонда – от 4 до 8 пМоль, ионов  $Mg^{2+}$  – от 2 до 3 мМоль, фермента – 1–2 ед. Установлено, что для проведения ПЦР с учетом результатов методом электрофореза в составе реакционной смеси должно быть не менее 10 пМоль каждого праймера, а при гибридационно-флуоресцентной детекции – содержание праймеров и зонда составляет 8 и 4 пМоль соответственно.

Вне зависимости от способа учета результатов оптимальная концентрация ионов магния составляет 2 мМоль, фермента – 1 ед. Высокую чувствительность и специфичность реакции обеспечивает не только подобранный состав реакционной смеси, но и программа амплификации. В данном случае разработаны условия проведения реакции с электрофоретическим учетом результатов на амплификаторах с матричным и активным режимом термоциклирования и в режиме реального времени на приборах типа RotorGene (табл. 3).

При проведении ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов важны значения пороговой линии Threshold и Ct, при которых реакция считается положительной. Установлено, что для учета результатов реакции с выбранными праймерами и зондом эти показатели составляют 0,1 и не более 32 соответственно. Определены значения других функций, которые используются программным обеспечением термоциклеров типа RotorGene для учета флуоресценции: активизация «Slope Correct»/«Коррек. уклона», «More settings»/«Outlier

Таблица 2

Эффективность ПЦР с подобранными праймерами и зондом при использовании различных ферментов									
Наименование проб	Концентрация, м.к./мл	Кол-во	Наличие амплификации фрагмента <i>iglBC</i> генов размером 268 п.н./специфичной флуоресценции по каналу ROX при проведении реакции с ферментом						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
Бактериальные суспензии	$1 \cdot 10^4$	10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
<i>F. tularensis</i>	$1 \cdot 10^3$	10	7/8	6/6	9/10	9/10	10/10	8/9	10/10
	$1 \cdot 10^2$	10	0/5	0/5	0/5	1/6	3/6	0/2	2/5
Бактериальные суспензии	$1 \cdot 10^4$	10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>									
Суспензия печени и селезенки белой мыши	н/и	10	1/1	0/1	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
Суспензия клещей	н/и	10	1/2	1/2	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0

Примечания: I – «ДиаТак-полимераза», II – Taq ДНК-полимераза с буфером AS, III – Taq ДНК-полимераза рекомбинантная, IV – TaqF ДНК-полимераза, V – Hot-Start Taq ДНК-полимераза, VI – Taq ДНК-полимераза Maxima Hot-Start, VII – Syn Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами; н/и – не используется.



Программа амплификации с использованием подобранных праймеров и зонда

Тип ПЦР	Программа амплификации
ПЦР-ЭФ	95 °C – пауза, 95 °C – 5/5 мин, 5 циклов: 95 °C – 40/10 с, 62 °C – 40/10 с, 72 °C – 40/10 с, 30 циклов: 95 °C – 30/7 с, 60 °C – 30/7 с, 72 °C – 30/7 с, 72 °C – 5 мин
ПЦР-РВ	95 °C – 5 мин, 10 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, 35 циклов: 95 °C – 20 с, 56 °C – 20 с, 72 °C – 20 с Детекция флуоресцентного сигнала при температуре 56 °C во втором блоке циклирования по каналу Orange/ROX

Примечание. Через дробь указаны данные продолжительности этапа при использовании активного и матричного режимов термоденатурации.

Removal)/«Устранение выбросов» – 5 %.

Чувствительность и специфичность разработанных ПЦР вне зависимости от условий регистрации результатов составила  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл и 100 % соответственно как при исследовании чистых культур, так и проб биологического материала.

На основании полученных результатов нами разработаны два генодиагностических препарата: «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РЭФ)» и «Набор реагентов для выявления ДНК *Francisella tularensis* методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов (Ген *Francisella tularensis* – РГФ)». В их состав вошли все реагенты необходимые для проведения анализа. С целью минимизации операций при сборке реакционной смеси из реагентов для ПЦР подготовлены две смеси: ПЦР-смесь 1 – праймеры, дНТФ, натрия азид; ПЦР-смесь 2 – 2,5-кратный буфер. В ходе тестирования такой формы комплектации в течение 9 месяцев показано сохранение заявленной чувствительности наборов –  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл и специфичности – 100 % в течение 6 месяцев.

На следующем этапе нами определена чувствительность и специфичность разработанных наборов реагентов. Для этого исследовали бактериальные суспензии 101 штамма туляремийного микроба (*tularensis* – 10, *holarctica* – 87, *mediasiatica* – 2 и *novicida* – 2), 72 штаммов гетерологичных микроорганизмов (представителей родов *Yersinia spp.*, *Brucella spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia spp.*, *Vibrio spp.*) и 100 проб суспензий внутренних органов мелких млекопитающих, клещей, блох, комаров, крови человека, искусственно контаминированных *F. tularensis*. Во всех случаях вне зависимости от вида материала подтверждена чувствительность, специфичность и воспроизводимость сконструированных наборов реагентов.

Таким образом, нами разработан способ выявления ДНК туляремийного микроба методом ПЦР с электрофоретическим и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, где в качестве ДНК-матрицы использованы видоспецифичные гены *iglBC*, специфичные для вида *F. tularensis*, созданы наборы реагентов для его осуществления. Показана высокая чувствительность ( $1 \cdot 10^3$  м.к./мл) и специфичность (100 %) созданных амплификационных тест-систем как при исследовании чистых культур микроорганизмов, так и проб биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно инфицированных возбудителем туляремии.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинзбург А.Л. Проблема биотерроризма в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 3:3–12.
2. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):689–93.
3. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., Goransson I., Wollin R., Forsman M., Tarnvik A., Sjostedt A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):22–6.
4. Kugeler K.J. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella-like* endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(11):7594–7.
5. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B., Fortier A.H., Porter K.R., Nacy C.A. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):152–4.
6. Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tarnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(5):1045–8.
7. Versage J.L., Severin D.D., Chu M.C., Petersen J.H. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5492–9.

#### References

1. Vorob'ev A.A., Boev B.V., Bondarenko V.M., Ginzburg A.L. [Biотerrorism issue under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 3:3–12.
2. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within infected mouse tissues by using a hand-held PCR thermocycler. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):689–93.
3. Johansson A., Berglund L., Eriksson U., Goransson I., Wollin R., Forsman M., Tarnvik A., Sjostedt A. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):22–6.
4. Kugeler K.J. Discrimination between *Francisella tularensis* and *Francisella-like* endosymbionts when screening ticks by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71(11):7594–7.
5. Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B., Fortier A.H., Porter K.R., Nacy C.A. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):152–4.
6. Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tarnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(5):1045–8.
7. Versage J.L., Severin D.D., Chu M.C., Petersen J.H. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:5492–9.

#### Authors:

Osina N.A., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapimicrobe.ru

#### Об авторах:

Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapimicrobe.ru

Поступила 18.11.14.

В.М.Павлов<sup>1</sup>, И.И.Козлова<sup>2</sup>, А.Н.Мокриевич<sup>1</sup>, О.Д.Шутко<sup>2</sup>, В.С.Тимофеев<sup>1</sup>, Р.И.Миронова<sup>1</sup>,  
Т.С.Кузнецова<sup>2</sup>, Н.М.Файзуллина<sup>2</sup>, Т.Ю.Кудрявцева<sup>1</sup>, Т.И.Комбарова<sup>1</sup>, И.А.Дятлов<sup>1</sup>

## ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ЛЮДЕЙ И МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ ВО ВРЕМЯ ЭПИДЕМИИ ТУЛЯРЕМИИ В ХАНТЫ-МАНСЬИСКЕ В 2013 г.

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре», Ханты-Мансийск, Российская Федерация

В работе приведены данные о выделении культур *Francisella tularensis* от людей и грызунов во время эпидемии туляремии среди жителей Ханты-Мансийска в августе–сентябре 2013 г. Все выделенные штаммы *F. tularensis* (шесть культур туляремиального микроба от больных и четыре – от мелких грызунов, отловленных в городе и его окрестностях) относятся к голарктическому подвиду, высоковирулентны для лабораторных мышей, устойчивы к эритромицину, ампициллину и цефалоспорином, но чувствительны к амикацину, тетрациклину, доксициклину и гентамицину. Методом MLVA по 25 локусам показано, что исследованные штаммы располагаются одним кластером на филогенетическом дереве вместе со штаммами *F. tularensis*, выделенными ранее на территории Южного Урала и Казахстана. Все штаммы из очага являются близкородственными и, по данным анализа гипервариабельного локуса Ft-M3, подразделяются на четыре группы. Штаммы, выделенные от людей, образуют три группы, а штаммы, выделенные от мелких грызунов – две, причем в одну из групп Ханты-Мансийского кластера попали штаммы, выделенные как от людей, так и грызунов.

**Ключевые слова:** туляремия, *Francisella tularensis*, однопраймерное типирование, MLVA-типирование, антибиотики.

V.M.Pavlov<sup>1</sup>, I.I.Kozlova<sup>2</sup>, A.N.Mokrievich<sup>1</sup>, O.D.Shutko<sup>2</sup>, V.S.Timofeev<sup>1</sup>, R.I.Mironova<sup>1</sup>, T.S.Kuznetsova<sup>2</sup>,  
N.M.Faizullina<sup>2</sup>, T.Yu.Kudryavtseva<sup>1</sup>, T.I.Kombarova<sup>1</sup>, I.A.Dyatlov<sup>1</sup>

## Characteristics of Tularemia Agent Strains Isolated from Patients and Small Rodents during Tularemia Epidemic in Khanty-Mansiisk in 2013

<sup>1</sup>State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; <sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra, Khanty-Mansiisk, Russian Federation

The paper contains the data on isolation of *Francisella tularensis* cultures from humans and rodents during tularemia epidemic in Khanty-Mansiisk in August–September, 2013. All the obtained *F. tularensis* strains (six cultures of tularemia microbe from patients, and four cultures – from small rodents caught in the territory of the city and its suburbs) fall under Holarctic subspecies, are highly virulent for the laboratory mice, resistant to erythromycin, ampicillin, and cephalosporin, but sensitive to amikacin, tetracycline, doxycycline, and gentamycin. Using 25-locus-MLVA typing it is demonstrated that the strains under study form a common cluster on the phylogenetic tree along with *F. tularensis* strains previously isolated in the territory of the Southern Urals and Kazakhstan. All the strains from the foci are closely related ones, and based on the investigations of hyper-variable Ft-M3 locus, fall into four groups. The strains, isolated from humans, combine into three groups, and the strains isolated from rodents – into two, and notably that one of the groups of Khanty-Mansiisk cluster comprises the strains isolated from both humans and rodents.

**Key words:** tularemia, *Francisella tularensis*, single-primer typing, MLVA-typing, antibiotics.

Туляремия – острое инфекционное заболевание животных и человека, вызывается бактериями *Francisella tularensis*. В Российской Федерации возбудитель туляремии обнаруживается на территории практически всех краев, областей и республик.

Ханты-Мансийский автономный округ расположен в природном очаге туляремии пойменно-болотного типа, где основным резервуаром являются водная полевка, красная полевка, ондатра, красно-серая полевка. Переносчиками служат комары и слепни, которые обильно населяют округ в силу особенностей его гидрографии.

Анализ многолетней заболеваемости свидетельствует о высокой активности и стойкости природного очага. В 30–50-х годах прошлого века вспышки туляремии регистрировались на всей территории округа.

В 60-е годы, с началом массовой вакцинации на-

селения округа, произошло резкое снижение заболеваемости. Кроме того, на активность очага оказало влияние сокращение численности водяной полевки и ондатры из-за интенсивного освоения восточных районов округа в связи с разработкой нефтегазовых месторождений.

В то же время в западных и центральных районах (Кондинский, Ханты-Мансийский, Октябрьский районы) сохранялась высокая активность природного очага, что на фоне снижения объемов иммунизации привело к крупным вспышкам в 1983–1985 гг. Данную эпидемию удалось ликвидировать в результате сплошной вакцинации населения.

За последние 20 лет заболеваемость регистрировалась в 5 муниципальных образованиях. С 1993 г. зарегистрировано 34 случая заболевания, в том числе 2 групповых: пгт. Березово в 2007 г. – 22 случая,

Октябрьский район в 1998 г. – 6 случаев. В Ханты-Мансийске последний случай туляремии зарегистрирован в 2001 г. В 2012 г. случаев туляремии в округе не регистрировали.

В 2010–2012 гг. наблюдали нарастание эпизоотической активности природных очагов туляремии в Ханты-Мансийском, Сургутском, Нефтеюганском, Октябрьском районах и городах Ханты-Мансийск, Нижневартовск, Нягань, Сургут, Пыть-Ях. Серологический анализ биологического материала, взятого от рыжих и красных полевок, показал наличие специфических титров у большинства исследованных животных от 1:20 до 1:80.

В 2013 г. произошло резкое обострение эпизоотической ситуации по туляремии на значительной части территории округа. По данным Иркутского НИПЧИ, при исследовании методом ИФА 189 экзemplаров грызунов на туляремию получено 107 положительных (56,6 %) серологических результатов в реакции РНГА с эритроцитарным тулярийным диагностикумом.

Обширная эпизоотия в пойменных очагах Округа способствовала массовому заражению тулярией жителей Ханты-Мансийска. За август–сентябрь 2013 г. заболели тулярией, по официальным данным, 1005 человек, в том числе 156 детей. Масштабы эпидемии заставили объявить в городе и на прилегающих территориях режим чрезвычайной ситуации, который был отменен только в октябре 2013 г.

Заболевание характеризовалось повышением температуры до 40,0 °С, ознобом, слабостью, недомоганием, ломотой в теле, у всех больных отмечалось увеличение периферических лимфоузлов, болезненных при пальпации. У многих больных отмечен гиперемизированный след укуса насекомого с просветлением в центре, у некоторых – язвочка или вскрывшийся фурункул.

При анализе по месту заражения установлено, что 34,42 % заболевших заразились в городской черте, 36,13 – при отдыхе и постоянном проживании на дачных участках, 11,95 – на рыбалке, 9,96 – в местах массового отдыха, 7,25 – при нахождении на территории Ханты-Мансийского района, 0,28 – на охоте.

В данной работе проведен анализ образцов биологического материала, отобранного из пустул пациентов Окружной больницы Ханты-Мансийска с диагнозом «туляремия»; мелких грызунов, отловленных на территории окружного центра и его окрестностей в период с 23.08.2013 по 29.09.2013 г., на наличие возбудителя туляремии. Выделенные культуры изучены микробиологическими и биологическими методами, а также методами однопраймерного ПЦР и MLVA по 25 локусам.

### Материалы и методы

В работе использовали 10 штаммов, выделенных от пациентов и мелких грызунов в Ханты-Мансийске. Для однопраймерного ПЦР-типирования использо-

вали праймер *Chilf* [2]. Для MLVA-анализа использовали праймеры, последовательности которых приведены в работе A. Johanson *et al.* [6].

Бактерии выращивали на среде FT-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ) с добавлением полимиксина В (Pm) в концентрации 100 мкг/мл<sup>-1</sup> при температуре 37 °С. Определение антибиотикочувствительности тулярийного микроба проводили диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [5]. На засеянный агар (по 0,2 мл из суспензии, стандартизированной по отраслевому стандартному образцу мутности 5 ед. (ОСО 42-28-86 П) наносили диски с эритромицином 15 мкг, ампициллином 10 мкг, цефтриаксоном 30 мкг, цефуроксимом 30 мкг, цефокситином 30 мкг, цефтазидимом 30 мкг, цефотаксимом 30 мкг, цефепином 30 мкг, амикацином 30 мкг, тетрациклином 30 мкг, доксициклином 10 мкг и гентамицином 10 мкг.

Биологический материал получен от пациентов с диагнозом «туляремия» и мелких грызунов, отловленных на территории окружного центра и его окрестностей. Содержимое пустул забирали с помощью стерильного ватного тампона и переносили в пробирки с 200 мкл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Высевы из пустул проводили на FT-агар и инкубировали в течение 6 сут.

Для выявления возбудителя туляремии в грызунах проводили вскрытие отловленных животных и забор селезенки. Высевы из селезенки проводили методом отпечатков на FT-агар и из суспензий гомогенизированных селезенки в 0,9 % раствор натрия хлорида.

Гомогенат селезенки грызунов вводили подкожно по 0,1 мл трем мышам линии BALB/c (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 недель, массой 18–20 г). За мышами наблюдали в течение 21 сут. Одну мышь на 5-е сутки после заражения эвтаназировали и делали высев суспензии селезенки, полученной растиранием органа в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида, на чашки с FT-агаром.

DCI культур *F. tularensis* для мышей линии BALB/c оценивали по методу Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [1]. Мышей (по 5 в группе) инфицировали подкожно бактериальной суспензией в дозах 1·10<sup>1</sup>, 1·10<sup>2</sup> и 1·10<sup>3</sup> КОЕ/мышь и наблюдали в течение 21 сут.

Для определения видовой принадлежности культур использовали набор реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии (ИХ-тест *F. tularensis*) (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Выделение ДНК *F. tularensis* из биомассы суточной агаровой культуры осуществляли с использованием коммерческого набора «Рибсорб» («ИнтерЛабСервис»). Для детекции гена *iglC* использовали праймеры, приведенные в [3]. Однопраймерную ПЦР с праймером *Chilf* проводили, как описано ранее [2].

При амплификации использовали термоци-



клер «Applied biosystem 2700», США. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1,8 % агарозном геле. ДНК в геле окрашивали бромистым этидием. Фотодокументирование проводили на системе для гель-документирования Vilber-Lourmat (Франция), при ультрафиолетовом освещении с помощью транс-иллюминатора фирмы «Cole Parmer», США. Для определения размеров ампликонов использовали маркер молекулярных масс GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder («Fermentas», Литва).

Для VNTR-анализа использовали 25 пар праймеров (Ft-M1–Ft-M25), последовательности которых приведены в статье A.Johanson *et al.* [6]. Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва). Условия проведения ПЦР рассчитывали с помощью пакета программ Vector NTI. Размеры ампликонов определяли по их электрофоретической подвижности в 3 % агарозном геле по отношению к подвижности молекулярных маркеров (шаг 20 п.о., BIO-RAD, США) с помощью программы PhotoCaptMw. При анализе локусов Ft-M1 и Ft-M25 определяли нуклеотидную последовательность ампликонов.

Филогенетическое дерево строилось с использованием программного комплекса BioNumerics (Softline, США) на основе метода невзвешенного парного арифметического среднего (UPGMA).

## Результаты и обсуждение

**Анализ образцов биологического материала, отобранных из пустул пациентов Окружной больницы Ханты-Мансийска с диагнозом «туляремия».** Биологический материал был взят у семи пациентов. У шести пациентов при высеве содержимого пустул на FT-агар через 4 сут обнаружен рост культуры туляремиального микроба. Видовая принадлежность культур подтверждена ИХ-тестом. При расщепе полученных культур до изолированных колоний оказалось, что все культуры, кроме одной, представлены однородными колониями. Для дальнейшего анализа отобрали по одной колонии из каждой культуры, обозначенные как штаммы X-3, X-4, X-7 и X-10. Культура, выделенная от одного пациента, при расщепе до изолированных колоний содержала два типа морфологически отличных колоний, различающихся по размеру: мелкие (одна из которых обозначена как штамм X-8M) и крупные (одна из которых обозначена как штамм X-8K). Все отобранные штаммы были высоковирулентны для лабораторных мышей (DCI<10 КОЕ).

**Анализ образцов биологического материала от мелких грызунов, отловленных на территории Ханты-Мансийска и его окрестностей в период с 23.08.2013 по 26.08.2013 г.** Для бактериологического анализа отловлено 24 грызуна (15 красных полевок, 7 буроzubок и 2 серых домовых мыши). Возбудитель туляремии обнаружен в 4 селезенках, взятых из трех красных полевок (для анализа отобрали по одной колонии этих культур и обозначили как штаммы

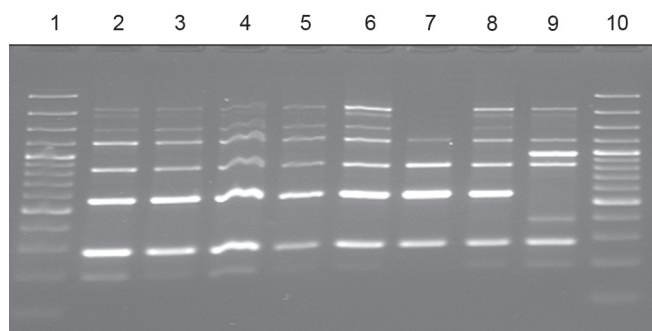


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймером *Chilf* и ДНК:

2 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* 1045; 3 – *F. tularensis* X-3; 4 – *F. tularensis* X-4; 5 – *F. tularensis* X-7; 6 – *F. tularensis* X-8K; 7 – *F. tularensis* X-8M; 8 – *F. tularensis* X-10; 9 – *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 678. В дорожках 1 и 10 – маркер молекулярных масс

X-23/1, X-23/3, X-25/1) и буроzubки (штамм X-26/2). Видовая принадлежность выделенных культур подтверждена ИХ-тестом. Все отобранные штаммы были высоковирулентны для лабораторных мышей (DCI<10 КОЕ).

**Определение подвиговой принадлежности выделенных штаммов возбудителя туляремии.** Все штаммы содержат, по данным ПЦР-анализа, видоспецифичный ген *iglC* *F. tularensis*, что подтверждает их принадлежность к роду *Francisella* (данные не приведены). Спектр ампликонов в ПЦР с праймером *Chilf* выделенных штаммов идентичен спектру, характерному для бактерий *F. tularensis* subsp. *holarctica* [2] (рис. 1).

Все штаммы образуют в однопраймерной ПЦР ампликоны с размерами ~280 и ~830 п.о., общие для бактерий вида *F. tularensis*, что подтверждает принадлежность исследуемых штаммов к данному виду. Наличие фрагмента размером ~570 п.о. характерно для голарктического подвида. Для сравнения на рис. 1 приведена электрофореграмма ампликонов, полученных с использованием ДНК *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

**Чувствительность к эритромицину.** Все 10 штаммов, выделенных от людей и грызунов, оказались устойчивыми к эритромицину, то есть относятся к биовару II (Ery<sup>R</sup>) [4].

**Генотипирование штаммов методом MLVA.** Для выяснения филогенетического родства исследуемых штаммов между собой, а также со штаммами, выделенными ранее из очагов туляремии Сибири, Урала и Казахстана, проведен VNTR-анализ по схеме, предложенной A.Johanson *et al.* [6]. По полученным данным построено филогенетическое дерево (рис. 2). VNTR-анализ подтвердил подвиговую принадлежность изучаемых штаммов туляремиального микроба к голарктическому подвиду.

Исследованные штаммы являются генетически идентичными по 24 VNTR-локусам, отличаясь между собой лишь по гипервариабельному локусу Ft-M3 (таблица). Различия в длине данного локуса позволяют разделить изучаемые штаммы на 4 индивидуальных генотипа, содержащих 9, 10, 15 и 17 повторов.



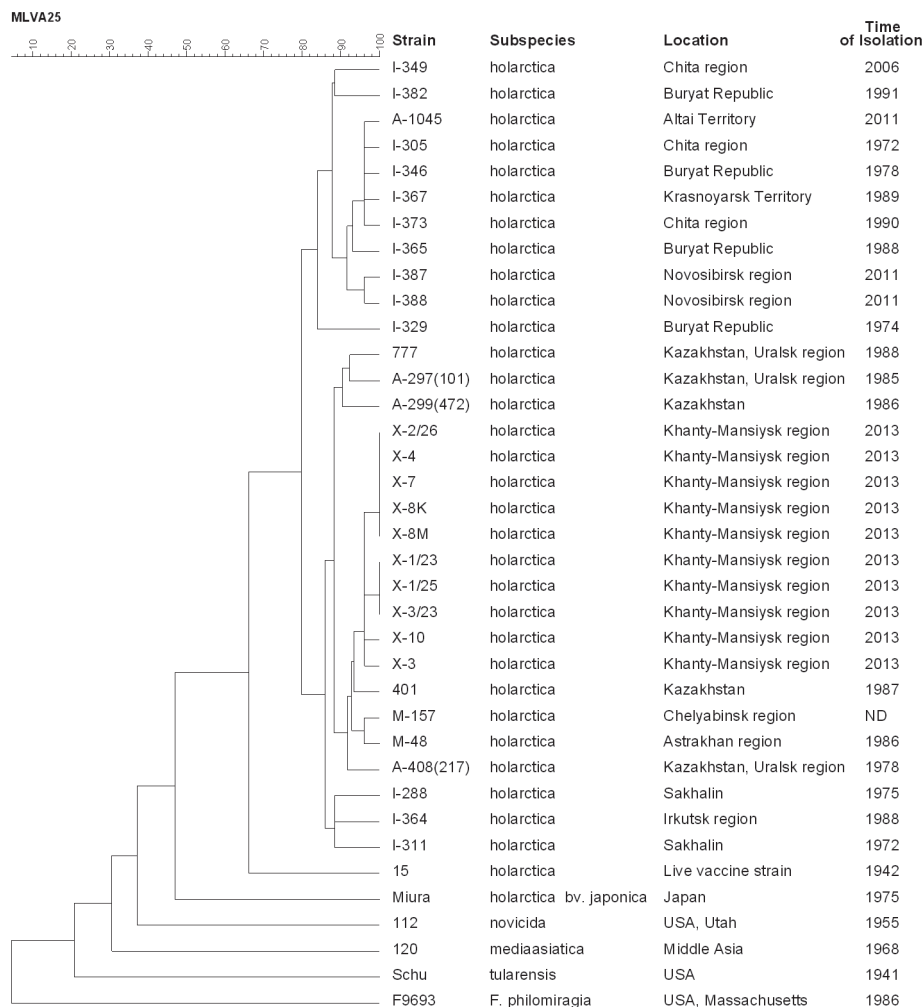


Рис. 2. Филогенетическое родство штаммов *F. tularensis*, выделенных в Ханты-Мансийске, со штаммами из близлежащих очагов туляремии

Штаммы, содержащие 15 повторов в локусе Ft-M3, составляют 50 % от общего числа. Данный генотип обнаружен как в штаммах, выделенных от людей, так и от буроzubки (штамм X-2/26). У остальных трех штаммов, выделенных от грызунов, обнаружено по 17 повторов в данном локусе. Все штаммы располагаются одним кластером, проявляя при этом наибольшее родство со штаммами, выделенными ранее на территории Южного Урала и Казахстана (рис. 2).

Таким образом, все выделенные штаммы относятся к голарктическому подвиду и являются близко-

родственными, отличаясь друг от друга по гипервариабельному локусу Ft-M3.

**Чувствительность к антибиотикам.** Штаммы туляремии микроба, выделенные в Ханты-Мансийске, оказались устойчивыми к эритромицину, ампициллину и цефалоспорином, но чувствительными к амикацину (диаметр зоны подавления роста 28 мм), тетрациклину (56 мм), доксициклину (49 мм) и гентамицину (27 мм).

Бактериологический анализ биологического материала от людей и животных, взятого в разгар эпидемии в Ханты-Мансийске, позволил выделить чистые туляремиальные культуры, не прибегая к биологическому методу. Оказалось, что в содержимом пустулы живые бактерии сохраняются в течение не менее четырех дней с момента укуса насекомыми.

Выделенные штаммы туляремии микроба имеют, по данным MLVA-типирования, наибольшее эволюционное сродство к штаммам, циркулирующим на территории Казахстана и Челябинской области и отличаются от штаммов, типичных для сибирских очагов туляремии.

Так как туляремиальные культуры, выделенные в течение трех дней, имеют четыре разных MLVA-генотипа, можно предположить, что на территории Ханты-Мансийска и его окрестностей циркулировало несколько вариантов возбудителя туляремии.

Количество tandemных повторов в локусе Ft-M3 у штаммов *F. tularensis*, выделенных в Ханты-Мансийске

Штамм	Количество tandemных повторов в локусе Ft-M3
3	9
10	10
4	15
7	15
8K	15
8M	15
2/26	15
1/23	17
3/23	17
1/25	17

Обнаружение штаммов *F. tularensis* с одинаковым количеством повторов в Ft-M3 локусе как у человека, так и у буроzubки, может свидетельствовать об общем источнике заражения грызунов и людей. Природа резервуара инфекции остается невыясненной.

Штаммы *F. tularensis*, выделенные от заболевших туляремией пациентов во время эпидемии туляремии в округе, чувствительны к антибактериальным препаратам первого ряда. Проведенный анализ 32 историй болезни показал, что в 63 % случаев в лечении применялся амикацин.

С 1959 по 1992 год на территории 8 районов автономного округа из различных объектов окружающей среды получены 94 культуры возбудителя туляремии. Наибольшее количество культур выделено в Кондинском (33 культуры), Березовском и Октябрьском районах (по 20 культур). Более 50 % культур получили из образцов воды. От водяной полевки и ее экскрементов выделили 25 культур, от ондатры – 4, от обыкновенной буроzubки – 3 и по одной культуре от рыжей полевки и полевки-экономки, тогда как возбудитель туляремии у людей не выделен. К сожалению, все ранее полученные в округе культуры не были сохранены, что не позволяет сравнивать генотип культур, выделенных в 2013 г., с вариантами туляремийного микроба, циркулировавшими в этом регионе ранее.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 с.
2. Вахрамеева Г.М., Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Миронова Р.И., Дятлов И.А. ПЦР дифференциация подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 107(1):46–8.
3. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории

Алтайского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 115(1):66–9.

4. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.

5. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.2495-09. М.; 2009.

6. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18.

#### References

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 58 p.
2. Vakhrameeva G.M., Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Mironova R.I., Dyatlov I.A. [PCR differentiation of *Francisella tularensis* subspecies using one primer]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 107(1):46–8.
3. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Isolation of Central Asian subspecies of tularemia agent in the Altai Territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 115(1):66–9.
4. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. M.: Meditsina; 1975. 192 p.
5. [Determination of sensitivity in dangerous bacterial infection agents (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, glanders, melioidosis) to anti-bacterial preparations. Methodological regulations]. MR 4.2.2495-09. M.; 2009.
6. Johansson A., Farlow J., Larsson P., Dukerich M., Chambers E., Bystrom M., Fox J., Chu M., Forsman M., Sjöstedt A., Keim P. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2004; 186:5808–18.

#### Authors:

Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Mironova R.I., Kudryavtseva T.Yu., Kombarova T.I., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org  
Kozlova I.I., Shutko O.D., Kuznetsova T.S., Faizullina N.M. Center of Hygiene and Epidemiology in the Khanty-Mansiisk Autonomous District – Yugra. 72, Roznina St., Khanty-Mansiisk, 628011, Russian Federation

#### Об авторах:

Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Миронова Р.И., Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org  
Козлова И.И., Шутко О.Д., Кузнецова Т.С., Файзуллина Н.М. Центр гигиены и эпидемиологии в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре. Российская Федерация, 628011, г. Ханты-Мансийск, ул. Рознина, 72. E-mail: epid\_fgu3@xmao.su

Поступила 10.02.15.

Р.В.Писанов<sup>1</sup>, М.И.Ежова<sup>1</sup>, Е.В.Монахова<sup>1</sup>, А.В.Черкасов<sup>2</sup>, Я.М.Краснов<sup>2</sup>, А.С.Водопьянов<sup>1</sup>,  
Т.А.Кульшань<sup>2</sup>, Л.Ф.Ливанова<sup>2</sup>, С.А.Портенко<sup>2</sup>, А.С.Абдрашитова<sup>2</sup>, В.Д.Кругликов<sup>1</sup>, С.В.Титова<sup>1</sup>

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ТОКСИГЕННОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* EL TOR ИНАБА, ВЫДЕЛЕННОГО В 2014 г. ИЗ ОТКРЫТОГО ВОДОЕМА В РОСТОВЕ-НА-ДОНУ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Проведено полногеномное секвенирование ДНК штамма *Vibrio cholerae* 81 биовара Эль Тор серовара Инаба, выделенного в 2014 г. из воды реки Темерник на территории Ростова-на-Дону в июле 2014 г. Установлено присутствие в его геноме гибридного профага CTX, содержащего ген *ctxB* классического типа (аллель *ctxB1*) и гена *rstR* типа Эль Тор, гена *tcpA* с мутациями в кодирующей и промоторной областях (аллель *tcpET<sup>CTRS</sup>*), а также наличие null-мутации в гене *rtxA* (аллель *rtxA4*) и протяженной делеции в пределах острова пандемичности VSP-II. Все эти особенности характерны для геновариантов холерных вибрионов, которые обладают повышенным эпидемическим потенциалом и в последние годы вытесняют типичных представителей данного биовара.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, геноварианты, профаг CTX, RTX-кластер, остров пандемичности.

R.V.Pisanov<sup>1</sup>, M.I.Ezhova<sup>1</sup>, E.V.Monakhova<sup>1</sup>, A.V.Cherkasov<sup>2</sup>, Ya.M.Krasnov<sup>2</sup>, A.S.Vodop'yanov<sup>1</sup>,  
T.A.Kul'shan'2, L.F.Livanova<sup>2</sup>, S.A.Portenko<sup>2</sup>, A.S.Abdrashitova<sup>2</sup>, V.D.Kruglikov<sup>1</sup>, S.V.Titova<sup>1</sup>

## Peculiarities of Genome Structure of Toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba Strain, Isolated from a Surface Water Body in the Territory of Rostov-on-Don in 2014

<sup>1</sup>Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Carried out has been whole-genome sequencing of the *Vibrio cholerae* 81 El Tor Inaba strain DNA, isolated from Temernik River waters in the territory of Rostov-on-Don in July, 2014. Identified is the presence of hybrid CTX prophage, which contains *ctxB* gene of the classical type (*ctxB1* allele), as well as *rstR* gene El Tor type, *tcpA* gene with the mutations in coding and promoter regions (*tcpET<sup>CTRS</sup>* allele), the null-mutation in *rtxA* gene, and extended deletion inside the pandemic island VSP-II. All the stated above peculiarities are characteristic of cholera vibrio genovariants, which have an enhanced epidemic potential and have recently replaced the typical strains of this biovar.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, genovariants, CTX prophage, RTX-cluster, pandemicity island.

Современный этап 7-й пандемии холеры характеризуется глобальным распространением генетически измененных штаммов возбудителя, обладающих не только повышенной вирулентностью, но и более эффективными механизмами персистенции в различных экологических нишах [8, 13, 17]. На фоне неблагоприятной обстановки по холере во многих странах Азии, Африки и Южной Америки в течение последнего десятилетия неоднократно регистрировались случаи завоза измененных токсигенных штаммов на территорию России, что выражалось в выделении их как от больных, так и из объектов окружающей среды. Некоторые из этих штаммов были ранее охарактеризованы по генотипическим признакам с использованием ПЦР-, VNTR-типирования и секвенирования отдельных участков генома [5, 7, 9, 10]. Внедрение в практику полногеномного секвенирования открывает перспективы более глубокого анализа штаммов, выделяемых в Российской Федерации, что позволяет выявлять их родство с возбудителями эпидемий за рубежом и оценивать степень эпидемической опасности для населения нашей страны.

Цель настоящей работы состояла в полногеном-

ном секвенировании ДНК штамма *V. cholerae* 81 и биоинформационном анализе полученных нуклеотидных последовательностей.

## Материалы и методы

В работе использован штамм *V. cholerae* 81 биовара Эль Тор, выделенный в ходе мониторинговых исследований из воды р. Темерник на территории Ростова-на-Дону в июле 2014 г. Все работы, связанные с культурами *V. cholerae*, проводили в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Для культивирования бактерий использовали бульон и агар Luria-Bertani (LB). Фенотипические характеристики (серологические свойства, чувствительность к холерным фагам, продукцию ацетилметилкарбинола (реакция Фогеса-Проскауэра), гемолитическую активность по Грейгу) определяли общепринятыми методами [4]. Для оценки антибиотикочувствительности холерного вибриона использовали диско-диффузионный метод [4] с использованием

микробиологического анализатора BIOMIC (Giles Scientific, США) и программного обеспечения Trinity.

Вирулентность штаммов определяли по методу N.K.Dutta, M.K.Habbu [12]. Для заражения кроликов-сосунков массой 130–160 г использовали 4-часовую агаровую культуру, выращенную при 37 °С. Животным внутрикишечно вводили взвесь вибрионов в концентрации  $1 \cdot 10^7$  и  $1 \cdot 10^5$  КОЕ в 0,2 мл 0,14 М NaCl, строго соблюдая условия, предъявляемые к проведению экспериментальных исследований на животных. Наблюдения за ними вели в течение 48 ч. Всех погибших через 48 ч животных вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса. VNTR-анализ по пяти локусам варибельных tandemных повторов проводили по методике, описанной ранее [2, 5].

Полногеномное секвенирование выполнялось двумя независимыми группами исследователей на разных платформах: MiSeq (Illumina) и ION PGM (Life Technologies). Пробоподготовка проводилась согласно протоколам производителей. Сборку контигов осуществляли с помощью программ Velvet (входит в состав программного обеспечения MiSeq) и Newbler gsAssembler ver 2.6. и SPAdes 3.1.

Биоинформационный анализ проводили с помощью программ BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), Vector NTI Suite 11 ([www.informax.com](http://www.informax.com)), Contiguator v.2 (<http://contiguator.sourceforge.net>), а также GeneExpert и SeqAnalyzer, разработанных в Ростовском противочумном институте с использованием ресурсов геномной базы данных NCBI. Кластерный анализ и построение дендрограмм проводили по методу UPGMA с использованием авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [3]. В качестве референс-геномов при выравнивании контигов и сравнительном анализе использовали полногеномные последовательности штаммов N16961 (AE003852), 2010EL-1786 (CP003069.1), CIRS101 (NZ\_ACVWACVW000000000.1), 301 (AJFN02000000.1) и целого ряда других штаммов, представленных в базах GenBank.

Номера доступа сиквенсов ДНК штамма *V. cholerae* 81, полученных в рамках настоящего исследования, в GenBank: JPOP00000000/SAMN02911891, JRQM00000000 (полногеномные сиквенсы), KM352500 (CTX), KM401563 (CTX+RTX), KM816583 (RS1), KM660639 (VSP-II).

## Результаты и обсуждение

Первый этап работы был направлен на изучение фенотипических диагностически значимых свойств штамма. При определении серогруппы и серовара путем постановки развернутой реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками O1, Инаба, Огава, РО и постановки слайд-агглютинации с холерной сывороткой O139 серогруппы установлено, что штамм *V. cholerae* 81 относился к O1 серо-

группе, серовару Инаба. Штамм лизировался в диагностическом рабочем титре холерным фагом эльтор, но был резистентен к классическому фагу. На основании этих данных штамм отнесли к биовару Эль Тор. При определении гемолитической активности по Грейгу штамм не лизировал эритроциты барана, а также образовывал ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам показало, что изучаемый штамм чувствителен к гентамицину, доксициклину, ампициллину, рифампицину, цефтриаксону, но устойчив к триметоприму/сульфометоксазолу, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, стрептомицину и умеренно устойчив к офлоксацину и левомицетину.

Проверяемый штамм был вирулентным для экспериментальных животных, поскольку все внутрикишечно инфицированные кролики-сосунки погибли через 24–48 ч. При их вскрытии наблюдалась типичная холерогенная реакция – перерастяжение толстого кишечника прозрачной бесцветной, слегка опалесцирующей жидкостью и растяжение тонкого кишечника полупрозрачным содержимым.

Далее нами проведено VNTR-типирование по пяти локусам варибельных tandemных повторов VcA, VcB, VcC, VcD и VcG [2], результаты которого показали, что штамм 81 совпадает со штаммами *V. cholerae* El Tor 301 (Таганрог, 2011 г.) и 18895 (Москва, 2005 г.) по локусам VcB, VcC, VcD и VcG, отличаясь всего на один повтор в гиперварибельном локусе VcA. Это позволяет сделать вывод о принадлежности этих штаммов к одному клону.

Данные полногеномного секвенирования, полученные двумя группами авторов на разных платформах, полностью совпали. При их анализе с помощью авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [3], в геноме исследуемого штамма выявлено большое количество точковых мутаций (в 1398 генах). На основании выявленных различий была построена дендрограмма, отражающая филогенетическое родство между различными штаммами холерных вибрионов (рис. 1). Как видно из рис. 1, штамм 81 оказался наиболее близкородственным штамму *V. cholerae* 301, но существенно отличался от штаммов, вызвавших эпидемические осложнения на о. Гаити в 2010 г.

Это родство подтверждено и при сравнительном анализе с помощью авторской программы GeneExpert и разработанных нами виртуальных праймеров, позволяющих выявлять гены, отличающиеся по длине за счет «делеций-вставок» (Insertion-Deletion; InDel-маркеров). У штамма 81 выявлен ряд таких генов (таблица), причем InDel-маркеры в генах VC0809 и VC2501 были для него уникальны, в то время как полиморфизмы в генах VC0534, VC0784, VC0984, VC2699, VCA0785 идентичны таковым штамма 301.

С помощью программ BLASTN 2.2.29 и Vector NTI Suite 11 (Contig Express, AlignX) нам удалось со-



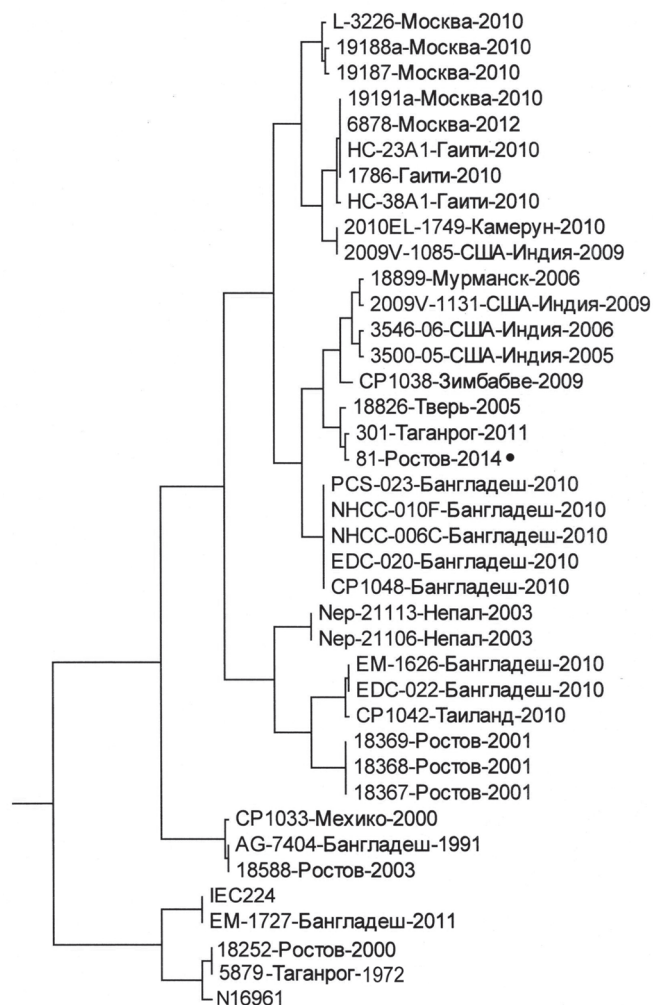


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе кластерного анализа распределения точковых мутаций в 1398 генах методом UPGMA

брать и охарактеризовать несколько участков генома, наиболее значимых для определения эпидемического потенциала исследуемого штамма. В частности, определена полная последовательность фрагмента большой хромосомы, включающая одну копию профага CTX, и расположенный на 493 п.н. ниже него RTX-кластер, кодирующий синтез мультифункционального самопроцессирующегося токсина MARTX.

Профаг CTX, интегрированный в специфический сайт *attRS1*, состоял из RS2-элемента (гены *rstR*, *rstA2*, *rstB2*) и коровой области (гены *sep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxA*, *ctxB*). Ген *rstR* относился к типу Эль Тор, а ген *ctxB* – к классическому типу В1 (поскольку имел 2 нуклеотидных замены Т/С в позициях 115 и 203). Промоторная область *ctxAB*-оперона содержала 4 гептануклеотидных повтора TTTTGAT, что характерно для большинства штаммов биовара Эль Тор. Таким образом, CTX представлял собой «гибридный» профаг.

Кластер RTX включал все известные для него гены, из которых только *rtxA*, кодирующий собственно токсин MARTX, отличался от такового референс-штамма N16961 наличием однонуклеотидной замены (SNP) G/A в позиции 13602, то есть был представлен аллелем *rtxA4* согласно классификации, предложенной J.Dolores, K.J.F.Sachell [11]. Эта SNP привела к образованию стоп-кодона, «преждевременно» завершающего синтез MARTX, С-конец которого укорочен на 12 аминокислотных остатков. Ранее упомянутыми авторами было экспериментально доказано, что такой «укороченный» токсин утрачивает цитотоксическую и актин-связывающую активность по отношению к эукариотическим клеткам. Ими также установлено, что данная null-мутация встречается только у геновариантов холерных вибрионов Эль Тор, несущих в составе «гибридного» профага CTX аллель *ctxB* классического типа, и высказано предположение о том, что приобретенная способность к продукции холерного токсина (СТ) классического типа делает излишним энергоемкое функционирование высокомолекулярного многофункционального MARTX, поэтому новые геноварианты «специально» выводят его из строя в пользу сохранения энергии для обеспечения быстрого размножения клеток и успешной диссеминации. Косвенным подтверждением этому предположению может служить тот факт, что неспособность к продукции MARTX известна и для возбудителей шести предшествующих пандемий – классических холерных вибрионов, продуцирующих СТ классического типа, хотя они содержат не точковую мутацию, а протяженную делецию (более 7,8 т.п.н.) в области RTX-

INDEL полиморфизмы, выявленные у штамма *V. cholerae* 81 при биоинформационном анализе с помощью программы GeneExpert

Ген	Белок	Разница длины, п.н.	Последовательности праймеров 5'-3'
VC0534	RNA polymerase sigma-38 factor	5	ATCTCAGCGAAATTGGTTTTCAC ACGACGAGCATAAAGCACTTCTC
VC0784	sodium/alanine symporter	6	TATATCCGCCGTACCTTCAAAGTC CGATGCCATCAGTACAAGTTTGAG
VC0809	hypothetical protein	55	CAACGCAGAAAGTGAAGGCTCT GTGCTTGCATACGGCTTGATG
VC0984	cholera toxin transcriptional activator	5	TGTTCCGATTAGGACACAACCTCAA GGGATCAAAGGTAAATTTTCAGCA
VC2501	leucyl aminopeptidase	2	TGTTAAACACCGATGCCGAAG TTCAAAGCGTTCAACGTAAGTCAG
VC2699	anaerobic C4-dicarboxylate transporter	5	CTGTGTCTGTGTGCTGGGTGT TCTTTGATGCCATCGACGTG
VCA0785	diguanylate cyclase	5	CCATTGTGGAAGGATAACCCAGAT ACACAAAGATCCAAAAAGCTCACC

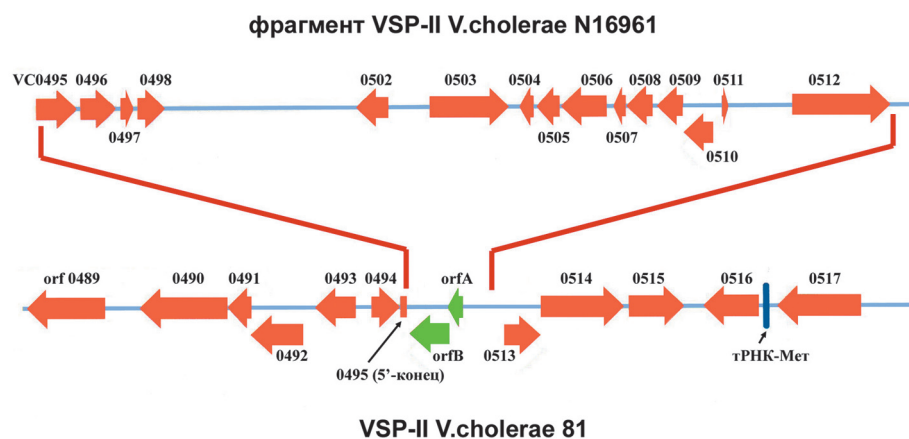


Рис. 2. Структура VSP-II *V. cholerae* 81 (вверху показаны гены референс-штамма, отсутствующие в VSP-II исследуемого штамма; все остальные полностью гомологичны)

кластера [14]. Интересно, что, если у части штаммов Эль Тор с аллелем *ctxB1* может присутствовать интактный ген *rtxA*, последний не обнаружен ни у одного из исследованных на сегодняшний день геновариантов с аллелем *ctxB7*, все они содержали *rtxA4* (то есть с null-мутацией в позиции 13602). Аллель *rtxA4* ранее выявлен у *ctxB1*<sup>+</sup> штаммов, выделенных с 2002 по 2010 год в Пакистане, Индии, Бангладеш (CIRS101), Зимбабве, а также в 1991 г. в Мексике и в 2011 г. в России (штамм 301) [11].

В геноме нами был также обнаружен профаг RS1 (*rstR* типа Эль Тор, *rstA1*, *rstB1* и *rstC*), однако достоверно выявить место его интеграции на основании данных сборки не удалось. Тем не менее, нам представляется наиболее вероятным расположение профага RS1 в тандеме с RS2-элементом, между RS2 и TLC элементами (аналогичное таковому у штамма 2010EL-1786), что подтверждается данными картирования единичных прочтений, полученных при секвенировании штамма 81, на геном референсного штамма 2010EL-1786.

Ген *tcpA* относился к типу Эль Тор и по нуклеотидной последовательности промоторной и кодирующей областей оказался полностью идентичным таковому *V. cholerae* CIRS101, выделенного в 2002 г. в Бангладеш [15], то есть в промоторной области содержал две мутации: замену С/Т в позиции 128 и вставку единичного нуклеотида А в позиции 130, а в кодирующей – однонуклеотидную замену А/Г в позиции 266. Следует отметить, что такой же аллель гена *tcpA*, обозначенный как *tcpET*<sup>CIRS</sup>, ранее обнаружен у вышеупомянутого штамма 301 [10] и ряда других штаммов, завезенных на территорию РФ в предшествующие годы [7].

Остров пандемичности VSP-II содержал обширную делецию генов, присутствующих в геноме референс-штамма N16961 (AE003852): VC0495 (делеция 60 % гена), VC0496-VC0512. На месте делезированной области находились гены субъединиц А и В транспозазы (рис. 2). Остальные гены данного острова полностью гомологичны VC0489-VC0494 и VC0515-VC0517 штамма N16961 и расположены в том же порядке. Наличие протяженной делеции в

VSP-II в настоящее время принято считать показателем высокого эпидемического потенциала холерных вибрионов [16]; она характерна для большинства геновариантов, выделенных в течение последнего десятилетия, в том числе у штамма 301 (Таганрог, 2011) и ряда клинических штаммов, завезенных на территорию Российской Федерации (Башкортостан, Мурманск, Тверь, Москва) с 2004 по 2010 год. Это показано нами ранее с помощью ПЦР [1, 6], а также при секвенировании методом Сэнгера полных последовательностей VSP-II штаммов P18899 (Мурманск, 2006) и J13326 (Москва, 2010), депонированных в NCBI Genbank под номерами KJ626219.1 и KJ626223.1 соответственно.

При анализе с помощью авторской программы SeqAnalyzer в геноме штамма 81 были также выявлены гены *wbe* (определяющий принадлежность к O1 серогруппе), *ompU* и *ompW* (кодирующие белки наружной мембраны), *hlyA* (гемолизина) типа Эль Тор, *hapA* (гемагглютинин/протеазы), сериновой протеазы и протеазы PrtV, *cef* (CHO cell elongating factor), *toxR*, *toxT*, *hapR* (регуляторные), *mshA* (маннозочувствительных пилей адгезии), остров патогенности VPI-II, остров пандемичности VSP-I, кластер генов системы секреции 6 типа (T6SS) и кластер генов множественной антибиотикорезистентности: *floR* (устойчивость к хлорамфениколу), *strA* (устойчивость к аминогликозидам), *strB* (компонент устойчивости к стрептомицину), *sul2*, *dfrA1* (устойчивость к триметоприму). Данный кластер генов (интегративно-конъюгативный элемент «индийского» типа SXT-ICE-Ind) является типичным для эпидемических штаммов, выделенных в Бангладеш, Индии (1992 г.) и на Гаити (2010 г.). Кластер генов системы секреции 3-го типа (T3SS), а также гены термостабильного и шигаподобного токсинов, *cholix*-токсина, термостабильных гемолизин TDH и TRH у данного штамма отсутствовали.

Таким образом, штамм 81 является геновариантом, сходным с *V. cholerae* 301 Инаба, выделенным из воды Таганрогского залива в 2011 г. [10].

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов Д.А., Заднова С.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Конструирование ПЦР-тест-системы для дифференциации генетически измененных токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемиологическим потенциалом. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:85–8.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.
3. Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. База данных «Холера. Штаммы – VNTR». Свидетельство о государственной регистрации № 2007620389.
4. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07. М.; 2007.
5. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М. Мультилокусное VNTR-типирование культур холерных вибрионов, выделенных в г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 года. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2003; 6:11–5.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. Алгоритм идентификации токсигенных генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2014; 2:36–46.
7. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 3:3–10.
8. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.
9. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47.
10. Шашкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *Vibrio cholerae* 301 биовара Эль Тор, изолированного в 2011 г. в России. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):61–4.
11. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624–12.
12. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955; 10(2):153–9.
13. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:E2010–17.
14. Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(2):1071–6.
15. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4):4211–3.
16. Nusrin S., Gil A.I., Bhuiyan N.A., Safa A., Asakura M., Lanata C.F., Hall E., Miranda H., Huapaya B., Vargas C.G., Luna M.A., Sack D.A., Yamasaki S., Nair G.B. Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(3):342–54.
17. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18:46–54.
18. potential]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:85–8.
19. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, identified by means of computer-based analysis of the *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologia*. 2001; 6:85–8.
20. Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S. [Data base "Cholera. Strains – VNTR"]. Certificate of State Registration No 2007620389.
21. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological regulations]. MR 4.2.2218-07. M.; 2007.
22. Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M. [Multi-locus VNTR-typing of cholera vibrios cultures, isolated in Kazan at the time of the cholera outbreak during summer, 2001]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2003; 6:11–5.
23. Sмирнова Н.И., Агафонов Д.А., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. [Algorithm for identification of toxigenic genetically altered *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 2:36–46.
24. Sмирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. [Genetic characteristics of clinical *Vibrio cholerae* strains, imported onto the territory of the Russian Federation in the modern period]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 3:3–10.
25. Sмирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.
26. Sмирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in cholera agent natural strains]. *Genetika*. 2013; 49(9):47–57.
27. Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zаднова С.П., Sмирнова Н.И. [Phenotypic and molecular-genetic analysis of genetically modified toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strain 301, isolated in 2011 in Russia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):61–4.
28. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624–12.
29. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955; 10(2):153–9.
30. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J., Taviani E., Hine E., Su Q., Tallon L.J., Prosper J.B., Furth K., Hoq M.M., Li H., Fraser-Liggett C.M., Cravioto A., Huq A., Ravel J., Cebula T.A., Colwell R.R. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109:E2010–17.
31. Lin W., Fullner K.J., Clayton R., Sexton J.A., Rogers M.B., Calia K.E., Calderwood S.B., Fraser C., Mekalanos J.J. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(2):1071–6.
32. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(4):4211–3.
33. Nusrin S., Gil A.I., Bhuiyan N.A., Safa A., Asakura M., Lanata C.F., Hall E., Miranda H., Huapaya B., Vargas C.G., Luna M.A., Sack D.A., Yamasaki S., Nair G.B. Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(3):342–54.
34. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18:46–54.

## References

1. Agafonov D.A., Zadnova S.P., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. [Construction of PCR test-system for differentiation between genetically altered toxigenic *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor, with varied epidemic

## Authors:

Pisanov R.V., Ezhova M.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Cherkasov A.V., Krasnov Ya.M., Kul'shan' T.A., Livanova L.F., Portenko S.A., Abdrashitova A.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Писанов Р.В., Ежова М.И., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Кругликов В.Д., Титова С.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Черкасов А.В., Краснов Я.М., Кульшань Т.А., Ливанова Л.Ф., Портенко С.А., Абдрашитова А.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.10.14.



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

**НОВЫЙ КОРОНАВИРУС, ВЫЗЫВАЮЩИЙ ЗАБОЛЕВАНИЕ ЧЕЛОВЕКА***ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны,  
Сергиев Посад, Российская Федерация*

Коронавирусы – это оболочечные вирусы с одноцепочечной «плюс» РНК, с размерами генома от 25 до 32 тыс. нуклеотидов, вызывающие респираторные и кишечные заболевания животных и человека. В обзоре рассмотрены случаи заболевания человека, вызванные новым коронавирусом (NCoV), возможные естественные резервуары возбудителя, механизмы передачи инфекции, некоторые характеристики этиологического агента заболевания, методы диагностики и идентификации возбудителя, полная последовательность генома и связь NCoV с известными коронавирусами.

**Ключевые слова:** коронавирус, резервуар возбудителя, механизм передачи инфекции, филогенетический анализ.

L.F.Stovba, V.N.Lebedev, A.A.Petrov, V.M.Ruchko, V.S.Kulich, S.V.Borisevich

**Emerging Coronavirus Which Gives Rise to the Disease in Humans***The 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the RF Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation*

Coronaviruses are enveloped viruses with a single-strand “+” RNA, its genome size varying from 25 to 32 thousands of nucleotides. They cause respiratory and intestinal diseases in animals and humans. The review contains the data on human infection cases induced by a new coronavirus (NCoV), as well as the information about probable natural agent reservoirs, mechanisms of transmission, some characteristic features of the etiological agent, methods of diagnostics and identification, complete genome sequence, and NCoV relation to the established coronaviruses.

**Key words:** coronavirus, agent reservoir, mechanism of transmission, phylogenetic analysis.

Ближневосточный респираторный синдром человека (Middle East Respiratory Syndrome – MERS) – новое особо опасное инфекционное заболевание, вызываемое представителем рода бетакоронавирусов.

В июне 2012 г. в клинику города Джидда был госпитализирован с острой пневмонией и почечной недостаточностью подданный Саудовской Аравии. В результате молекулярно-биологического изучения биопроб выделили новый коронавирус [44]. В сентябре 2012 г. от второго больного (подданного Саудовской Аравии), который путешествовал по территории Катар и был госпитализирован в клинику Лондона, идентифицирован этот же возбудитель [5]. Секвенирование ампликона в Медицинском центре Эразма (ЕМС) в городе Роттердам (Нидерланды) из проб первого больного позволило открыть новый патогенный для человека возбудитель, названный вирусом Ближневосточного респираторного синдрома – MERS-CoV (ранее встречающееся в литературе название – HCoV-EMC) [12]. Важно отметить, что после идентификации нового коронавируса специалистами NAMRU-3 ретроспективно изучены биопробы от людей в Иордании, погибших в марте–апреле 2012 г., и установлен факт их гибели именно от этого возбудителя [19].

С тех пор было зарегистрировано 182 случая Ближневосточного респираторного синдрома (таблица), 79 из которых закончились смертельным исходом (летальность 43,4 %).

Заболевание зарегистрировано в 6 странах

Аравийского полуострова, в основном в Саудовской Аравии. Также выявлено 12 завозных случаев в Европе (Великобритания, Германия, Франция, Италия, Испания) и Северной Африке (Тунис).

Свыше 80 % от всех заболеваний зарегистрированы в Саудовской Аравии (в 6 из 13 провинций)

**Регистрация случаев Ближневосточного респираторного синдрома (MERS) у людей в мире (по состоянию на 7 февраля 2014 г.)**

Государство	Количество, чел.		Летальность, %
	заболевших	погибших	
Заболеваемость на эндемичной территории			
Саудовская Аравия	146	62	42,1
Катар	9	3	33,3
ОАЭ	7	3	42,9
Оман	3	3	100,0
Иордания	3	3	100,0
Кувейт	2	0	0
<i>Всего:</i>	170	74	43,5
Завозные случаи инфекции			
Великобритания	3	2	66,7
Германия	2	1	50,0
Франция	2	1	50,0
Тунис	3	1	33,3
Италия	1	0	0
Испания	1	0	0
<i>Всего:</i>	12	5	41,7
<i>Итого:</i>	182	79	43,4



[2]. Тем не менее, данные серологических исследований, проведенных А.М. Zaki *et al.* [44], говорят об отсутствии циркуляции вируса среди населения этой страны. Группой повышенного риска являются люди с выраженным иммунным дефицитом или хроническими почечными или легочными заболеваниями. Так, во время самой большой вспышки MERS в г. Аль-Ахза в Саудовской Аравии заболело 23 человека [9]. У 74 % из них был диабет, у 52 – почечная недостаточность, у 43 – легочная недостаточность.

Инкубационный период заболевания, вызванного этим коронавирусом, составляет около 5 сут [3, 6].

В ходе проведенных эпидемиологических исследований выявлено не менее 8 кластеров заболевания, что позволяет считать доказанной возможность передачи инфекции от человека к человеку [11]. Передача вируса членам семей заболевших и медицинским работникам зафиксирована в 1–2 % случаев, что ниже, чем для других респираторных коронавирусов, выделенных от человека, в том числе и вируса тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС). Согласно последним данным, при вторичных контактах, т.е. у людей, заразившихся от первичного случая, заболевание протекает легче [3].

Наиболее вероятный путь передачи инфекции от человека к человеку – респираторный [20], что потенциально определяет возможность возникновения эпидемической вспышки с высокой летальностью. Случаи MERS в Англии, Франции, Германии, Италии и Тунисе отмечены у людей, посещавших Ближний Восток. Глобальный характер миграции людей в наше время может стать причиной появления MERS и на других континентах.

Этиологическим агентом Ближневосточного респираторного синдрома является коронавирус, выделенный от человека. Согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов MERS-CoV является представителем группы С рода *Betacoronavirus*, подсемейства *Coronavirinae*, семейства *Coronaviridae*, порядка *Nidovirales* [20, 21, 22].

Возбудитель генетически близок к различным коронавирусом, выделяемым от летучих мышей, обитающих в Африке и Европе. По мнению многих ученых, его резервуаром могут быть летучие мыши, относящиеся к родам *Rousettus*, *Tylonycteris* и *Pipistrellus* [22, 24]. Имеется гипотеза о том, что предок MERS-CoV может существовать в насекомоядных летучих мышах Старого Света, принадлежащих к семейству *Vespertilionidae*, к которому принадлежат роды *Neoromicia* и *Pipistrellus*, и имеет африканское происхождение. Предполагаемый перенос предшественника MERS-CoV из Африки на Аравийский полуостров происходил параллельно переносу других возбудителей (например, вируса лихорадки долины Рифт из Восточной Африки, что привело к вспышке заболевания в Саудовской Аравии в 2000 г.) [18].

Поскольку есть данные о выделении MERS-CoV от верблюдов дромадеров, то не исключен механизм формирования эпидемического очага, при

котором резервуар возбудителя находится в насекомоядных летучих мышах, а промежуточным хозяином является такое синантропное животное как верблюд, который и представляет собой источник инфицирования человека. Это подтверждается тем фактом, что многие зарегистрированные первичные случаи MERS связаны с контактами заболевших с верблюдами [29, 35].

Определение потенциальной циркуляции MERS-CoV у верблюдов дромадеров показывает, что оба типа трансмиссии – зоонозный и от человека к человеку – вовлечены в передачу вируса [23, 24].

Генетическая изменчивость MERS-CoV обеспечивается высокой частотой рекомбинации РНК коронавирусов и способностью их больших геномов получать и терять домены [13, 24, 38]. Эти факторы способствуют появлению вирусов с новыми свойствами, которые способны адаптироваться к новым хозяевам и экологическим нишам, что служит иногда причиной эпидемий и эпизоотий.

Геном MERS-CoV представлен одноцепочечной «плюс» РНК, состоящей из 30119 нуклеотидов [11]. Гомология между изолятами, выделенными при первом зарегистрированном случае Ближневосточного респираторного синдрома человека в Саудовской Аравии и Англии, составляет 99,67 % (30021 нуклеотид из 30119) [28]. Геном включает 5 открытых рамок считывания, 4 из которых (расположенные, начиная с 5'-конца молекулы РНК, содержащие гены РНК-зависимой РНК-полимеразы и неструктурных вирусоспецифических белков) обладают высокой степенью гомологии. Основные различия в структуре генома между коронавирусами, представляющими одну и ту же монотипичную линию, наблюдаются в пределах открытой рамки считывания, расположенной около 3'-конца молекулы РНК. Гены неструктурных белков репликативного комплекса занимают две трети генома и транслируются в большой полипротеин, состоящий из 16 белков. Эти гены консервативны для всех коронавирусов. Так, при сравнении рассчитанной первичной структуры 16 неструктурных белков изолятов из Саудовской Аравии и Англии у 11 отсутствуют различия по предполагаемой первичной структуре белка, а у 5 (белки NSP2, NSP3, NSP4, NSP13 и NSP15) уровень различий не превышает 0,3 %.

Гены структурных белков, подобно другим коронавирусом, расположены на 3'-конце генома и включают ген нуклеокапсидного белка (N) с молекулярной массой (ММ) ~50 кДа, ген гликопротеина (S) с ММ ~90 кДа и гены двух мембранных белков (мембранного гликопротеина (М) с ММ ~23 кДа) и малого оболочечного белка (Е) с ММ ~23 кДа. Кроме четырех основных генов структурных белков, существуют еще пять генов дополнительных белков, уникальных для MERS-CoV. Они имеют высокий уровень гомологии с аналогичными белками коронавирусов летучих мышей BtCoV-HKU4 и BtCoV-HKU5 [11].

Коронавирусы экспрессируют экзорибонуклеа-

зу, являющуюся неструктурным белком (nSP-14). Этот фермент необходим для обеспечения точности репликации и является высококонсервативным в пределах рода. Все биохимические и генетические данные подтверждают необходимость nSP-14 для считывания РНК. Последовательность РНК, кодирующая nSP-14, является ответственной за чувствительность к мутагенам. В частности, MERS-CoV резистентен к рибавирину и 5-фторурацилу [37].

Поскольку за адсорбцию и проникновение коронавируса в клетку отвечает гликопротеин S, который обуславливает круг хозяев и индукцию синтеза вируснейтрализующих антител, изучение данного белка MERS-CoV является приоритетным направлением. В связи с тем, что этот структурный белок играет такую важную роль в вирусной инфекции, он будет идеальной мишенью как при исследованиях по идентификации нейтрализующих антител с целью разработки вакцины, так и при исследованиях вирусных ингибиторов [29, 36].

Идентификация хозяйского клеточного рецептора, используемого MERS-CoV, обеспечит понимание патогенеза заболевания и позволит предложить эффективные способы лечения. Установлено, что рецептором для вхождения MERS-CoV в клетки служит дипептидил пептидаза-4 (DPP4) [32], в отличие от вируса ТОРС, который использует как рецептор ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [7]. DPP4 как рецептор для MERS-CoV был идентифицирован уже через 6 мес. после первого сообщения о выделении вируса [42]. DPP4 служит рецептором MERS-CoV как в клетках человека, так и в клетках летучих мышей, что является косвенным свидетельством возможности прямой передачи вируса в данной экологической цепочке [36]. Подобные молекулы используются и другими коронавирусами для внедрения в клетки.

Снижение содержания DPP4, которое отмечается в ходе инфицирования MERS-CoV, может влиять на состав иммунных клеток и утяжелять течение заболевания. DPP4 также расположен на иммунных клетках, включая Т-лимфоциты, и необходим для нормального их функционирования [43]. В то же время нет достаточных доказательств, что данные клетки играют значимую роль в патогенезе MERS.

Как и другие коронавирусы, MERS-CoV может мутировать в направлении адаптации к клеткам человека. Во время эпидемии ТОРС в 2002–2003 гг. установлено, что мутации, направленные на адаптацию возбудителя в человеческой популяции, группируются в области гена поверхностного гликопротеина, включая области, отвечающие за связывание с рецептором человека ACE2 [15]. Вполне вероятно, что геном MERS-CoV может подвергнуться мутациям, которые усилят его способность передаваться от человека к человеку и реплицироваться в инфицированных индивидах. Установлено, что мутация в гене S гликопротеина, приводящая к замене всего лишь одной аминокислоты в положении 1015 (аспарагин→треонин), обеспечива-

ет существенное расширение спектра чувствительных культур клеток.

При инфицировании человека MERS-CoV реплицируется в гладких эпителиальных клетках дыхательных путей (НАЕ), альвеолярных пневмоцитах II типа, микрососудистых эндотелиальных клетках, легочных фибробластах, причем наиболее эффективная репликация происходит в клетках НАЕ и культуре легочных фибробластов, затем следуют пневмоциты II типа и наименее эффективно вирус реплицируется в микрососудистых эндотелиальных клетках. При идентичных условиях вирус ТОРС эффективно реплицировался только в культурах клеток НАЕ. При инфицировании наблюдается быстро повышающийся синтез вирусной РНК и высвобождение вирусного потомства в высокой концентрации, что обуславливает цитопатическое действие (ЦПД). Уровень накопления возбудителя в клетках НАЕ достигает величин от  $1,0 \cdot 10^6$  до  $1,0 \cdot 10^7$  БОЕ/мл спустя 30 ч после инфицирования [8].

Для накопления возбудителя с целью последующей его идентификации используются постоянные культуры клеток почки африканской зеленой марышки линии Vero и мышинных фибробластов (LLC-MK2). Электронная микроскопия инфицированных Vero клеток показала экстенсивные мембранные перестановки, в том числе и образование двухмембранных везикул. Индуцированное MERS-CoV цитопатическое действие (при множественности инфицирования от 0,1 до 10 ЦПД<sub>50</sub> на клетку) развивается на 7–14-е сутки. Уровень накопления возбудителя в данных культурах клеток превышает  $1,0 \cdot 10^7$  ЦПД<sub>50</sub>/мл [41].

Van Boheemen N. *et al.* [41] провели изучение репликативного цикла MERS-CoV в клетках Vero и гепатомы печени человека (Huh7). После репликации геномной РНК происходит трансляция репликазного полипротеина, впоследствии расщепляющегося на 16 неструктурных белков [17]. Они направляют дальнейшую репликацию генома и синтез субгеномных мРНК, с которых происходит трансляция структурных белков. В обеих клеточных линиях РНК определялась через 7 ч, и ее концентрация достигала максимума через 13 ч после инфицирования. Далее концентрация РНК в клетках Vero оставалась на более или менее постоянном уровне до 24 ч, а в клетках Huh7 наблюдалось снижение, что обуславливало более быстрое развитие цитопатологии в этой клеточной линии между 12 и 24 ч после инфицирования. Титры вируса в клетках Vero достигали значений от  $5 \cdot 10^5$  до  $5 \cdot 10^7$  БОЕ/мл. Из клеток Huh7 вирусное потомство высвобождалось значительно раньше, хотя окончательные титры через 24 ч были сравнимы с наблюдаемыми в клетках Vero.

Инфицирование многими коронавирусами может индуцировать образование синцития, обусловленного физиологической активностью вирусного шипикового белка при нейтральном pH [4]. В клетках Vero и карциномы легких человека (Calu3/2B4),

инфицированных различными коронавирусами, отчетливо выраженное ЦПД развивается на 2-й день после инфицирования, на 3-и сутки происходит полное разрушение монослоя клеток. В противоположность этому у клеток Vero E6, инфицированных MERS-CoV, только на 3-и сутки развивается умеренное ЦПД, а неполную гибель клеток наблюдают через 6 сут. Развитие ЦПД в инфицированных MERS-CoV Huh7 клетках происходит быстрее, чем в 3 других сравниваемых клеточных линиях (Calu3/2B4, Vero и Vero E6), образуется синцитий, а разрушение происходит через 17 ч. При небольшой множественности инфицирования образование синцития в клетках Huh7 является важным фактором в развитии ЦПД. Наличие экспрессии DPP4 в клетках Vero и Huh7 и уровни этой экспрессии коррелируют с чувствительностью клеток к MERS-CoV [34].

Для подращивания возбудителя с целью его последующей идентификации с помощью ОТ-ПЦР достаточно проводить культивирование в указанных культурах клеток в течение 24 ч [8]. Полученный вирусодержащий материал может быть использован как для непосредственного выявления возбудителя в исследуемой пробе (в том случае, когда концентрация последнего ниже порогового уровня чувствительности метода), так и для выявления специфических антител в традиционных серологических тестах.

По аналогии с другими коронавирусами человека, в частности вирусами ТОРС и НСoV-НКU1, перспективной для изучения нового возбудителя является культура клеток реснитчатого эпителия дыхательных путей человека [33]. Кроме того, установлена репликация MERS-CoV в клетках бронхиального эпителия, гладкого бронхиального эпителия, альвеолярного эпителия и, возможно, эндотелиальных клетках [40].

Роль клеточных культур в исследованиях, проводимых с MERS-CoV, важна потому, что до настоящего времени не выявлены мелкие лабораторные животные, которые могли бы быть успешно использованы в качестве тест-объектов при работе с возбудителем.

Изучение экспериментального MERS-CoV на различных видах наиболее широко применяемых в практике лабораторных животных дало следующие результаты. Безуспешными оказались попытки выявить репликацию этого вируса в стандартных лабораторных видах мышей *Mus mus musculus*, *M. m. domesticus* или *M. m. castaneus*, а также в иммунодефицитных мышах [7]. Резистентность мышей к возбудителю связана с отличиями человеческого и мышинного DPP4-рецептора, который разрушается при связывании [15]. Инфицирование MERS-CoV трансгенных мышей с интродуцированным человеческим рецептором DPP4 привело к развитию общей нейроинфекции [1, 27]. Это дает возможность использования трансгенных мышей для изучения вакцин и противовирусных средств.

У сирийских хомячков, инфицированных ин-

тратрахеально и аэрогенно, клинических признаков заболевания, репликации вируса, гистологических изменений, выброса цитокинов и сероконверсии не зарегистрировано. Нет данных об успешном воспроизведении инфекции при заражении африканских хорьков. Для инициации и усиления инфекции животных данных видов, видимо, необходимо, по аналогии с мышами, использовать трансгенных животных, у которых рецептор для вируса (человеческий DPP4) экспрессируется вместо соответствующего мышинного белка [30].

В настоящее время имеются данные об экспериментальном инфицировании макак резусов [30]. У них развивалась несмертельная пневмония средней тяжести, однако отсутствовали тяжелый респираторный синдром и почечные проявления, что делает необходимыми дополнительные исследования по поиску экспериментальных моделей. В силу этого охарактеризованные системы репликации MERS-CoV в культуре клеток будут основой изучения свойств вируса и его взаимодействия с хозяином, включая иммунный ответ.

Кроме поиска адекватных лабораторных моделей проведено сравнительное изучение устойчивости MERS-CoV в окружающей среде [43]. Она сопоставима с таковой для возбудителя ТОРС.

В настоящее время не существует специфических средств для лечения MERS-CoV инфекции, пригодных для клинического применения. Для этого возбудителя была продемонстрирована *in vitro* антивирусная активность циклоспорина А и рибавирина [14, 16]. Для ряда препаратов установлена противовирусная активность в опытах *in vitro*, при отсутствии таковой – в опытах *in vivo*. Противовирусная эффективность в опытах *in vivo* не показана даже для плазмы реконвалесcentов. Есть сообщения об отрицательном и даже вредном действии рибавирина и кортикостероидов [39].

Особенностью инфекционного процесса, вызванного MERS-CoV, является то, что вирус не индуцирует образование интерферона и других цитокинов в эпителиальных клетках дыхательных путей человека и культурах клеток [25, 45]. Утрата способности к индукции синтеза интерферона может затормозить специфическое вирусопосредованное ингибирование цитоплазматических ригидоподобных факторов путем элиминации вирусных макромолекулярных белков внутри мембранных структур. Это свойство позволяет MERS-CoV реплицироваться в клетках хозяина до инициации иммунного ответа, что приводит к высоким концентрациям вируса в органах. С другой стороны, высокая чувствительность MERS-CoV к интерферону указывает на то, что введение интерферона I и III типов может эффективно снижать уровень репликации возбудителя в эпителии человеческих дыхательных путей, что определяет перспективы использования интерферона для профилактики и лечения заболевания MERS [10].

Проведено сравнительное изучение чувствитель-



ности MERS-CoV и возбудителя ТОРС к пегилированному интерферону (ПЭГ-IFN) в опытах *in vitro* [10]. Установлено, что MERS-CoV является чувствительным к действию ПЭГ-IFN. Если для вируса ТОРС на 2-е сутки индуцированное ЦПД снижалось при дозе ПЭГ-IFN 30 нг/мл, то для MERS-CoV соответствующий показатель составлял 1 нг/мл. Предварительная обработка клеток ПЭГ-IFN в концентрации 1000 нг/мл полностью предотвращала ЦПД в клетках, инфицированных вирусом ТОРС. Для MERS-CoV полное ингибирование ЦПД наблюдалось при более низких концентрациях – 3, 10 или 30 нг/мл при добавлении лекарства к клеткам до, на протяжении или после инфицирования, соответственно. Чувствительность MERS-CoV к экзогенному IFN предполагает применение его в будущем как терапевтического средства при появлении новых случаев заболевания.

Ранее показано, что репликация различных коронавирусов, включая возбудитель ТОРС, может ингибироваться иммуносупрессивным препаратом CsA [14, 31]. Антивирусный препарат CsA в микромолярных концентрациях ингибирует репликацию MERS-CoV в клетках Vero и Huh7, блокируя функциональное взаимодействие между вирусными белками и одним или несколькими циклофилинами [26]. Однако при этом какая-то небольшая часть MERS-CoV-инфицированных клеток устойчива к обработке, что поддерживает низкий уровень репликации вируса даже при высоких концентрациях CsA, что, в свою очередь, может привести к развитию устойчивости к CsA в культуре клеток.

Таким образом, появление новой инфекции, вызванной MERS-CoV, обуславливает необходимость дальнейшего углубленного изучения характеристик возбудителя с целью выбора перспективных направлений разработки средств выявления и идентификации нового патогена, профилактики и лечения, что позволит предпринять эффективные противоэпидемические мероприятия.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almazan F., De Diego M.L., Sola I., Zuniga S., Nieto-Torres J.L., Marquez-Jurado S., Andres G., Enjuanes L. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio*. 2013; 4(5):e00650-13. doi: 10.1128/mBio.00650-13.
- Assiri A., Al-Tawfiq J.A., Al-Rabeeh A.A., Al-Rabiah F.A., Al-Hajjar S., Al-Barrak A. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(9):752–61.
- Assiri A., McGeer A., Perl T.M., Price C.S., Al Rabeeah A.A., Cummings D.A., Alabdullatif Z.N., Assad M., Almulhim A., Makhdoom H., Madani H., Alhakeem R., Al-Tawfiq J.A., Cotten M., Watson S.J., Kellam P., Zumla A.I., Memish Z.A. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(5):407–16.
- Belouzard S., Millet J.K., Licitra B.N., Whittaker G.R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012; 4:1011–33.
- Bermingham A., Chand M.A., Brown C.S., Aarons E., Tong C., Langrish C., Hoschler K., Brown K., Galiano M., Myers R., Pebody R.G., Green H.K., Boddington N.L., Gopal R., Price N.,

Newsholme W., Drosten C., Fouchier R.A., Zambon M. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17(40):pii 20290.

- Cauchemez S., Fraser C., Van Kerkhove M.D., Donnelly C.A., Riley S., Rambaut A., Enouf V., van der Werf S., Ferguson N.M. Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(1):50–6.
- Cauchemez S., Van Kerkhove M.D., Riley S., Donnelly C.A., Fraser C., Ferguson N.M. Transmission scenarios for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill.* 2013; 18(24):pii 20503.
- Chan K.H., Chan J.F., Tse H., Chen H., Lau C.C., Cai J.P., Tsang A.K., Xiao X., To K.K., Lau S.K., Woo P.C., Zheng B.J., Wang M., Yuen K.Y. Cross-reactive antibodies in convalescent SARS patients' sera against the emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *J. Infect.* 2013; 67:130–40.
- Chan J.F., Li K.S., To K.K., Cheng V.C., Chen H., Yuen K.Y. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic? *J. Infect.* 2012; 65:477–89.
- Chan P.K., Chan M.C. Tracing the SARS-coronavirus. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(Suppl 2):S118–21. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.
- Corman V., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bladau M., Van Boheemen S., Gopal R., Ballhause M., Besterboer T.M., Muth D., Muller 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.
- De Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbelenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the coronavirus study group. *J. Virol.* 2013; 87:7790–2.
- De Groot R.J., Family Coronaviridae. In King AMQ, Adams M.J., Cartens E.B., Lefkowitz E.J., editors. *Virus taxonomy, the 9th report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego, CA: Academic Press; 2012. P. 806–28.
- De Wilde A.H., Raj V.S., Oudshoorn D., Bestebroer T.M., van Nieuwkoop S., Limpens R.W., Posthuma C.C., van der Meer Y., Bärceña M., Haagmans B.L., Snijder E.J., van den Hoogen B.G. MERS-coronavirus replication induces severe *in vitro* cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- $\alpha$  treatment. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:1749–60.
- Deaths and severe adverse events associated with anesthesia-assisted rapid opioid detoxification – New York City, 2012. *MMWR*. 2013; 62(38):777–80.
- Falzarano D., de Wit E., Martellaro C., Callison J., Munster V.J., Feldmann H. Inhibition of novel  $\beta$  coronavirus replication by a combination of interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin. *Sci. Rep.* 2013; 3:1686.
- Gorbelenya A.E., Enjuanes L., Ziebuhr J., Snijder E.J. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* 2006; 117:17–37.
- Hashemi-Shahraki A., Heidarieh P., Azarpira S., Shojaei H., Hashemzadeh M., Tortoli E. Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bat, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(10):1697–9.
- Hijawi B., Abdallat M., Sayaydeh A., Alqasrawi S., Haddadin A., Jaarour N., Alsheikh S., Alsanouri T. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East. Mediterr. Health. J.* 2013; 19(1):12–20.
- Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virol. J.* 2013; 10:66.
- Lauber C., Gorbelenya A.E. Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. *J. Virol.* 2012; 86(7):3890–904.
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S., Wang L.F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310(5748):676–9.
- Martina B.E.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Peiris J.S., Lim W., Osterhaus A.D. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature*. 2003; 425(6961):915.
- Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.
- Megan M.A., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio*. 2013; 4(4):e00524-13. doi: 10.1128/mBio.00524-13.
- Nagy P.D., Wang R.Y., Pogany J., Hafren A., Makinen K. Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology*. 2011; 411(2):374–82.



27. Nationwide Rubella Epidemic – Japan, 2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2013; 62(23):457–61.
28. Novel Coronavirus – Eastern Mediterranean (04): UK, person to person transmission suspected [Internet] 13 Feb 2013 (cited 13 Feb 2013). Archive Number: 20130213.1541531. Available from: <http://www.promedmail.org/direct.php?id=20130213.1541531>.
29. Perera R., Wang P., Gomaa M., El-Shesheny R., Kandeil A., Bagato O., Siu L., Shehata M., Kayed A., Moatasim Y., Li M., Poon L., Guan Y., Webby R., Ali M., Peiris J., Kayali G. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(36):pii 20574.
30. Perlman S. The Middle East respiratory syndrome – how worried should we be? *mBio.* 2013; 4(4):e00531-13. doi: 10.1128/mBio.00531-13.
31. Pfefferle S., Schopf J., Kogl M., Friedel C.C., Muller M.A., Carbajo-Lozoya J., Stellberger T., von Dall'Armi E., Herzog P., Kallies S., Niemeyer D., Ditt V., Kuri T., Züst R., Pumpor K., Hilgenfeld R., Schwarz F., Zimmer R., Steffen I., Weber F., Thiel V., Herrler G., Thiel H.J., Schwegmann-Wessels C., Pöhlmann S., Haas J., Drosten C., von Brunn A. The SARS-coronavirus-host interaction: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10):e1002331. doi: 10.1371/journal.ppat.1002331.
32. Puzelli S., Azzi A., Santini M.G., Di Martino A., Facchini M., Castrucci M.R., Meola M., Arvia R., Corcioli F., Pierucci F., Baretta S., Bartoloni A., Bartolozzi D., de Martino M., Galli L., Pompa M.G., Rezza G., Balocchi E., Donatelli I. Investigation of an imported case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection in Florence, Italy, May to June 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(34):pii 20564.
33. Pyrc K., Sims A.C., Dijkman R., Jebbink M., Long C., Deming D., Donaldson E., Vabret A.E., Baric R., van der Hoek L., Pickles R. Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J. Virol.* 2010; 84:11255–63.
34. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Muller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J., Osterhaus A.D., Bosch B.J., Haagmans B.L. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013; 495(7440):251–4.
35. Reusken C.B., Haagmans B.L., Muller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., Muth D., Raj V.S., Vries L.S., Corman V.M., Drexler J.F., Smits S.L., Tahir Y.E., De Sousa R., van Beek J., Nowotny N., van Maanen K., Hidalgo-Hermoso E., Bosch B.J., Rottier P., Osterhaus A., Gortazar-Schmidt C., Drosten C., Koopmans M.P. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10):859–66.
36. Scobey T., Yount B.L., Sims A.C., Donaldson E.F., Agnihotram S.S., Menachery V.D., Graham R.L., Swanstrom J., Bove P.F., Kim J.D., Grego S., Randell S.H., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(40):16157–62.
37. Smith E.C., Blanc H., Vignuzzi M., Denison M.R. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* 2013; 9(8):e1003565.
38. Snijder E.J. 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.
39. Stockman L.J., Bellamy R., Garner P. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med.* 2006; 3(9):e343.
40. To K.K., Hung I.F., Chan J.F., Yuen K.Y. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(Suppl 2):103–8.
41. Van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2012; 3(6):pii e00473-12.
42. Van Doremalen N., Bushmaker T., Munster V.J. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill.* 2013; 18(38):pii 20590.
43. Wang N., Shi X., Jiang L., Zhang S., Wang D., Tong P., Guo D., Fu L., Cui Y., Liu X., Arledge K.C., Chen Y.H., Zhang L., Wang X. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Research.* 2013; 23:986–93.
44. 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.
45. Zhu X., Liu O., Du L., Lu L., Jiang S. Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(2):S142–8.

## References

1. Almazan F., De Diego M.L., Sola I., Zuniga S., Nieto-Torres J.L., Marquez-Jurado S., Andres G., Enjuanes L. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio.* 2013; 4(5):e00650-13. doi: 10.1128/mBio.00650-13.
2. Assiri A., Al-Tawfiq J.A., Al-Rabeeah A.A., Al-Rabiah F.A., Al-Hajjar S., Al-Barrak A. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(9):752–61.
3. Assiri A., McGeer A., Perl T.M., Price C.S., Al Rabeeah A.A., Cummings D.A., Alabdullatif Z.N., Assad M., Almulhim A., Makhdoom H., Madani H., Alhakeem R., Al-Tawfiq J.A., Cotten M., Watson S.J., Kellam P., Zumla A.I., Memish Z.A. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(5):407–16.
4. Belouzard S., Millet J.K., Licitra B.N., Whittaker G.R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses.* 2012; 4:1011–33.
5. Bermingham A., Chand M.A., Brown C.S., Aarons E., Tong C., Langrish C., Hoschler K., Brown K., Galiano M., Myers R., Pebody R.G., Green H.K., Boddington N.L., Gopal R., Price N., Newsholme W., Drosten C., Fouchier R.A., Zambon M. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill.* 2012; 17(40):pii 20290.
6. Cauchemez S., Fraser C., Van Kerkhove M.D., Donnelly C.A., Riley S., Rambaut A., Enouf V., van der Werf S., Ferguson N.M. Middle East respiratory syndrome coronavirus: quantification of the extent of the epidemic, surveillance biases, and transmissibility. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(1):50–6.
7. Cauchemez S., Van Kerkhove M.D., Riley S., Donnelly C.A., Fraser C., Ferguson N.M. Transmission scenarios for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and how to tell them apart. *Euro Surveill.* 2013; 18(24):pii 20503.
8. Chan K.H., Chan J.F., Tse H., Chen H., Lau C.C., Cai J.P., Tsang A.K., Xiao X., To K.K., Lau S.K., Woo P.C., Zheng B.J., Wang M., Yuen K.Y. Cross-reactive antibodies in convalescent SARS patients' sera against the emerging novel human coronavirus EMC (2012) by both immunofluorescent and neutralizing antibody tests. *J. Infect Dis.* 2013; 67:130–40.
9. Chan J.F., Li K.S., To K.K., Cheng V.C., Chen H., Yuen K.Y. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic? *J. Infect.* 2012; 65:477–89.
10. Chan P.K., Chan M.C. Tracing the SARS-coronavirus. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(Suppl 2):S118–21. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.19.
11. Corman V., Eckerle I., Bleicker T., Zaki A., Landt O., Eschbach-Bladau M., Van Boheemen S., Gopal R., Ballhaus M., Besterboer T.M., Muth D., Muller 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.
12. De Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., Fouchier R.A., Galiano M., Gorbalenya A.E., Memish Z.A., Perlman S., Poon L.L., Snijder E.J., Stephens G.M., Woo P.C., Zaki A.M., Zambon M., Ziebuhr J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the coronavirus study group. *J. Virol.* 2013; 87:7790–2.
13. De Groot R.J., Family Coronaviridae. In King AMQ, Adams M.J., Cartens E.B., Lefkowitz E.J., editors. *Virus taxonomy, the 9th report of the international committee on taxonomy of viruses.* San Diego, CA: Academic Press; 2012. P. 806–28.
14. De Wilde A.H., Raj V.S., Oudshoorn D., Bestebroer T.M., van Nieuwkoop S., Limpens R.W., Posthuma C.C., van der Meer Y., Bärceña M., Haagmans B.L., Snijder E.J., van den Hoogen B.G. MERS-coronavirus replication induces severe *in vitro* cytopathology and is strongly inhibited by cyclosporin A or interferon- $\alpha$  treatment. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:1749–60.
15. Deaths and severe adverse events associated with anaesthesia-assisted rapid opioid detoxification – New York City, 2012. *MMWR.* 2013; 62(38):777–80.
16. Falzarano D., de Wit E., Martellaro C., Callison J., Munster V.J., Feldmann H. Inhibition of novel  $\beta$  coronavirus replication by a combination of interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin. *Sci. Rep.* 2013; 3:1686.
17. Gorbalenya A.E., Enjuanes L., Ziebuhr J., Snijder E.J. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* 2006; 117:17–37.
18. Hashemi-Shahraki A., Heidarieh P., Azarpira S., Shojaei H., Hashemzadeh M., Tortoli E. Human Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Bat, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(10):1697–9.
19. Hijawi B., Abdallat M., Sayaydeh A., Alqasrawi S., Haddadin A., Jaarour N., Alsheikh S., Alsanouri T. Novel coronavirus infections in Jordan, April 2012: epidemiological findings from a retrospective investigation. *East. Mediterr. Health J.* 2013; 19(1):12–20.
20. Khan G. A novel coronavirus capable of lethal human infections: an emerging picture. *Virol. J.* 2013; 10:66.
21. Lauber C., Gorbalenya A.E. Partitioning the genetic diversity of a virus family: approach and evaluation through a case study of picornaviruses. *J. Virol.* 2012; 86(7):3890–904.
22. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Cramer G., Hu Z., Zhang H., Zhang J., McEachern J., Field H., Daszak P., Eaton B.T., Zhang S., Wang L.F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748):676–9.
23. Martina B.E.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Peiris J.S., Lim W., Osterhaus A.D. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003; 425(6961):915.
24. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66:193–292.
25. Megan M.A., Akhlaghpour M., Neuman B.W., Buchmeier M.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. *mBio.* 2013; 4(4):pii e00524-13. doi: 10.1128/mBio.00524-13.
26. Nagy P.D., Wang R.Y., Pogany J., Hafren A., Makinen K. Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology.* 2011; 411(2):374–82.

27. Nationwide Rubella Epidemic – Japan, 2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2013; 62(23):457–61.
28. Novel Coronavirus – Eastern Mediterranean (04): UK, person to person transmission suspected [Internet] 13 Feb 2013 (cited 13 Feb 2013). Archive Number: 20130213.1541531. Available from: <http://www.promed-mail.org/direct.php?id=20130213.1541531>.
29. Perera R., Wang P., Gomaa M., El-Shesheny R., Kandeil A., Bagato O., Siu L., Shehata M., Kayed A., Moatasim Y., Li M., Poon L., Guan Y., Webby R., Ali M., Peiris J., Kayali G. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(36):pii 20574.
30. Perlman S. The Middle East respiratory syndrome – how worried should we be? *mBio.* 2013; 4(4):e00531-13. doi: 10.1128/mBio.00531-13.
31. Pfefferle S., Schopf J., Kogl M., Friedel C.C., Muller M.A., Carbajo-Lozoya J., Stellberger T., von Dall'Armi E., Herzog P., Kallies S., Niemeyer D., Ditt V., Kuri T., Züst R., Pumpor K., Hilgenfeld R., Schwarz F., Zimmer R., Steffen I., Weber F., Thiel V., Herrler G., Thiel H.J., Schwegmann-Wessels C., Pöhlmann S., Haas J., Drosten C., von Brunn A. The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10):e1002331. doi: 10.1371/journal.ppat.1002331.
32. Puzelli S., Azzi A., Santini M.G., Di Martino A., Facchini M., Castrucci M.R., Meola M., Arvia R., Corcioli F., Pierucci F., Baretto S., Bartoloni A., Bartolozzi D., de Martino M., Galli L., Pompa M.G., Rezza G., Balocchini E., Donatelli I. Investigation of an imported case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection in Florence, Italy, May to June 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(34):pii 20564.
33. Pyrc K., Sims A.C., Dijkman R., Jebbink M., Long C., Deming D., Donaldson E., Vabret A., Baric R., van der Hoek L., Pickles R. Culturing the unculturable: human coronavirus HKU1 infects, replicates, and produces progeny virions in human ciliated airway epithelial cell cultures. *J. Virol.* 2010; 84:11255–63.
34. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Muller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J., Osterhaus A.D., Bosch B.J., Haagmans B.L. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature.* 2013; 495(7440):251–4.
35. Reusken C.B., Haagmans B.L., Muller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., Muth D., Raj V.S., Vries L.S., Corman V.M., Drexler J.F., Smits S.L., Tahir Y.E., De Sousa R., van Beek J., Nowotny N., van Maanen K., Hidalgo-Hermoso E., Bosch B.J., Rottier P., Osterhaus A., Gortazar-Schmidt C., Drosten C., Koopmans M.P. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10):859–66.
36. Scobey T., Yount B.L., Sims A.C., Donaldson E.F., Agnihothram S.S., Menachery V. D., Graham R.L., Swanstrom J., Bove P.F., Kim J.D., Grego S., Randell S.H., Baric R.S. Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(40):16157–62.
37. Smith E.C., Blanc H., Vignuzzi M., Denison M.R. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: Evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* 2013; 9(8):e1003565.
38. Snijder E.J. 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.
39. Stockman L.J., Bellamy R., Garner P. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med.* 2006; 3(9):e343.
40. To K.K., Hung I.F., Chan J.F., Yuen K.Y. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(Suppl 2):103–8.
41. Van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbelenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2012; 3(6):pii e00473-12.
42. Van Doremalen N., Bushmaker T., Munster V.J. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill.* 2013; 18(38):pii 20590.
43. Wang N., Shi X., Jiang L., Zhang S., Wang D., Tong P., Guo D., Fu L., Cui Y., Liu X., Arledge K.C., Chen Y.-H., Zhang L., Wang X. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Research.* 2013; 23:986–93.
44. 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.
45. Zhu X., Liu O., Du L., Lu L., Jiang S. Receptor-binding domain as a target for developing SARS vaccines. *J. Thorac. Dis.* 2013; 5(2):S142–8.

#### Authors:

Stovba L.F., Lebedev V.N., Petrov A.A., Ruchko V.M., Kulish V.S., Borisevich S.V. The 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the RF Ministry of Defense. Sergiev Possad, Russian Federation.

#### Об авторах:

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

Поступила 12.02.15.

Л.В.Саяпина, Е.А.Соловьев, А.А.Горяев, В.П.Бондарев

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ**

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Российская Федерация

В работе исследовали 8 культур штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. высушивания, хранившихся в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Установлено, что большинство культур сохранили свои основные иммунобиологические свойства. Вместе с тем отмечено, что лиофилизация не предохраняет штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ от изменения его остаточной вирулентности при длительном хранении. Выявлено, что  $LD_{50}$  у 7 культур штамма туляремийного микроба находилась в пределах от 100 до 250 м.к., в то же время для штамма 1966 г. остаточная вирулентность составила  $7,3 \cdot 10^5$  м.к. Значения иммуногенной активности изготовленных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ колебались в регламентированных пределах. Кроме этого штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1987 г. не соответствовал установленным требованиям по показателю «Специфическая безопасность», так как введение подкожно дозы  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл вызвало гибель морской свинки в течение установленного срока наблюдения. Показана необходимость постоянного поддержания стабильности исходных иммунобиологических свойств штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения.

**Ключевые слова:** штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, остаточная вирулентность, иммунобиологические свойства.

L.V.Sayapina, E.A.Solov'ev, A.A.Goryaev, V.P.Bondarev

**Studies of Immunobiological Properties in *Francisella tularensis* Vaccine Strain 15 NIEG under Extended Storage Conditions**

Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

Investigated have been 8 cultures of *Francisella tularensis* strain 15 NIEG (lyophilized in 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012, and 2013, respectively) stored at the State Collection of Microorganisms of the Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. It is established that the majority of cultures has maintained their immunobiological properties. However, it is of note that liophilization does not prevent *F. tularensis* strain 15 NIEG from changes in its residual virulence under extended storage. Revealed is the fact that  $LD_{50}$  for 7 cultures of tularemia microbe strain is within the limits of 100–250 microbial cells (m.c.). At the same time, residual virulence for the strain which dates back 1966 is  $7.3 \cdot 10^5$  m.c. Immunogenic activity rates in *F. tularensis* 15 NIEG strain cultures range within specified limits. Apart from this, *F. tularensis* 1987 strain does not comply with the established requirements to the “specific safety”, as subcutaneous inoculation with  $5 \cdot 10^9$  m.c./ml caused death of Guinea pigs within the scheduled observation time. Demonstrated is the necessity in maintaining constant stability of the original immunobiological properties in *Francisella tularensis* strain 15 NIEG under extended storage conditions.

**Key words:** *Francisella tularensis* strain 15 NIEG, residual virulence, immunobiological properties.

Туляремия относится к зоонозным инфекциям. Ее природные очаги встречаются во многих странах северного полушария; в России они преимущественно распространены на территории Европейской части и Западной Сибири [1, 6, 10]. Возбудитель туляремии – *Francisella tularensis* – отличается высокой вирулентностью и контагиозностью, устойчивостью существования во внешней среде, множественностью путей передачи, длительной выживаемостью в основных факторах обитания (воздух, вода, пища, предметы обихода и др.) [5, 8, 9].

В Российской Федерации заболевания людей туляремией регистрируются в виде спорадических случаев (от 25 до 70) или эпидемических вспышек (от 800 до 1015), возникающих в годы повышения численности грызунов [3]. В 2013 г. вспышка туляремии трансмиссивного характера зарегистрирована в Ханты-Мансийске [4]. Следует отметить, что в настоящее время более 70 % случаев заболевания ту-

ляремией регистрируется у городских жителей, как правило, не привитых против этой инфекции [2].

Для специфической профилактики туляремии в России с 1946 г. используется вакцина туляремийная живая на основе штамма *F. tularensis* 15, полученного Б.Я.Эльбертом и Н.А.Гайским. С 1960-х годов вакцина изготавливается из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученного путем пассажей культуры штамма *F. tularensis* 15 через организм морских свинок. В США с 1950-х годов успешно применялась живая туляремийная вакцина на основе штамма *F. tularensis* LVS. Однако из-за высокой остаточной вирулентности у данного штамма и развития нежелательных реакций при вакцинации людей, в настоящее время за рубежом туляремийная живая вакцина не применяется [11].

Известно, что эффективность живых вакцин обеспечивается высокой иммуногенной активностью производственных штаммов. Используемый для изго-



товления туляреминой вакцины штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ обладает остаточной вирулентностью, что способствует его приживаемости, размножению и развитию активного противотуляреминого иммунитета в организме привитого [7].

Свойства вакцинного штамма при хранении могут изменяться. Особенно это важно учитывать при изготовлении новой серии маточной культуры штамма. Л.В.Сиротюк (1979) в своей работе при определении антителообразования у белых мышей, иммунизированных тремя вариантами культур штамма *F. tularensis* 15, поддерживаемых в разных учреждениях, убедительно показала их иммунологическую неравноценность по срокам образования антител в организме иммунизированных животных. Другие исследования показали, что сохранность в высушенном состоянии не защищает штамм от аттенуации и диссоциации клеток в R-форму, не обеспечивающих формирования защитного иммунитета [7]. Данное положение подтверждается тем, что используемый на протяжении многих лет штамм *F. tularensis* 15 неоднократно подвергался восстановлению иммуногенных свойств (1954, 1962 гг.), в последний раз – в 2003 г.

Указанными выше причинами обусловлена необходимость и значимость детального изучения основных иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившихся в течение длительного времени.

Целью работы является изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет хранения.

### Материалы и методы

В работе использовали 8 лиофилизированных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1953, 1966, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. высушивания, хранившихся в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России при температуре минус  $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Исследуемые культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ выращивали на питательной среде для культивирования и выделения туляреминого микроба (Ft-агар) при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. Изучение иммунобиологических свойств штаммов туляреминого микроба проводили на беспородных белых мышах (масса 18–20 г) и морских свинках (масса 300–450 г). Для определения остаточной вирулентности по 10 белых мышей иммунизировали подкожно дозами от 5 до  $5 \cdot 10^6$  м.к. в объеме 0,5 мл. За животными наблюдали от 3 до 21 сут. Погибших животных вскрывали, асептично извлекали селезенку, высевали в пробирки с Ft-агаром и инкубировали в течение 5 сут при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Для определения иммуногенной активности исследуемые штаммы вводили подкожно 5 морским свинкам в дозах от 5 до  $5 \cdot 10^4$  м.к./мл. Через 30 сут животных инфицировали культурой вирулентного

штамма *F. tularensis* 503 дозой 1000 DCL (1 DCL – 5 м.к.). За животными наблюдали в течение 30 сут. Прививаемость штаммов изучали на 2–5-е сутки после кожного нанесения морским свинкам суспензий в дозах  $5 \cdot 10^7$  и  $5 \cdot 10^6$  м.к./мл. Специфическую безопасность определяли на морских свинках, которым подкожно вводили  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл, с последующим наблюдением за ними в течение 15 сут.

### Результаты и обсуждение

Следует отметить, что иммуногенность живых вакцинных штаммов коррелирует с остаточной вирулентностью, снижение которой является первым сигналом изменения их иммунобиологических свойств. Известны случаи, когда культуры штамма туляреминого микроба, утратившие остаточную вирулентность, одновременно снижали или теряли свою иммуногенность [11].

Вакцинный штамм туляреминого микроба должен обладать определенной степенью остаточной вирулентности и вызывать реактивные изменения в органах лабораторных животных, интенсивность и продолжительность которых зависит от дозы введенных микробных клеток и степени их остаточной вирулентности. Результаты изучения остаточной вирулентности культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания приведены в табл. 1.

Остаточную вирулентность культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания определяли по приживаемости туляреминого микроба в органах белых мышей. Гибель животных учитывали в сроки до 21 сут после введения культур, т.к. в более поздние сроки туляреминый микроб практически не обнаруживается ни в мазках, ни в посевах. В процессе наблюдения установлено, что у всех павших на 3–10-е сутки животных, которым вводили культуры штамма туляреминого микроба в дозах 5,  $5 \cdot 10^1$ ,  $5 \cdot 10^2$ ,  $5 \cdot 10^3$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^5$  и  $5 \cdot 10^6$  м.к./мл отмечались типичные для туляреминой инфекции патологические изменения в разной степени выраженности. Наибольшие изменения в виде плотного инфильтрата на месте введения, гиперемии сосудов подкожной клетчатки и лимфатических узлов, а также увеличения и уплотнения печени и селезенки наблюдали при введении животным больших доз, за исключением штамма 1966 г. лиофилизации. Патоморфологические изменения в органах животных при введении, как малых, так и больших доз данного штамма были менее выражены. По мере увеличения времени с момента введения культуры штамма до гибели животных, изменения в их организме становились более умеренными, но даже в отдаленные сроки в месте введения наблюдался инфильтрат.

Для установления причин гибели животных селезенку высевали методом отпечатков на Ft-агар. Через 3–5 сут инкубации посевов при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  культура туляреминого микроба обнаруживалась во все сроки наблюдения. Выросшую культуру идентифицировали с помощью иммуноглобули-

Таблица 1

Результаты определения остаточной вирулентности культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания

Заражающая доза, м.к.	1953 г.		1966 г.		1987 г.		2003 г.		2012 г.		2013 г.	
	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li	Пало мышей, шт.	Li
5	3	0,3	0	0	0	0	3	0,3	2	0,2	1	0,1
50	6	0,6	3	0,3	9	0,9	8	0,8	8	0,8	5	0,5
500	7	0,7	1	0,1	9	0,9	9	0,9	9	0,9	9	0,9
5·10 <sup>3</sup>	10	1,0	2	0,2	10	1,0	10	1,0	10	1,0	7	0,7
5·10 <sup>4</sup>	9	0,9	3	0,3	10	1,0	9	0,9	10	1,0	10	1,0
5·10 <sup>5</sup>	10	1,0	4	0,4	10	1,0	10	1,0	10	1,0	10	1,0
5·10 <sup>6</sup>	10	1,0	7	0,7	10	1,0	10	1,0	10	1,0	10	1,0
LD <sub>50</sub>	250 м.к.		7,3·10 <sup>5</sup> м.к.		125 м.к.		100 м.к.		100 м.к.		100 м.к.	
Норма LD <sub>50</sub>	10 <sup>2</sup> –2·10 <sup>6</sup> м.к.											

нов туляремиальных диагностических флуоресцирующих. В мазках, окрашенных иммуноглобулинами, наблюдалось специфическое ярко-зеленое свечение по периферии микробных клеток.

В результате проведенных исследований установлено, что у 7 культур штамма отмечалась сходная степень остаточной вирулентности, которая находилась в пределах от 100 до 250 м.к. В то же время для штамма 1966 г. высушивания LD<sub>50</sub> составила 7,3·10<sup>5</sup> м.к. Представленные данные (табл. 1) свидетельствуют о том, что остаточная вирулентность у изученных культур, кроме штамма 1966 г., достоверно не отличается друг от друга и соответствует регламентированным требованиям (от 100 до 2·10<sup>6</sup> м.к.).

Результаты изучения иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания приведены в табл. 2.

Главным условием, определяющим возможность использования живых вакцин, является их безопасность для человека и животных. О специфической безопасности культур испытываемого штамма разных лет высушивания судили по реакции организма морских свинок на их введение. Бактерии вакцинных штаммов должны приживаться и распространяться в организме морских свинок и не должны вызывать их гибель в течение срока наблюдения. Специфическую безопасность определяли путем введения морским свинкам подкожно дозы 5·10<sup>9</sup> м.к./мл исследуемых культур. После окончания срока наблюдения у всех морских свинок на месте введения отмечался некроз тканей, что допускается установленными требованиями. У отдельных животных отмечалось увеличение и уплотнение лимфатических узлов, спаянных с мягкими тканями. При этом культуры 6 штаммов были безопасными для животных, а введение штамма 1987 г. вызвало гибель морской свинки в остром периоде на 11-е сутки наблюдения. У животного при вскрытии выявлены типичные для туляремиального инфекционного процесса изменения в месте введения и внутренних органах, а также отмечались умеренное увеличение регионарных лимфатических узлов, отек

окружающей клетчатки с мелкими кровоизлияниями, изменение цвета, уплотнение и увеличение печени и селезенки.

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что только одна культура штамма (1987 г.) по специфической безопасности не соответствовала предъявляемым требованиям.

Важным показателем иммуногенной активности штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ является определение его прививаемости на морских свинках при накожном применении. Вакцинный штамм при накожном нанесении на депилированный участок кожи животных доз 5·10<sup>6</sup> и 5·10<sup>7</sup> м.к./мл должен вызывать у них прививочную реакцию в виде появления через 2–5 сут в месте введения насечек инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм. В результате проведенных исследований выявлено, что культуры штамма туляремиального микроба вызывали умеренно выраженную прививочную реакцию размером от 5 до 10 мм, что свидетельствует о сохранности иммунологической активности испытываемых культур.

Наиболее надежным методом оценки иммуногенной активности вакцинного штамма является определение минимальной иммунизирующей дозы (ЕД<sub>50</sub>) в тесте активной защиты морских свинок. Вакцинный штамм туляремиального микроба при подкожной иммунизации в дозах 5, 5·10<sup>1</sup>, 5·10<sup>2</sup>, 5·10<sup>3</sup> и 5·10<sup>4</sup> м.к./мл должен предохранять животных от гибели при заражении через 30 сут вирулентным штаммом туляремиального микроба.

Следует отметить, что значения иммуногенной активности относительно недавно изготовленных культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ 2012 и 2013 гг. колебались в регламентированных пределах. Установлено, что для подкожно иммунизированных морских свинок штаммом туляремиального микроба 2012 г. и через 21 сут зараженных дозой 1000 DCL штамма *F. tularensis* 503, ЕД<sub>50</sub> составила 158,5 м.к., а для штамма 2013 г. – 230 м.к., что указывает на их высокую иммуногенную активность. Проведенный ретроспективный анализ паспортов и протоколов еже-

Результаты изучения иммунобиологических свойств культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ разных лет высушивания

Год высушивания штамма	Прививаемость		Иммуногенность ED <sub>50</sub> , м.к.	Специфическая безвредность
	Доза, м.к.	Размер папулы, мм		
1953	5·10 <sup>7</sup>	6×8	Нет данных	Соответствует
	5·10 <sup>6</sup>	6×7		
1966	5·10 <sup>7</sup>	6×8	Нет данных	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	6×8		
1969	5·10 <sup>7</sup>	6×7	Нет данных	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	5×7		
1987	5·10 <sup>7</sup>	8×10	25	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	5×7		
1990	5·10 <sup>7</sup>	10×10	16	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	10×10		
2003	5·10 <sup>7</sup>	5×7	25	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	8×10		
2012	5·10 <sup>7</sup>	8×9	158,5 (паспортные данные)	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	11×11		
2013	5·10 <sup>7</sup>	10×10	230 (паспортные данные)	—«—
	5·10 <sup>6</sup>	7×10		
Норма показателя	5·10 <sup>7</sup>	5×15	Не более 1000	При введении 5·10 <sup>9</sup> м.к. не должен вызывать гибели морской свинки
	5·10 <sup>6</sup>			

годного изучения штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ на базах производителей и специализированной лаборатории показал, что иммуногенность исследуемых культур разных лет высушивания и хранения была в пределах от 25 до 200 м.к. (норма не более 1000 м.к.).

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что 7 из 8 изученных культур вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранившихся в лиофилизированном состоянии от 2 до 60 лет при температуре минус (19±1) °С, сохраняют свои основные иммунобиологические свойства в пределах регламентированных требований. Установлено, что хранение в лиофилизированном состоянии культур штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ не предохраняет его от изменения остаточной вирулентности, оцениваемой по LD<sub>50</sub>. При этом LD<sub>50</sub> у штаммов 1953, 1969, 1987, 1990, 2003, 2012 и 2013 гг. лиофилизации была в пределах от 100 до 250 м.к., для вакцинного штамма, изготовленного в 1966 г., — 7,3·10<sup>5</sup> м.к. Выявлено, что штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ 1987 г. не соответствует требованиям по показателю «Специфическая безопасность», т.к. введение подкожно дозы 5·10<sup>9</sup> м.к./мл вызывало гибель морской свинки в течение установленного срока наблюдения. Представленные выше данные показывают необходимость постоянного поддержания в условиях длительного хранения стабильности иммунобиологических свойств штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ для своевременного выявления изменений, характеризующих его, как вакцинный.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Косилко С.А., Бренева Н.В. Эпидемиологическая обстановка и профилактика зоонозных и природно-очаговых инфекционных болезней в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 1:62–6.
2. Марьяновская Т., Митрикова Л., Тимченко О. Случаи туляремии среди жителей Москвы. *Врач.* 2007; 12:79–80.
3. Мещерякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и вакцинопрофилактика (к 80-летию создания первой туляремийной лаборатории в России). *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2010; 2:17–22.
4. Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2014; 5(78):14–20.
5. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. *Инф. бол.* 2007; 5(1):67–76.
6. Попов В.П., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е., Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка в природных очагах туляремии на территории Центрального федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):10–4.
7. Сиротюк Л.В. Биологические свойства туляремийных вакцинных штаммов НИИЭГ. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1964; 10:116–20.
8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 15(40):631–46.
9. Oyston P.C., Sjøstedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:967–78.
10. Tarnvik A., Priebe H.S., Grunow R. Tularemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36(5):350–5.
11. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

## References

1. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Kosilko S.A., Breneva N.V. [Epidemiological situation and prophylaxis of zoonotic and natural-focal infections in Siberia and Far East]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.* 2013; 1:62–6.
2. Mar'yanovskaya T., Mitrikova L., Timchenko O. [Tularemia cases



among the population of Moscow]. *Vrach*. 2007; 12:79–80.

3. Meshcheryakova I.S. [Tularemia: present day epidemiology and preventive vaccination. (To the 80<sup>th</sup> anniversary since the establishment of the first tularemia laboratory in Russia). *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2010; 2:17–22.

4. Meshcheryakova I.S., Dobrovolsky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. [Transmissible tularemia epidemic outbreak in Khanty-Mansiisk in 2013]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2014; 5(78):14–20.

5. Nikiforov V.V., Karetkina G.N. [Tularemia: since the discovery up to the present day]. In: [Infectious Diseases]. 2007. Vol. 5. P. 67–76.

6. Popov V.P., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. [Epizootiological and epidemiological situation in tularemia natural foci in the territory of the Central Federal District of the Russian Federation from 1992 to 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):10–4.

7. Sirotyuk L.V. [Biological properties of tularemia vaccine strains NIIEG]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.* 1964; 10:116–20.

8. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 15(40):631–46.

9. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:967–78.

10. Tarnvik A., Priebe H.S., Grunow R. Tularemia in Europe: an epidemiological overview. *Scand. J. Infect. Dis.* 2004; 36(5):350–5.

11. Cole L.E., Elkins K.L., Michalek S.M., Qureshi N., Eaton L.J., Rallabhandi P., Cuesta N., Vogel S.N. Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.* 2006; 176:6888–99.

#### Authors:

Sayapina L.V., Solov'ev E.A., Goryaev A.A., Bondarev V.P. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation.

#### Об авторах:

Саяпина Л.В., Соловьев Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Поступила 13.04.15.

О.О.Фоменков, Г.Д.Елагин, Г.В.Куклина, Д.В.Печенкин, В.В.Крупин, Н.В.Богачева, А.А.Кытманов,  
А.В.Еремкин, О.В.Тихвинская, Е.Ю.Вахнов

## ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ

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

В ходе исследований было проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышиной миеломы и лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных инаktivированными микробными культурами *Francisella tularensis*. В результате были получены гибридомы-продуценты моноклональных антител (МКА), специфичных к антигенам возбудителя туляремии. Оценена перспективность применения их для выявления данного возбудителя методом иммуноферментного анализа. Установлено, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11, позволяют выявлять микробные клетки различных штаммов возбудителя туляремии в концентрации  $0,5 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup> и не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов в концентрациях  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./см<sup>3</sup>, что свидетельствует об их специфичности. Планируется использовать полученные МКА в работе по созданию иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя туляремии.

**Ключевые слова:** туляремия, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, иммунодиагностика.

O.O.Fomenkov, G.D.Elagin, G.V.Kuklina, D.V.Pechenkin, V.V.Krupin, N.V.Bogacheva, A.A.Kytmanov,  
A.V.Eremkin, O.V.Tikhvinskaya, E.Yu.Vakhnov

## Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Anti-Bodies to Tularemia Agent Antigens

Filial Branch of the 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov,  
Russian Federation

Carried out have been two experimental studies on hybridization of mouse myeloma cells and lymphocytes of BALB/c mice immunized with inactivated microbe *Francisella tularensis* cultures. As a result obtained have been hybridomas-producers of monoclonal antibodies (MAb) specific to the antigens of tularemia agent. Evaluated have been the prospects of its application for the detection of the agent under discussion using enzyme-linked immunoassay. Established is the fact that monoclonal antibodies produced by 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11 hybridomas make it possible to identify microbe cells of various tularemia agent strains when concentrated up to  $0,5 \cdot 10^6$  mc/sm<sup>3</sup>, and do not interact with cultures of heterologous microorganisms when concentrated to  $1,0 \cdot 10^8$  mc/sm<sup>3</sup>, which testifies to their specificity. These MAb are planned to be used for the construction of immune-enzyme and immune-chromatographic test-systems designed for tularemia agent detection.

**Key words:** tularemia, monoclonal antibodies, enzyme-linked immunoassay, immune-diagnostics.

Туляремия представляет собой зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, характеризующееся различными механизмами и путями передачи возбудителя, лихорадкой, интоксикацией, образованием лимфаденитов, полиморфизмом клеточных проявлений и затяжным течением [2]. Несмотря на несомненные успехи в борьбе с возбудителями особо опасных болезней в целом, значимость туляремийного микроба как этиологического фактора в патологии человека не только не снижается, но и проявляет тенденцию к нарастанию [1]. Периодически регистрируются спорадические случаи и крупные вспышки туляремии [6, 8].

К настоящему времени для выявления *Francisella tularensis* и диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество различных диагностических тестов. Однако официально зарегистрированы единичные тест-системы и препараты, большая часть из которых – экспериментальные разработки [3, 4].

Создание современных средств иммунодиагностики, предназначенных для обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы, невозможно без высокоак-

тивных специфических антител.

Цель работы состояла в получении гибридных клеточных линий, секретирующих иммуноглобулины к специфическим эпитопам антигенов возбудителя туляремии. Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: получить гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам возбудителя туляремии; наработать препараты специфических туляремийных моноклональных антител и оценить перспективность их применения для выявления *F. tularensis*.

## Материалы и методы

Препарат для иммунизации лабораторных животных готовили из смеси суспензий инаktivированных микробных культур *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси  $3,0 \cdot 10^{10}$  м.к./см<sup>3</sup>, с добавлением  $2,0$  мг/см<sup>3</sup> геля гидроокиси алюминия. Иммунизацию осуществляли подкожно 4-кратно с интервалом в 7 сут. Доза препарата составила  $1,0 \cdot 10^9$ ,  $2,0 \cdot 10^9$ ,  $4,0 \cdot 10^9$  и  $8,0 \cdot 10^9$  м.к. соответственно. Через 18 дней после иммунизации

осуществляли взятие крови из параорбитального синуса и определяли титр специфических антител методом иммуноферментного анализа.

Через 20 дней после последней иммунизации животным делали бустерную инъекцию смесью инактивированных микробных клеток *F. tularensis* штаммов Schu, 503, 543. Культуру вводили внутрибрюшинно в дозе  $15 \cdot 10^9$  м.к. на мыш. На четвертые сутки селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии средой RPMI-1640 с буфером HEPES.

Слияние В-лимфоцитов селезенки мыши и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили 50 % раствором полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 по методике G.Kohler и C.Milstein [7] в модификации De St.Fazekas и P.Scheidegger [5].

Продуцирующую активность гибридных культур определяли, начиная с 10-х суток после гибридизации, дважды с интервалом 3 дня в иммуноферментном анализе. Культуральную жидкость в объеме 100 мкл вносили в планшеты, сенсibilизированные туляреминым антигеном, состоящим из смеси инактивированных бактерий *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси  $2,0 \cdot 10^7$  м.к./см<sup>3</sup> в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,6. Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений.

С целью изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от  $2,0 \cdot 10^5$  до  $6,25 \cdot 10^3$  кл./см<sup>3</sup> и засеивали ими лунки 24-луночного планшета в объеме 1,0 см<sup>3</sup>. Культивирование осуществляли в течение 5 сут. За минимальную посевную концентрацию принимали концентрацию клеток, при которой на 5-е сутки не наблюдали гибели культуры.

Изучение секреторных свойств полученных клонов проводили в процессе культивирования *in vitro* в 24-луночных планшетах в течение 10 пассажей, а также *in vivo* в процессе 4 пассажей при введении клеток гибридом в брюшную полость мышей линии BALB/c в дозе  $1,0 \cdot 10^6$  кл./см<sup>3</sup>.

Имуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного переосаждения сульфатом аммония с последующим диализом против 0,15 М NaCl, забуференного 20 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7,5.

Изучение диагностических возможностей полученных препаратов моноклональных антител проводили в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА) с использованием культур *F. tularensis* штаммов 503, 543 и Schu в концентрации от  $4,0 \cdot 10^6$  до  $1,25 \cdot 10^5$  м.к./см<sup>3</sup> с двукратным шагом, а также гетерологичных микробных культур *Yersinia pseudotuberculosis* штамма 681, *Yersinia pestis* штамма EV, *Burkholderia pseudomallei* штамма C-141, *Burkholderia mallei* штамма Ц-5, *Brucella abortus* штамма 19-BA, *Escherichia coli* штамма 101, *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./см<sup>3</sup>. Планшет

сенсibilизировали туляремиными кроличьими имуноглобулинами в концентрации 20 мкг/см<sup>3</sup> в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере. После отмывки в лунки планшета вносили гомо- и гетерологичные микробные культуры в указанных выше концентрациях, а затем – антимышинные имуноглобулины, меченные пероксидазой хрена.

## Результаты и обсуждение

Эффективность проведенной иммунизации животных смесью суспензий инактивированных микробных культур *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543 оценивалась по титру сывороточных антител.

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что исследуемые сыворотки взаимодействуют с культурами бактерий *F. tularensis* разных штаммов в титрах от 1:4000 до 1:128000, при этом титр антител в сыворотках, полученных от животных № 2 и 5, составил более чем 1:32000 со всеми исследуемыми штаммами. Данные животные были использованы в работе в качестве источника иммунных спленоцитов.

Проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы и лимфоцитов иммунизированных мышей линии BALB/c. В результате тестирования гибридных культур были выявлены 103 первично-позитивные гибридные линии клеток, продуцирующие антитела к антигенам возбудителя туляремии. Для дальнейшей работы были отобраны и криоконсервированы 30 первичных культур. Для последующего клонирования использовали 10 гибридных культур с наиболее высоким уровнем продукции антител.

Изучение специфичности полученных клонов показало, что гибридные клетки линий 31Е3В9, 35А4В5 продуцировали антитела, перекрестно-реагирующие с антигенами кишечной палочки, а также возбудителей псевдотуберкулеза, чумы и бруцеллеза. Остальные клонированные гибридомы продуцировали антитела, не реагирующие с гетерологичными микробными культурами. Результаты исследования представлены в табл. 2.

Полученные клоны гибридом при культивировании устойчиво сохраняли способность секретировать антитела к антигенам возбудителя туляремии на протяжении 10 пассажей *in vitro*. При этом их минимальная посевная концентрация находилась на уровне от  $12,5 \cdot 10^3$  до  $25,0 \cdot 10^3$  кл./см<sup>3</sup>.

На следующем этапе была оценена перспектив-

Таблица 1

Специфическая активность сывороток к антигенам *F. tularensis*

Сыворотка животного, №	Титр антител в сыворотке при исследовании в ИФА с культурой <i>F. tularensis</i>		
	Schu	503	543
1	1:8000	1:32000	1:16000
2	1:32000	1:64000	1:32000
3	1:4000	1:8000	1:4000
4	1:8000	1:16000	1:16000
5	1:32000	1:128000	1:64000



Культуральные и продуктивные свойства гибридом

Наименование гибридной клеточной линии	Минимальная посевная концентрация, $10^3$ кл./см <sup>3</sup>	Оптимальная посевная концентрация, $10^3$ кл./см <sup>3</sup>	Титр МКАТ в культуральной жидкости	Титр МКАТ в асцитной жидкости
31G1F10	25,0	100	1:2560	1:800000
32E5D3	12,5	50	1:2560	1:400000
35B11C8	25,0	100	1:1280	1:400000
35F3G10	25,0	100	1:10240	1:1600000
35H10G2	12,5	50	1:10240	1:1600000
36B8E11	25,0	100	1:10240	1:800000
36C2F11	25,0	100	1:2560	1:800000
36D5F4	25,0	100	1:1280	1:400000

Примечание: специфическая активность представлена в виде медиан титров антител (n=5).

ность применения полученных моноклональных антител для выявления микробных культур *F. tularensis* (табл. 3). Представленные результаты, свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридами 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F11, позволяют при помощи ТИФА выявлять микробные клетки *F. tularensis* штаммов 503, 543 и Schu в концентрации  $0,5 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup>. Антитела, продуцируемые гибридами 35F3G10, 35H10G2, 36B8E11, 36D5F4, обладают специфической активностью к различным штаммам туляремиального микроба на уровне  $1,0\text{--}4,0 \cdot 10^6$  м.к./см<sup>3</sup>. Все исследованные антитела в иммуноферментном анализе не взаимодействуют с культурами гетерологических микроорганизмов *Y. pseudotuberculosis* штамма 681, *Y. pestis* штамма EV, *B. pseudomallei* штамма C-141, *B. mallei* штамма Ц-5, *B. abortus* штамма 19-BA, *E. coli* штамм 101, *B. anthracis* штамм СТИ-1 в концентрациях  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./см<sup>3</sup>, что свидетельствует об их специфичности.

Таким образом, наиболее перспективными для выявления микробных культур *F. tularensis* являются моноклональные антитела, продуцируемые гибридными клетками линий 31G1F10, 32E5D3, 35B11C8, 36C2F1. Гибридомы-продуценты и препараты моноклональных антител паспортизованы. Их планируется использовать в работе по конструированию иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя туляремии.

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

Таблица 3

Оценка диагностических возможностей полученных препаратов моноклональных антител

МКАТ	Выявляемая концентрация микробных культур, $10^6$ м.к./см <sup>3</sup>		
	<i>F. tularensis</i> штамм 503	<i>F. tularensis</i> штамм 543	<i>F. tularensis</i> штамм Schu
31G1F10	0,5	0,5	0,5
32E5D3	0,5	0,5	0,5
35B11C8	0,5	0,5	0,5
35F3G10	2,0	4,0	2,0
35H10G2	2,0	4,0	2,0
36B8E11	2,0	4,0	2,0
36C2F11	0,5	0,5	0,5
36D5F4	1,0	0,5	1,0

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Горшенко В.В., Попов В.П. К оценке эпидемической и эпизоотической ситуации по туляремии в Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 2(96):8–12.
2. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. *Инф. болезни.* 2007; 5(1):67–76.
3. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):12–5.
4. Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Любовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной дот-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремиального микроба «ДИАТул-М». *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:42–5.
5. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
6. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D., Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16:238–43.
7. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7.
8. Willke A., Meric M., Granow R., Sayan M. An outbreak of oropharyngeal tularemia linked to natural spring water. *J. Med. Microbiol.* 2009; 1:112–16.

## References

1. Bezsmertny V.E., Gorshenko V.V., Popov V.P. [On the assessment of tularemia epidemic and epizootic situation in the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 2(96):8–12.
2. Nikiforov V.V., Karetkina G.N. [Tularemia: since the discovery to the present day]. *Infek. Bol.* 2007; 5(1):67–76.
3. Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. [Current state of tularemia immuno-diagnostics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):12–5.
4. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:42–5.
5. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.
6. Hauri A.M., Hofstetter I., Seibold E., Kaysser P., Eckert J., Neubauer H., Spletstoesser W.D., Investigating an airborne tularemia outbreak, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16:238–43.
7. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7.
8. Willke A., Meric M., Granow R., Sayan M. An outbreak of oropharyngeal tularemia linked to natural spring water. *J. Med. Microbiol.* 2009; 1:112–16.

## Authors:

Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Krupin V.V., Bogacheva N.V., Kymanov A.A., Eremkin A.V., Tikhvinskaya O.V., Vakhnov E.Yu. Filial Branch of the 48<sup>th</sup> Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

## Об авторах:

Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Крупин В.В., Богачева Н.В., Кыманов А.А., Еремкин А.В., Тихвинская О.В., Вахнов Е.Ю. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны. Российская Федерация, Киров.

Поступила 22.08.14.

А.А.Будченко, И.Ю.Мазурова, В.И.Илюхин

# ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОБЛОТТИНГА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Проведен сравнительный анализ иммуноэлектрофореграмм клеточных антигенов – *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 после иммуноблоттинга с иммунными кроличьими сыворотками, полученными к живым клеткам авирулентного штамма *B. pseudomallei* 107, клеточным и внеклеточным антигенам *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416. Визуальный анализ позволил на иммуноэлектрофореграмме клеточных антигенов *B. mallei* 10230, полученной в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230, выявить фракции с молекулярными массами 18,4 и 35 kDa, отсутствующие на иммуноэлектрофореграмме *B. pseudomallei* C-141 после иммуноблоттинга с этой же сывороткой, что позволяет дифференцировать патогенные буркхольдерии. В то же время использование в иммуноблоттинге гетерологичных иммунных сывороток повышает дискриминирующую способность сравнительного анализа иммуноэлектрофореграмм клеточных антигенов в целях дифференциации патогенных буркхольдерий. Уровень воспроизводимости иммуноэлектрофореграмм позволяет использовать коэффициенты их сходства для сравнительного анализа с применением компьютерных программ.

**Ключевые слова:** анализ, иммуноблоттинг, клеточные и внеклеточные антигены, сыворотка, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

A.A.Budchenko, I.Yu.Mazurova, V.I.Ilyukhin

## Studies of the Composition of the Cell Antigen Preparations Obtained from Pathogenic Burkholderia, Using Immunoblotting

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Carried out has been comparative analysis of the cell antigen immune-electrophoregrammes of *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, and *B. cepacia* 25416 after immunoblotting with immune rabbit sera to living cells of avirulent *B. pseudomallei* 107, cellular and extracellular antigens of *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, and *B. cepacia* 25416. Visual investigation has revealed the presence of fractions with molar mass of 18.4 and 35 kDa in *B. mallei* 10230 cell antigens' electrophoregramme obtained by means of immunoblotting with serum to *B. mallei* 10230 cell antigens, as distinct from *B. pseudomallei* C-141 electrophoregramme with the same serum. This makes it possible to distinguish the pathogenic *Burkholderia*. At the same time utilization of heterologous immune sera enhances discriminating capacity of the comparative assay. The level of reproducibility of immune-electrophoregrammes allows for the deployment of the similarity coefficient for computer-based comparative analysis.

**Key words:** analysis, immunoblotting, cellular and extracellular antigens, serum, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*.

Мелиоидоз – инфекция людей и животных, эндемичная в районах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии. Быстрая и точная диагностика инфекции имеет большое значение для своевременного адекватного лечения. Несмотря на то, что «золотым стандартом» постановки диагноза мелиоидоза является выделение от больного культуры возбудителя, в эндемичных этому заболеванию регионах для ускоренной диагностики чаще всего применяют РНГА и ТИФА [11, 12]. Чувствительность и специфичность этих методов значительно зависят от антигенов, используемых для сенсибилизации эритроцитов (РНГА) и пластин (ТИФА), и не всегда составляют 100 %. Поэтому активно продолжается поиск антигенов, обеспечивающих одновременно максимальные чувствительность и специфичность этих методов [10]. Иммуноблоттинг, являясь разновидностью гетерогенного иммунного анализа, представляет собой

эффективный метод выявления иммуногенных фракций в антигенных комплексах изучаемых микроорганизмов. Применяли иммуноблоттинг при изучении микроорганизмов, относящихся к группе особо опасных, в том числе патогенных буркхольдерий. Так, в 1993 г. N.Anuntagool *et al.* получили и проанализировали иммуноэлектрофореграммы после иммуноблоттинга с сывороткой больного мелиоидозом клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. cepacia*, некоторых псевдомонад на наличие перекрестных антигенов [6]. J.B.Katz. *et al.* предложили ввести иммуноблоттинг как дополнительный метод для выявления антител к антигенам *B. mallei* у лошадей в требованиях OIE (The Office of International Des Epizooties) по оформлению таможенных документов на их перевозку за пределы страны-хозяина [8]. Применялся иммуноблоттинг в качестве метода полифазной таксономии при дифференциации видов бруцелл [5].

Целью работы был поиск различий в составах антигенных фракций на иммуноэлектрофореграммах клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, полученных методом иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к живым клеткам, клеточным и экстрацеллюлярным антигенам, которые можно использовать для дифференциации патогенных видов буркхольдерий.

## Материалы и методы

Для анализа взяты типичные штаммы: вирулентный – *B. pseudomallei* C-141 и авирулентный – *B. pseudomallei* 107, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416 из коллекционного центра Волгоградского противочумного института. Получены иммунные кроличьи сыворотки к живым клеткам *B. pseudomallei* 107, клеточным и экстрацеллюлярным антигенам (ЭЦА) штаммов *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416. Бактерии *B. pseudomallei* 107 для иммунизации выращивали на питательном агаре *Pseudomonas* Agar F «Difco» (США) (F-агар) в течение 18 ч при 37 °С. Иммунизировали кроликов дозой – 10<sup>9</sup> м.к. в 1 мл 0,15 М раствора NaCl (рН 7,2) по схеме: первое введение и через 7 сут второе – подкожно, третье – через 14 сут внутривенно. Кровь брали через 7 сут после последнего введения (титры сыворотки в реакции иммунодиффузии составили 1:32). Клеточные антигены получали из бактериальной массы штаммов *B. pseudomallei* 107, *B. pseudomallei* C141, *B. mallei* 10230, *B. thailandensis* 264, *B. cepacia* 25416, выращенной на F-агаре в матрицах в течение 18 ч при 37 °С. Бактериальную массу смывали 0,9 % раствором натрия хлорида и стерилизовали охлажденным до –40 °С ацетоном в соотношении объемов 1:3. Клеточные антигены (супернатант) получали после ультразвуковой обработки суспензии бактериальной массы и центрифугирования (10000 g, 25 мин). Хранили антигены при –40 °С. Для получения ЭЦА бактериальную массу, росшую в течение 18 ч на агаре, покрытом целлофаном, смывали 0,9 % раствором натрия хлорида, центрифугировали (15000 g, 25 мин). Супернатант фильтровали (размер пор фильтра 0,45 мкм). ЭЦА стерилизовали и осаждали из суспензии охлажденным ацетоном (–40 °С) в соотношении объемов 1:3. Концентрацию протеина в пробах измеряли методом М.М.Бредфорда [7]. Для получения иммунных сывороток к клеточным антигенам и ЭЦА кроликов иммунизировали смесью антигенов (1 мг/мл) с неполным адъювантом Фрейнда («Calbiochem», США) в соотношении 1:1 вдоль позвоночника в 10 точек четырехкратно с интервалом в 7 дней. Кровь отбирали при титрах сывороток в реакции иммунодиффузии 1:32. Электрофорез в ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДСН) проводили в вертикальных пластинах (14×16×0,1 см) по U.K.Laemmli [9]. Одну часть геля после электрофореза окрашивали раствором Кумасси G-250, вторую – использовали в блоттинге (размер пор мембраны – 0,45 мкм, время

переноса – 2 ч) [13]. Фракции антигенов выявляли иммуноферментным методом, используя полученные сыворотки и меченные пероксидазой антитела против кроличьих иммуноглобулинов («Медгамал», Россия). В качестве субстрата применяли тетраметилбензидин. Воспроизводимость иммуноэлектрофореграмм определяли, получая их не менее трех раз для каждой серии сыворотки и вычисляя коэффициент сходства Дайса [1].

## Результаты и обсуждение

Получены электрофореграммы суммарных клеточных белков 4 видов буркхольдерий в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ с ДСН) с последующим выявлением протеинов окраской Кумасси G-250 и иммуноферментным методом (иммуноблоттинг) с иммунными сыворотками к живым клеткам и клеточным антигенам *B. pseudomallei* 107 (рис. 1). На электрофореграммах суммарных антигенов буркхольдерий, окрашенных Кумасси G-250, имеются две мажорные фракции (33,6 и 64 kDa), которые, как ранее нами показано, присутствуют в составе электрофореграмм суммарных клеточных белков штаммов буркхольдерий, имеющих в коллекции Волгоградского противочумного института [2]. Также нами было доказано, что различия в составе суммарных клеточных белков буркхольдерий позволяют, используя специальные компьютерные программы, проводить их видовую дифференциацию [2]. Визуальный сравнительный анализ полученных иммуноэлектрофореграмм с сывороткой к живым клеткам (рис. 1, Б) и клеточным антигенам (рис. 1, В) *B. pseudomallei* 107 выявил различия их как в составе мажорных (крупных) фракций, так и всего набора антигенных фракций. Так, на иммуно-

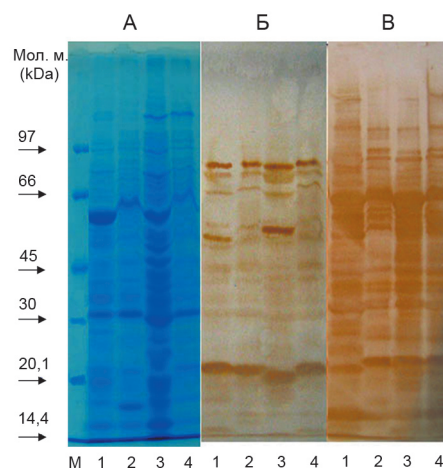


Рис. 1. Электрофореграммы и иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий:

А – электрофореграммы после электрофореза в ПААГ с ДСН, окрашенные Кумасси G-250; Б – иммуноэлектрофореграммы блоттинга с иммунной сывороткой к живым клеткам *B. pseudomallei* 107; В – иммуноэлектрофореграммы блоттинга с иммунной сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* 107. М – трек с маркерными белками. Обозначения трек с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264



электрофореграммах анализируемых штаммов, после иммуноблоттинга с сывороткой к живым клеткам *B. pseudomallei* 107, выявлены мажорные фракции с молекулярной массой 20,1 и 88 kDa, которые на иммуноэлектрофореграммах после блоттинга с сывороткой к клеточным антигенам относятся к фракциям с малым количеством антигена. Можно сделать вывод, что при введении живых бактерий в организм кролика антитела образуются в основном к эпитопам антигенов, расположенным на поверхности клеток. При иммунизации же животного клеточными антигенами часто сохраняется зависимость: крупная фракция после окраски Кумасси G-250 – крупная фракция на иммуноэлектрофореграмме (пример – антигенная фракция молекулярной массой 60 kDa на рис. 1, А, В). Представляется перспективным препаративное выделение антигенных фракций с молекулярной массой 20,1 и 88 kDa и использование их в получении группоспецифического препарата для идентификации буркхольдерий. Ранее сообщалось о применении фракции 20,1 kDa для сенсибилизации пластин в ТИФА при диагностике мелиоидоза [4].

Получены иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов 4 штаммов буркхольдерий в иммуноблоттинге с иммунными кроличьими сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230 (рис. 2). В результате визуального анализа представленных иммуноэлектрофореграмм установлено, что спектры антигенных фракций штаммов *B. pseudomallei* C-141, *B. mallei* 10230 и *B. thailandensis* 264, выявленные в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C-141, отличались незначительно (рис. 2, А). Это показывает, что существует большое количество идентичных эпитопов на антигенных комплексах, взятых для иммунизации [3]. Анализ состава мажор-

ных фракций выявил в составе спектра антигенов *B. cepacia* 25416 (рис. 2, А, трек 3) антигенную фракцию с молекулярной массой 23 kDa, отсутствующую в составе спектров антигенных фракций трех других штаммов. Эти различия в составах антигенных фракций при достаточной воспроизводимости иммуноэлектрофореграмм делают возможным анализ их сходства с применением компьютерных программ. Такого же уровня были различия спектров клеточных антигенов анализируемых штаммов при использовании в иммуноблоттинге сыворотки к ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, Б). Иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов этих же штаммов, выявленных в иммуноблоттинге с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230, имели большие отличия, чем выявлялись в предыдущем случае. Так, на иммуноэлектрофореграмме *B. mallei* 10230 присутствовали мажорные фракции с молекулярной массой 18,4 и 35 kDa, отсутствующие или имеющие следовые количества на иммуноэлектрофореграммах остальных трех штаммов. Использование этих различий позволяет дифференцировать близкородственные *B. mallei* 10230 и *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, В, трек 2). В то же время составы спектров *B. pseudomallei* C-141 и *B. thailandensis* 264 очень близки в диапазоне 14,4–30 kDa и различались незначительно в зоне 30–66 kDa (рис. 2, В, треки 1 и 4).

Визуальный анализ клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с сывороткой к ЭЦА *B. mallei* 10230 также выявил высокое сходство спектров антигенных фракций *B. pseudomallei* C-141 и *B. thailandensis* 264 (рис. 2, Г, треки 1 и 4), что коррелирует с данными о близости их фенотипов [4]. Однако спектры *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230, обладая высоким сходством, имеют различия в низкомолекулярной области трека. Так, в составе спектра *B. mallei* 10230 присутствует мажорная фракция 15 kDa, практически отсутствующая в спектре *B. pseudomallei* C-141 (рис. 2, Г, треки 1 и 2). Состав антигенных фракций *B. cepacia* имел большие отличия от составов фракций штаммов «группы *pseudomallei*» (рис. 2, В).

Иммуноэлектрофореграммы патогенных буркхольдерий получены в иммуноблоттинге с гетерологичными для патогенных видов иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. cepacia* 25416 и *B. thailandensis* 264 (рис. 3). Спектры антигенов, выявленные сывороткой к клеточным антигенам и ЭЦА *B. thailandensis* 264, различались незначительно. Также незначительны различия спектров *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230 при использовании сыворотки к клеточным антигенам *B. cepacia* 25416 (рис. 3, А). В то же время есть явные различия в спектрах *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230, выявленных сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416 (рис. 3, Б). На треке 1 (*B. pseudomallei* C-141) присутствует антигенная фракция с молекулярной массой 19 kDa, отсутствующая на треке 2 (*B. mallei* 10230). Перспективным представляется выделение этой фракции и использование в создании препарата,

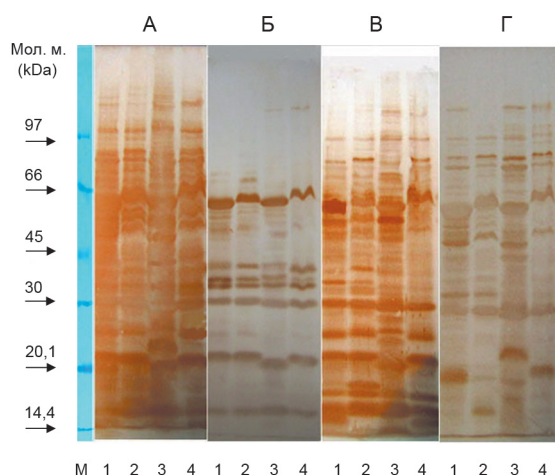


Рис. 2. Иммуноэлектрофореграммы клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. pseudomallei* C-141 и *B. mallei* 10230:

Обозначения иммуноэлектрофореграмм: А – с сывороткой к клеточным антигенам *B. pseudomallei* C-141; Б – с сывороткой к ЭЦА *B. pseudomallei* C-141; В – с сывороткой к клеточным антигенам *B. mallei* 10230; Г – с сывороткой к ЭЦА *B. mallei* 10230. М – трек с маркерными белками. Обозначения треков с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. cepacia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264

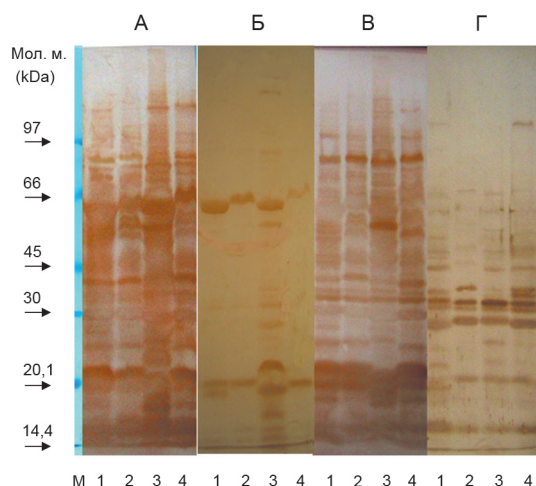


Рис. 3. Иммуноэлектрофорез суммарных клеточных антигенов буркхольдерий после иммуноблоттинга с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА *B. ceracia* 25416 и *B. thailandensis* 264:

Обозначения иммуноэлектрофорезов: А – с сывороткой к клеточным антигенам *B. ceracia* 25416; Б – с сывороткой к ЭЦА *B. ceracia* 25416; В – с сывороткой к клеточным антигенам *B. thailandensis* 264; Г – с сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264. М – трек с маркерными белками. Обозначения треков с антигенами штаммов: 1 – *B. pseudomallei* C-141; 2 – *B. mallei* 10230; 3 – *B. ceracia* 25416; 4 – *B. thailandensis* 264

позволяющего дифференцировать патогенные виды буркхольдерий.

Воспроизводимость иммуноэлектрофорезов, вычисленная для полученных сывороток как среднее значение коэффициентов сходства Дайса, имела значения от 91 до 95 %.

Таким образом, проведенный анализ полученных иммуноэлектрофорезов клеточных антигенов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia* в иммуноблоттинге с иммунными сыворотками к клеточным антигенам и ЭЦА четырех видов буркхольдерий выявил отдельные фракции, присутствующие в антигенных спектрах штаммов одного патогенного вида и отсутствующие в спектрах штаммов другого патогенного вида, которые позволяют дифференцировать эти виды. Достигнутая воспроизводимость иммуноэлектрофорезов позволяет использовать их в сравнительном анализе сходства спектров антигенных фракций анализируемых видов с применением компьютерных программ.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бейли Н. Математика в биологии и медицине. М.: Мир; 1970.
2. Будченко А.А., Илюхин В.И., Викторов Д.В. Сравнительный анализ электрофорезов суммарных клеточных белков патогенных буркхольдерий. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2005; 2:24–8.
3. Домарадский И.В. Проблемы перекрестного иммунитета. М.: Медицина; 1973.
4. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 1:7–11.
5. Кулаков Ю.К., Желудков М.М., Толмачева Т.А.

Использование молекулярно-биологических методов идентификации бруцелл в сравнительном анализе штаммов, выделенных от больных собак. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2003; 1:6–14.

6. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):1232–6.

7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.

8. Katz J., Devvald R., Nicholson J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia eaudi*, *Babesia eaballi*, *Trypanosoma evuiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12:46–50.

9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–5.

10. Pal V., Kumar S., Malik P., Rai G.P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19:1193–8.

11. Sermswan R.W., Wongratanaheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63:146–9.

12. Tiya-wisuttri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathuratsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P., Wuthiekanun V. Antibodies from patients with Melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4872–4.

13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:4350–4.

## References

1. Beily N. [Mathematics in Biology and Medicine]. M.: Mir; 1970.
2. Budchenko A.A., Ilyukhin V.I., Viktorov D.V. [Comparative analysis of electrophoretograms of bulk cell proteins in pathogenic *Burkholderia*]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:24–8.
3. Domaradsky I.V. [Problems of Cross-Protective Immunity]. M.: Meditsina; 1973.
4. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Seimova I.K. [*Burkholderia thailandensis*: biological properties, identification and taxonomic position]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2002; 1:7–11.
5. Kulakov Yu.K., Zheludkov M.M., Tolyacheva T.A. [Application of molecular-genetic methods for Brucella identification in comparative assay of the strains isolated from infected dogs]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2003; 1:6–14.
6. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1):1232–6.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.
8. Katz J., Devvald R., Nicholson J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia eaudi*, *Babesia eaballi*, *Trypanosoma evuiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000; 12:46–50.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680–5.
10. Pal V., Kumar S., Malik P., Rai G.P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19:1193–8.
11. Sermswan R.W., Wongratanaheewin S., Anuntagool N. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 63:146–9.
12. Tiya-wisuttri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathuratsakul D., Cheng A.C., Chierakul W., Chaowagul W., Day N.P., Wuthiekanun V. Antibodies from patients with Melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:4872–4.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:4350–4.

## Authors:

Budchenko A.A., Mazurova I.Yu., Ilyukhin V.I. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

## Об авторах:

Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 30.09.14.

С.А.Бугоркова, Т.Н.Щуковская, А.Ф.Курылина

# **ЯДРЫШКОВЫЙ АППАРАТ ЛИМФОЦИТОВ КАК ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ВАКЦИН**

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

Изучено состояние ядрышкового аппарата лимфоцитов периферических лимфоидных органов лабораторных животных, иммунизированных против чумы и туляремии, для оценки прогностических возможностей применения этого параметра на этапах доклинической характеристики разрабатываемых вакцин против особо опасных инфекций. Для выявления активности аффинных к серебру белков в области ядрышкового организатора (AgNOR) полутонкие парафиновые срезы лимфоидных органов иммунизированных мышей линии BALB/c окрашивали по методу W.M.Howell и D.A.Black [10] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum. Установлено увеличение доли клеток с тремя и более AgNOR-позитивными ядрышками в ядрах лимфоцитов периферических органов иммунной системы биомodelей при оценке функционального состояния органов иммуногенеза у иммунизированных против чумы и туляремии животных, что косвенно отражает пролиферативный потенциал в клеточном звене иммунитета. Информативность количественной оценки пролиферативной активности клеток по изменению состояния AgNOR в ядрах лимфоцитов органов иммуногенеза позволяет рассматривать возможность включения этого метода в существующую схему морфологической оценки качества вакцин на доклиническом этапе.

**Ключевые слова:** периферические лимфоидные органы, лимфоциты, вакцинные штаммы, AgNOR, особо опасные инфекции.

S.A.Bugorkova, T.N.Shchukovskaya, A.F.Kurylina

## **Nucleolar Apparatus of Lymphocytes as an Indicator of Lymphoid Organs' Functional Activity in the Context of Pre-Clinical Vaccine Evaluation**

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

Studied has been the state of the nucleolar apparatus in lymphocytes of periphery lymphoid organs in laboratory animals vaccinated against plague and tularemia in order to evaluate predictive capability of the parameter in the context of pre-clinical evaluation of the vaccines under development, against particularly dangerous infections. For the detection of silver adjoining proteins, contained in the nucleolar organizer region (AgNOR), W.M.Howell and D.A.Black staining of semi-thin paraffin sections of lymphoid organs of the immunized BALB/c mice has been performed. For this purpose, ready-assembled panel, manufactured at BioVirtum, has been deployed. Under assessment of the functional state of immunogenesis organs in vaccinated against plague and tularemia animals revealed has been the increase in numbers of cells with three and more AgNOR-positive nucleoli in the nucleus of the lymphocytes of periphery organs of the biomodels' immune system. It indirectly manifests proliferative capacity of immune system cellular component. Informativity of the quantitative evaluation of the cell proliferative activity by the reference to the status changes of AgNOR in the nuclei of immunogenesis organs' lymphocytes makes it possible to entertain the possibility of introducing this method into the existing morphological vaccine quality assessment scheme at the stage of the pre-clinical trials.

**Key words:** periphery lymphoid organs, lymphocytes, vaccine strains, AgNOR, particularly dangerous infections.

Совершенствование и разработка современных, эффективных, безопасных, конкурентоспособных вакцин для профилактики особо опасных инфекционных болезней диктует необходимость оптимизации процесса оценки качества препаратов за счет применения современных информативных методов. В этой связи поиск новых и совершенствование существующих способов быстрой и эффективной оценки состояния клеточного звена иммунной системы организма не теряет своей актуальности.

В последние годы в морфологии и цитологии широкое применение получил метод определения функционального состояния клеток с помощью оценки активности области ядрышкового организатора (AgNOR) [6, 11, 12].

Иммунная система как одна из систем реагирования и контроля участвует во всех адаптационных реакциях макроорганизма [7]. Представительством этой системы в организме являются лимфоидные органы, неодинаковые по своему назначению и клеточному составу. В то же время любая форма иммунного ответа (гуморального или клеточного) является результатом сложных процессов кооперации между различными популяциями лимфоцитов, макрофагами, дендритными клетками, конечный полезный результат которых зависит от функциональной активности компонентов системы.

Известно, что основным компонентом всех лимфоидных органов выступает лимфоцит. Лимфоцит, принимая сигналы о любых изменениях внутренней



среды организма, модулирует свои функции с учетом восстановления общего гомеостаза. Этот принцип лежит в основе реакции иммунокомпетентных клеток, что делает их универсальными индикаторами нормы и патологии. Своеобразным показателем пролиферативной активности лимфоидных органов на молекулярном уровне может быть оценка процессов репликации в ядрах лимфоцитов и их изменение под влиянием вакцинации. При различных патологических состояниях или на фоне изменения функциональной активности в процессе формирования адаптивных реакций происходят изменения в ядрышковом аппарате клетки [2, 3, 5, 8, 12].

Целью работы было изучение состояния ядрышкового аппарата лимфоцитов периферических лимфоидных органов лабораторных животных, иммунизированных против чумы и туляремии, для оценки прогностических возможностей применения этого параметра на этапах доклинической характеристики вакцин против особо опасных инфекций.

### Материалы и методы

Лабораторных мышей линии BALB/c массой (19±1) г подкожно в область правого бедра иммунизировали вакцинными штаммами в дозе 10<sup>4</sup> м.к.: 1-я группа – *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; 2-я – *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ; 3-я – *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в сочетании с иммуномодулятором синтетического происхождения азоксимера бромидом, который инокулировали подкожно перед иммунизацией в дозе 0,2 мг/кг массы животного; 4-я – контрольная (интактные животные, которым аналогичным образом вводили 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида); 5-я – мыши, которым подкожно вводили только азоксимера бромид в дозе 0,2 мг/кг. Всего было использовано 35 животных по 7 в группе. На 7-е сутки после иммунизации животных умерщвляли хлороформом и для гистологического исследования брали кусочки селезенки и регионарных лимфатических узлов (РЛУ). Гистологический материал фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина. Дальнейшую обработку гистологического материала (проводку, заливку) проводили по стандартной схеме [4]. Готовые полутонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления активности аффинных к серебру белков в области ядрышкового организатора (AgNOR) полутонкие срезы лимфоидных органов окрашивали по методу W.M.Howell и D.A.Black [10] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum. Для оценки функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов в каждом случае с помощью светового микроскопа OLYMPUS CX 41 при увеличении ×1000 и программы VideoZavr 1.5 определяли диаметр лимфоцитов в зоне фолликулов селезенки и паракортикальной зоне регионарных лимфатических узлов, площадь ядер в них. Готовность лимфоцитов к пролиферации оценивали по методу J.Crocker и P.Nar

[9], основанному на выявлении зон активных ядрышковых организаторов, учитывая относительное содержание NOR-активированных клеток. Для этого анализировали состояние 300 ядер лимфоцитов и определяли среднее содержание AgNOR на 1 ядро, процентное содержание AgNOR-позитивных гранул (1, 2, 3 и более) на 1 ядро. Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного пакета компьютерных программ «Excel» и «Statistica» 7.0.

### Результаты и обсуждение

Аргирофильные кислые негистоновые белки ядрышка (C23, B23, UBF и РНК-полимераза I), ответственные за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, выявлялись при окраске в виде черных точек (гранул) – это места, где серебро связалось в клетке с кислыми протеинами, имеющими непосредственное отношение к транскрипции и преобразованию рРНК, а ядрышки приобретали коричневый цвет (рисунок). При этом содержание гранул серебра в ядрышках, как правило, соответствует количеству активно работающей в них РНК-полимеразы I [13].

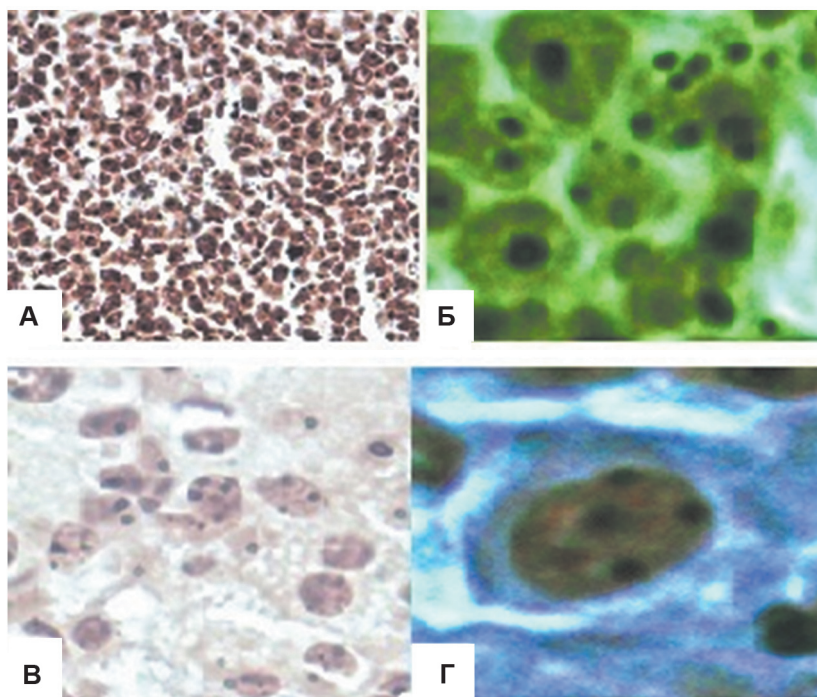
Проведение количественного учета ряда параметров аргентофилии ядрышка позволяет оценивать активность рибосомных генов [1], а следовательно, функциональное состояние клетки в целом.

При иммунизации мышей отмечали относительное увеличение среднего диаметра лимфоцитов фолликулов в периферических лимфоидных органах, но достоверных отличий в изменении среднего диаметра клеток не выявлено.

При разделении клеток по величине их диаметра на малые (М) – менее 6,5, средние (С) – 6,5–8,5 и большие (Б) – более 8 мкм, опирались на известные данные, что малые и средние лимфоциты включают 95 % Т-хелперов и около 50 % цитотоксических Т-лимфоцитов, большие – это большие гранулярные лимфоциты (NK-клетки), реже делящиеся лимфоциты [7].

Характеризуя клеточный состав лимфоцитов в лимфоидных органах иммунизированных животных по изменению величины их диаметра, наблюдали увеличение доли больших лимфоцитов. В селезенке максимальное увеличение количества больших лимфоцитов до 19,4 % (в интактном контроле – 1 %) выявляли у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ. В остальных группах этот показатель превышал контрольные значения не более чем в 4–6 раз. В РЛУ доля больших лимфоцитов была максимальной у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодулятором и составляла 16,1 % (в интактном контроле – 2 %), но во всех случаях увеличивалось количество средних лимфоцитов, за счет чего несколько снижался пул малых лимфоцитов.

Известно, что аргентофилия характерна для



Мышь линии BALB/c, 2-я группа. AgNOR-положительные области в лимфоцитах

А, Б – селезенки. В, Г – РЛУ. Импрегнация серебром по методу W.M.Howell и D.A.Black. Иммерсия  $\times 1000$

белков, обогащенных сульфгидрильными, дисульфидными связями. Как уже указывалось, четкой аргентофилией обладают интерфазные ядрышки и зоны ядрышковых организаторов на митотических хромосомах.

Типичный фенотип лимфоцита при окраске азотно-кислым серебром представлен клеткой в среднем с 1–2 ядрышками преимущественно компактного или нуклеолонемно-компактного типа и, как правило, одной экстрануклеолярной гранулой. Ядра равномерно окрашены, интенсивность аргентофилии одинакова для большинства клеток изучаемой популяции.

Установлено, что в большинстве групп иммунизированных мышей готовность к пролиферации лимфоцитов селезенки и РЛУ превышает таковую у контрольных животных, о чем свидетельствует увеличение среднего показателя количества AgNOR-положительных ядрышек в ядрах клеток (таблица). Этот показатель в РЛУ всех иммунизированных животных превышал в той или иной степени аналогич-

ный в группе intactных животных. Что касалось селезенки, то достоверно относительное содержание AgNOR-положительных ядрышек увеличивалось в 1,6 раза по сравнению с intactным контролем только у мышей 1-й группы.

Менялось соотношение лимфоцитов селезенки с различным количеством AgNOR-положительных ядрышек по отношению к intactному животному (таблица). Если у мышей 1-й группы увеличивалось количество клеток с одним AgNOR-положительным ядрышком и умеренно нарастало число клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками, то у животных в 2-й и 3-й группах наблюдали перераспределение клеток за счет уменьшения доли ядер с одним ядрышком и увеличения количества клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками. Азоксимера бромид, введенный intactным животным, достоверно не изменял функциональное состояние лимфоцитов. В РЛУ у всех иммунизированных мышей (таблица) увеличивалось количество клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками.

Характеристика состояния области ядрышкового организатора (AgNOR) в лимфоцитах периферических лимфоидных органов иммунизированных мышей линии BALB/c ( $M \pm m$ )

Группа	Селезенка				Регионарные лимфатические узлы			
	Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцита	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %			Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцита	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %		
		1	2	более		1	2	более
1-я	2,5±0,97*	67,7	22,6	9,7	2,06±0,64*	22,6	54,8	22,6
2-я	1,81±0,17	32,3	51,6	16,1	2,32±0,93*	22,6	51,6	25,8
3-я	1,94±0,62	32,3	38,7	29,0	2,13±1,12	25,8	51,6	22,6
4-я	1,53±0,32	41,9	51,6	6,5	1,59±0,17	61,3	29	9,7
5-я	1,33±0,13	41,9	58,1	0	1,96±0,19	41,9	56,1	2

\* $P < 0,05$  – различия достоверны по сравнению с intactным контролем.

Таким образом, оценка функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов органов иммуногенеза при вакцинном процессе позволяет косвенно характеризовать пролиферативный потенциал в клеточном звене иммунитета у иммунизированных биомоделей. Применение метода выявления AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах лимфоцитов лимфоидных органов иммунизированных биомоделей связано с возможностью быстрой и информативной количественной оценки пролиферативной активности клеток, основанной на характеристике функциональных изменений их генома, что позволяет рассматривать перспективность включения этого метода в существующую схему морфологического исследования на доклиническом этапе изучения разрабатываемых вакцин.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобров И.П., Авдальян А.М., Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Климачева Т.Б., Мищенко Е.В. Морфофункциональная характеристика белков областей ядрышковых организаторов при гладкомышечных опухолях матки. *Арх. патол.* 2008; 70(3):18–23.
2. Брюхин Г.В., Пашнина Е.Н. Готовность к пролиферации лимфоцитов селезенки потомства крыс при хронической патологии печени матери. *Морфология.* 2005; 2:56–61.
3. Брюхин Г.В., Федосов А.А. Характеристика пролиферативной активности тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства самок с хроническим экспериментальным поражением печени различной этиологии. *Морфология.* 2006; 129(1):57–9.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: ООО «Издательство СпецЛит»; 2010. 96 с.
5. Попков П.Н., Чепайкина А.М., Рябинин В.Е. Состояние активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс после индукции цирроза печени четыреххлористым углеродом и в динамике его лечения. *Мед. наука и образование Урала.* 2008; 2:66–8.
6. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов – маркеры скорости клеточной пролиферации. *Арх. патол.* 2006; 68(3):47–51.
7. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медицина; 2006. 311 с.
8. Чучкова Н.Н., Кормилина Н.В. Активность AgNOR's лимфоцитов лимфатических узлов при формировании атеросклероза у крыс. *Морфологические ведомости.* 2010; 4:74–8.
9. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8.
10. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.
11. Karki S., Jha A., Sayami G. The Role of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Study in Cytological Evaluation of Fluids, Especially for Detection of Malignancy. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2012; 10(37):44–7.
12. Vercosa B.L.A., Borges A.C.J., Mendes F.J.M., Costa M.L.S., Pereira N.B., Melo M.N., Mendonca I.L., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C. Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2011; 17(3):308–17.
13. Voit R., Schnapp A., Kuhn A., Rosenbauer H., Hirschmann P., Stunnenberg H.G., Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 1992; 11:2211–18.

### References

1. Bobrov I.P., Avdalyan A.M., Lazarev A.F., Klimachev V.V., Klimacheva T.B., Mishchenko E.V. [Morphological-functional characteristics of nucleolar organizer region proteins in case of smooth muscle tumors of uterus]. *Arkh. Patol.* 2008; 70(3):18–23.
2. Bryukhin G.V., Pashnina E.N. [Preparedness to splenic lymphocytes proliferation in the brood of female rat with chronic liver pathology]. *Morfologiya.* 2005; 2:56–61.
3. Bryukhin G.V., Fedosov A.A. [Characteristics of proliferative activity of thymocytes and lymphocytes contained in periphery blood of brood from females with chronic experimental liver disorder of various etiology]. *Morfologiya.* 2006; 129(1):57–9.
4. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamentals Principles of Histological Technique]. St. Petersburg: "SpetsLit Publishing House" Ltd.; 2010. 96 p.
5. Popkov P.N., Chepaikina A.M., Ryabinin V.E. [The state of nucleolar organizers' activity in hepatocytes of rats after liver cirrhosis induction using carbon tetrachloride and with the treatment progression]. *Med. Nauka i Obrazovanie Urala.* 2008; 2:66–8.
6. Raikhlin N.T., Bukaeva I.A., Probatova N.A., Smirnova E.A. [Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions – markers of cell proliferation rate]. *Arkh. Patol.* 2006; 68(3):47–51.
7. Khaitov R.M. [Immunology]. M.: GZOTAR-Meditsina; 2006. 311 p.
8. Chuchkova N.N., Kormilina N.V. [Activity of AgNOR's lymphocytes of lymphatic glands in case of atherosclerosis development in rats]. *Morfologich. Vedomosti.* 2010; 4:74–8.
9. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8.
10. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.
11. Karki S., Jha A., Sayami G. The Role of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Study in Cytological Evaluation of Fluids, Especially for Detection of Malignancy. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2012; 10(37):44–7.
12. Vercosa B.L.A., Borges A.C.J., Mendes F.J.M., Costa M.L.S., Pereira N.B., Melo M.N., Mendonca I.L., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C. Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2011; 17(3):308–17.
13. Voit R., Schnapp A., Kuhn A., Rosenbauer H., Hirschmann P., Stunnenberg H.G., Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 1992; 11:2211–18.

### Authors:

Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

### Об авторах:

Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Курылина А.Ф. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 01.12.14.



Т.Л.Захарова, Е.А.Михеева, Н.А.Осина

**НОВЫЙ ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОЙ В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К НЕЙ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Представлен эффективный способ получения В-субъединицы холерного токсина, преимуществом которого является относительная простота и экономичность, а также максимальный выход очищенной В-субъединицы, полностью лишенной примеси токсичной субъединицы А. Это достигается использованием рекомбинантного штамма холерного вибриона, продуцирующего вместо холерного токсина только его В-субъединицу, благодаря чему выделяемый препарат не обладает остаточной токсичностью. В данной работе мы использовали метод колоночной гельпроникающей хроматографии, который обеспечивает сохранение стабильного нативного состояния и максимальный выход антигена. Предлагаемый способ был отработан опытным путем, в процессе которого после каждого этапа колоночной гель-хроматографии на TSK-геле HW-60 чистоту образца анализировали с помощью диск-электрофореза, в результате чего выяснили, что трех ступеней очистки достаточно для получения лишенного примесей препарата В-субъединицы холерного токсина. Иммунологическая активность очищенной В-субъединицы подтверждена получением моноклональных антител. Полученный препарат В-субъединицы холерного токсина и моноклональные антитела к ней могут служить основой конструирования различных вариантов иммунодиагностических тест-систем.

*Ключевые слова:* В-субъединица холерного токсина, гель-хроматография, *Vibrio cholerae*.

T.L.Zakharova, E.A.Mikheeva, N.A.Osina

**New Advantageous Method for the Production of Purified Cholera Toxin B-Subunit and Monoclonal Antibodies to It***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Put forward is an efficient method for manufacturing cholera toxin B-subunit. Its advantages are relative simplicity and economy feasibility, as well as maximum output of the purified B-subunit, absolutely free from toxic A-subunit contaminant. All this is due to the deployment of cholera vibrio recombinant strain producing only cholera toxin B-subunit instead of cholera toxin as it is, which results in lack of residual preparation toxicity. Applied has been gel-penetration column chromatography, providing for stable native state and maximum antigen output. The method under discussion is verified experimentally. Sample purity has been analyzed after each phase of chromatographic investigation on TSK gel HW-60, using disc electrophoresis. It is established that three steps of purification are ample for the obtainment of cholera toxin B-subunit preparation free from admixtures. Immunological activity of the purified B-subunit is validated by monoclonal antibody obtainment. Designed preparation of cholera toxin B-subunit and monoclonal antibodies to it can serve as a basis for the development of various immune-diagnostic test-systems alternatives.

*Key words:* cholera toxin B-subunit, gel-penetration column chromatography, *Vibrio cholerae*.

Исследования, направленные на получение эффективных средств диагностики и профилактики холеры, в настоящее время являются весьма актуальными в связи с заметным ухудшением эпидемической ситуации и угрозой распространения этой инфекции в мире. Одним из наиболее сильнодействующих иммуногенов является холерный энтеротоксин [13], имеющий субъединичную структуру. Его молекула состоит из пяти идентичных В-субъединиц с молекулярной массой 11,6 кДа и одной А-субъединицы с молекулярной массой 27,2 кДа [14]. Известно, что основным фактором иммуногенности, обеспечивающим формирование антитоксического иммунитета при холере, является В-субъединица холерного токсина, что позволяет использовать ее в качестве иммунизующего агента при создании эффективных профилактических и диагностических препаратов [5, 6]. Не обладая токсической активностью, она способна специфически адсорбироваться на поверхности тонкого кишечника и стимулировать локальный иммун-

ный ответ [5]. При иммунизации холерным токсином токсиннейтрализующие антитела образуются преимущественно к В-субъединице [6, 9]. Поэтому живые холерные вакцины конструируют на основе штаммов, содержащих лишь структурный ген *ctxB*, контролирующий синтез В-субъединицы холерного токсина, а к убитым вакцинам добавляют очищенную В-субъединицу [16]. Очищенная В-субъединица используется для получения антитоксических сывороток, высокоспецифических иммуноглобулинов и диагностических тест-систем. Современная тенденция развития вакцинопрофилактики характеризуется получением вакцин с химически определенным составом и регулируемой иммуногенностью, новыми повышенными требованиями к безвредности и чистоте антигенных препаратов.

Новые требования к качеству антигенных препаратов предполагают поиск наиболее совершенных технологических методов их выделения. В связи с этим очевидна необходимость разработки

эффективных способов получения В-субъединицы холерного токсина – важнейшего холерного протективного антигена.

Традиционный способ получения В-субъединицы основан на выделении ее из очищенного холерного токсина с помощью гель-фильтрации на сефадексе G-75 [12]. При этом разделение токсина на субъединицы происходит в кислой среде (рН 3,2) в присутствии мочевины в высокой концентрации, что приводит к денатурации белка и требует последующего ренатурирования и диализа, в результате чего происходит частичная утрата нативных иммуногенных свойств В-субъединицы. Известен также распространенный способ очистки В-субъединицы из холерного токсина с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки лизо-GM<sub>1</sub>-ганглиозида [8]. Упомянутые способы являются трудоемкими и многоэтапными процессами, требующими наличия дорогостоящих хроматографических сорбентов, реактивов и оборудования. Кроме того, препараты В-субъединицы обладают остаточной токсичностью из-за присутствия в них примесей субъединицы А. Следует отметить также, что эти способы подразумевают предварительное получение очищенного холерного токсина. Это не требуется при предлагаемом нами использовании рекомбинантного штамма, продуцирующего вместо холерного токсина только его В-субъединицу, благодаря чему выделяемый препарат не обладает остаточной токсичностью, так как в нем полностью отсутствует примесь субъединицы А.

Ранее нами было описано получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма, лишенного продукции субъединицы А, при котором основная стадия очистки осуществляется с помощью ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой [2]. Недостатком метода является то, что только небольшая часть от исходной концентрации В-субъединицы связывается с катионообменником в процессе хроматографии, а большее количество антигена утрачивается.

Целью нашего исследования являлась разработка экономичного и эффективного способа получения высокоочищенной нативной иммуногенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней.

### Материалы и методы

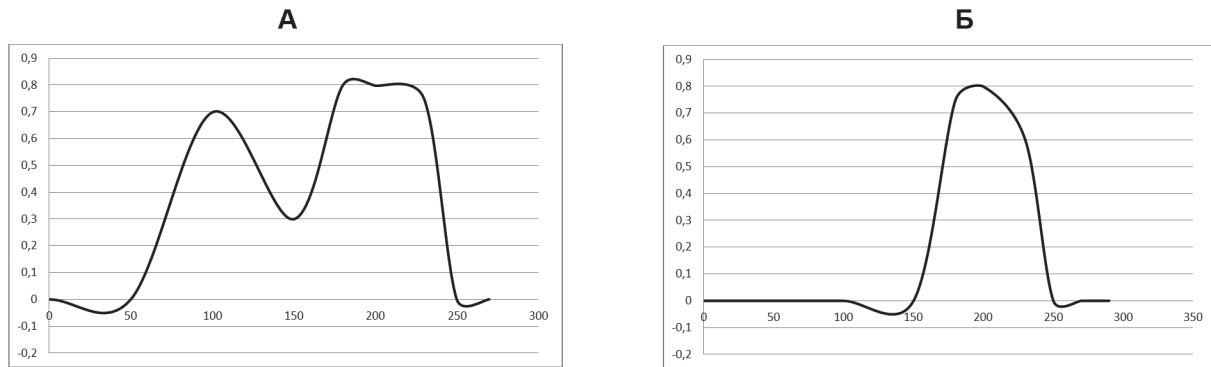
В работе использован штамм не O1 серогруппы *V. cholerae* KM93 (депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб»), содержащий гибридную плазмиду pIEM3 с клонированными генами *vctB*, детерминирующими синтез В-субъединицы холерного токсина [4]. Источником В-субъединицы служил фильтрат бульонной культуры указанного штамма, выращенного в реакторе методом глубинного культивирования в условиях аэрации.

Белковые фракции из фильтрата осаждали в

присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия при рН 4,0, перемешивая в течение 2 ч при комнатной температуре. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0). Препарат диализовали против 50 объемов 0,007 М фосфатного буфера (рН 7,0) в течение 24 ч, нерастворимые примеси удаляли центрифугированием. Полученный образец подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK HW-60 в три степени, элюцию осуществляли фосфатным буфером (0,007 М) при рН 7,0. Собранные фракции спектрофотометрировали при 280 нм и анализировали в реакции иммунодиффузии (РИД) [15] с антисывороткой к В-субъединице холерного токсина. Фракции, содержащие В-субъединицу, объединяли, концентрировали, вновь наносили на колонку и повторяли процедуру до полной очистки В-субъединицы. Для этого потребовалось три этапа очистки на TSK-геле HW-60. Полученный препарат диализовали в течение 48 ч против 50 объемов 0,9 % хлорида натрия, разливали по 1 мл в ампулы и лиофильно высушивали. Содержание белка определяли методом Лоури. Специфическую активность оценивали по титру реакции иммунодиффузии в геле с антитоксической сывороткой методом O. Ouchterlony [15] в его количественной модификации. Чистоту препарата В-субъединицы анализировали в сравнении с коммерческой В-субъединицей холерного токсина («Serva») в диск-электрофорезе в полиакриламидном геле по методу U.K. Laemmli [11]. Остаточную токсичность определяли в кожной пробе Крейга [7]. Моноклональные антитела к полученной В-субъединице получали с помощью гибридомной технологии [10].

### Результаты и обсуждение

В данной работе мы предлагаем использовать метод колоночной гельпроникающей хроматографии, который обладает высокой механической стабильностью и обеспечивает высокоскоростное выделение антигена при минимальном разведении образца. Таким образом, достигается максимальный выход очищенной В-субъединицы из общей белковой фракции. Преимуществом метода гельпроникающей хроматографии по сравнению с ионообменной, предлагаемой нами ранее [2], является также относительная простота исполнения и сохранение стабильного нативного состояния антигена. Предлагаемый способ отработан опытным путем, в процессе которого после каждого этапа колоночной гель-хроматографии на TSK HW-60 чистоту образца анализировали с помощью диск-электрофореза в полиакриламидном геле, в результате чего выяснили, что трех ступеней очистки достаточно для получения лишенного примесей препарата В-субъединицы холерного токсина. На первом этапе очистки В-субъединица обнаруживалась в начальной половине второго пика профиля элюции (рисунок, А). Фракции, содержащие



Очистка В-субъединицы холерного токсина на колонке TSK HW-60:

**А** – первый этап очистки, **Б** – третий этап очистки. По оси ординат – оптическая плотность при 280 нм, по оси абсцисс – объем элюата в мл

В-субъединицу, объединяли, концентрировали и вновь наносили на колонку. Процедуру повторяли до тех пор, пока В-субъединица не сходилась с колонки одним самостоятельным пиком (рисунок, Б). Для этого потребовалось три этапа очистки на TSK-геле HW-60. По разработанному способу получен патент на изобретение [1].

Выход очищенной В-субъединицы от общего количества белка в исходном препарате составил 25 %. В препарате содержится 200 мкг/мл белка (по методу Лоури). По данным диск-электрофореза, в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в конечном препарате обнаруживается одна белковая полоса, идентичная по расположению полосе коммерческой В-субъединицы холерного токсина с молекулярной массой 58 кДа, отсутствуют другие примеси, что является свидетельством гомогенности и чистоты. По титру специфической активности, оцениваемой в реакции иммунодиффузии по Оухтерлони [15], полученный препарат также не отличается от коммерческой В-субъединицы и от В-субъединицы, выделенной нами ранее из целого токсина методом С.У.Лаи [12]. В кожной пробе Крейга на остаточную токсичность очищенная предлагаемым способом В-субъединица не вызывала образование инфильтрата, что указывает на полное отсутствие в ней фактора кожной проницаемости – субъединицы А.

Иммунологическая активность очищенной В-субъединицы подтверждена получением моноклональных антител. Для этого с помощью гибридомной технологии [10] получены и отобраны диагностически значимые гибридомы-продуценты моноклональных антител к В-субъединице ХТ. При культивировании клонов *in vivo* асцитобразование происходило в одни и те же сроки (на 9–10-й день). Независимо от числа пассажей в мышах BALB/c титры моноклональных антител в иммуноферментном анализе находились на одном уровне – от (2432±405) до (2688±944). В среднем объем иммуноасцитической жидкости от одной мыши составил 6,5–7,0 мл при концентрации клеток 7–8·10<sup>6</sup> м.к./мл. Стабильность антителопродукции после длительной криоконсервации гибридом не снижалась.

Эти данные свидетельствуют о возможности использования полученных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к В-субъединице холерного токсина, для конструирования различных вариантов иммунодиагностических тест-систем на их основе, для детекции токсигенных штаммов холерного вибриона.

Впоследствии была проведена комплексная иммунобиологическая оценка действия препаратов В-субъединицы ХТ, полученных различными способами. Показано, что препараты не токсичны для биомоделей, не оказывают на их органы и ткани патологического действия, не вызывают изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, инициируют синтез антител к В-субъединице ХТ. Установлено, что наибольшей протективной активностью обладает препарат, полученный описанным способом [3].

Таким образом, основным результатом работы является получение простым и экономичным способом очищенного гомогенного препарата В-субъединицы холерного токсина с сохранением нативных свойств, не обладающего остаточной токсичностью, и приготовление на его основе моноклональных антител.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Захарова Т.Л., Киреев М.Н., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. Патент 2456996 РФ, опубл. 27.07.2012. Бюл. № 21.
- Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholera*. *Биотехнология*. 2003; 5:53–6.
- Клюева С.Н., Щуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Захарова Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Иммунобиологическая характеристика В-субъединицы холерного токсина. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):67–70.
- Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Еремин С.А., Ильина Т.С. Авирулентный штамм *Vibrio cholera* – продуцент В-субъединицы холерного токсина: получение и молекулярно-генетический анализ. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2007; 4:7–13.
- Янишевский Н.В., Гинцбург А.Л., Вертиев Ю.В., Демме Ю.М., Каратаев Г.И., Смирнов Г.Б. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез В-субъединицы холерного токсина. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1987; 4:26–32.



6. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1987; 5:1116–20.
7. Craig J.P. Cholera toxins. In: Microbial toxins. New York: Academic Press; 1971. Vol. 2A. P. 189–254.
8. Dertzbaugh M.T., Macrina F.L. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structure and functional analysis of the chimeric protein. *Infect. Immun.* 1990; 58(1):70–9.
9. Finkelstein R.A. The cholera enterotoxins and the cholera toxin-related enterotoxins : from the beginning to the present. Bacterial Protein Toxins. *Zbl. Bakt. Suppl.* 1992; 23:161–71.
10. Galfré G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 1977; 266:550–2.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
12. Lai C.Y., Mendez E., Chang D. Chemistry of cholera toxin: the subunit structure. *J. Infect. Dis.* 1976; 133:23–30.
13. Lycke N., Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antibodies. *Immunology.* 1986; 59:301–8.
14. Nursin S., Khan Y.K., Bhuiyan N.A. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholerae is endemic in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5854–6.
15. Ouchterlony O. Antigens antibody reactions on gels. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* 1949; 26:207–12.
16. Taylor D.N., Cardenas V., Sanchez J.L. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholerae vaccine in Peru. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:667–73.
5. Yanishevsky N.V., Gintsburg A.L., Vertiev Yu.V., Demme Yu.M., Karataev G.I., Smirnov G.B. [Constructing of recombinant plasmids, encoding cholera toxin B-subunit biosynthesis]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1987; 4:26–32.
6. Black R.E., Levine M.M., Clements M.L. Protective efficacy in humans of killed whole-vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 1987; 5:1116–20.
7. Craig J.P. Cholera toxins. In: Microbial toxins. New York: Academic Press; 1971. Vol. 2A. P. 189–254.
8. Dertzbaugh M.T., Macrina F.L. Cholera toxin B-subunit gene fusion: Structure and functional analysis of the chimeric protein. *Infect. Immun.* 1990; 58(1):70–9.
9. Finkelstein R.A. The cholera enterotoxins and the cholera toxin-related enterotoxins : from the beginning to the present. Bacterial Protein Toxins. *Zbl. Bakt. Suppl.* 1992; 23:161–71.
10. Galfré G. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* 1977; 266:550–2.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
12. Lai C.Y., Mendez E., Chang D. Chemistry of cholera toxin: the subunit structure. *J. Infect. Dis.* 1976; 133:23–30.
13. Lycke N., Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antibodies. *Immunology.* 1986; 59:301–8.
14. Nursin S., Khan Y.K., Bhuiyan N.A. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholerae is endemic in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(12):5854–6.
15. Ouchterlony O. Antigens antibody reactions on gels. *Act. Pathol. Microbiol. Scand.* 1949; 26:207–12.
16. Taylor D.N., Cardenas V., Sanchez J.L. Two year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholerae vaccine in Peru. *J. Infect. Dis.* 2000; 181:667–73.

## References

1. Zakharova T.L., Kireev M.N., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Method for the production of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. RF Patent 2456996, 27.07.2012.
2. Zakharova T.L., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Obtainment of purified cholera toxin B-subunit from recombinant *Vibrio cholerae* strain]. *Biotechnologia.* 2003; 5:53–6.
3. Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. [Immunobiological characteristics of cholera toxin B-subunit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):67–70.
4. Smirnova N.I., Krepostnova I.M., Livanova L.F., Zadnova S.P., Eremin S.A., Il'ina T.S. [Avirulent *Vibrio cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit: construction and molecular-genetic analysis]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 4:7–13.

## Authors:

Zakharova T.L., Mikheeva E.A., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Захарова Т.Л., Михеева Е.А., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.08.14.

М.В.Овчинникова<sup>1</sup>, М.Н.Исляева<sup>1</sup>, В.Г.Николаев<sup>2</sup>, К.И.Бардахивская<sup>2</sup>, А.К.Никифоров<sup>1</sup>**ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА**<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Проведено сравнительное изучение адсорбционной активности сконструированного специфического энтеросорбента в отношении фармакологических маркеров – метиленовой сини, бычьего сывороточного альбумина, желатина и нейтрализующей активности *in vivo* в отношении специфического маркера – холерного токсина. Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень сорбционной активности в отношении используемых маркерных веществ как исходных микрочастиц хитозана, так и его специфического модификанта сопоставим с аналогичными показателями препаратов сравнения. Установлено, что процесс иммобилизации иммуноглобулинового компонента инициирует изменения электрохимических свойств активной поверхности хитозана, приводящие, с одной стороны, к снижению сорбционной активности специфического препарата по отношению к метиленовой сини и желатину, с другой, к повышению активности сорбции белкового маркера – бычьего сывороточного альбумина, по сравнению с исходной хитозановой матрицей. При определении токсиннейтрализующей способности экспериментального препарата выявлена его высокая антитоксическая активность в отношении энтеротоксина холерного вибриона. Полученные результаты дают основание рассматривать сконструированный антиэнтеротоксический энтеросорбент как вероятный прототип эффективного средства для профилактики и лечения холеры.

**Ключевые слова:** энтеросорбенты, специфические энтеросорбенты, хитозан, функциональная активность, фармакологические маркеры, холерный токсин, специфическая сорбция.

M.V.Ovchinnikova<sup>1</sup>, M.N.Islyayeva<sup>1</sup>, V.G.Nikolaev<sup>2</sup>, K.I.Bardakhivskaya<sup>2</sup>, A.K.Nikiforov<sup>1</sup>**Evaluation of the Functional Activity of the Specific Anticholeraic Enterosorbent**<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology, and Radiobiology, Kiev, Ukraine

Carried out is comparative analysis of adsorption activity of the constructed specific enterosorbent as regards pharmacological markers – methylene blue, bovine serum albumin, gelatin, and neutralizing activity *in vivo* with reference to the specific marker – cholera toxin. The data obtained testify to the fact that the level of the sorption activity in relation to the utilized marker substances both of initial micro-particles of chitosan, and its specific modification, is comparable to the corresponding parameter of the reference drugs. It is established that the process of immunoglobulin component immobilization initiates the changes in electro-chemical properties of the chitosan active surface, leading, on the one side, to the decrease in the sorption activity of the specific preparation in relation to methylene blue and gelatin, and on the other, to the increase in the protein marker sorption activity – bovine serum albumin, as compared to the initial chitosan matrix. In the course of the toxin-neutralizing capacity investigation, identified has been high anti-toxic activity of the experimental preparation in reference to cholera vibrio enterotoxin. The results attained give grounds to view the constructed anti-enterotoxic enterosorbent as potential prototype of efficient aids for cholera prophylaxis and treatment.

**Key words:** enterosorbents, specific enterosorbents, chitosan, functional activity, pharmacological markers, cholera toxin, specific sorption.

Острые кишечные инфекции (ОКИ) характеризуются отсутствием сезонности и возрастной избирательности заболеваемости, развитием нестойкого, кратковременного видоспецифического иммунитета, что предполагает возможность повторного развития инфекционного процесса через ограниченный промежуток времени [7]. Отсутствие тенденции к снижению уровня заболеваемости, утяжеление клинического течения отдельных нозологических форм, развитие резистентности возбудителей к традиционно применяемым этиотропным препаратам обуславливают актуальность разработки новых препаратов для этиопатогенетической терапии и профилактики ОКИ, в том числе и холеры.

Известно, что в патогенезе ряда инфекционных заболеваний большое значение имеют степень специ-

фической и неспецифической интоксикации, состояние систем иммунитета и естественной детоксикации организма, а при кишечных инфекциях – нарушения структуры и функции желудочно-кишечного тракта под действием различных бактериальных или вирусных возбудителей [9]. При этом современные методы лечения, направленные на нейтрализацию действия токсинов, зачастую оказываются малоэффективными. Разработка новых методов лечения больных острыми кишечными инфекционными заболеваниями тесно связана с внедрением в клиническую практику энтеросорбции. Энтеросорбция является составной частью эфферентной терапии, конечной целью которой является прекращение действия токсинов различного происхождения и их элиминация из организма [3, 8]. Лечебный эффект энтеросорбентов осуществляется в

результате их прямого и опосредованного действия на патогенетические механизмы. Вследствие этого эффективная терапия при инфекционных кишечных заболеваниях является вполне обоснованной [3].

В настоящее время активно развивается направление, связанное с разработкой селективных энтеросорбентов путем регулирования размеров пор сорбционных материалов, химического модифицирования поверхности, а также придание избирательности иммобилизацией на сорбентах специфических лигандов и рецепторов [4]. Последнее особенно актуально при разработке энтеросорбентов с прогнозируемыми свойствами, в том числе избирательной антитоксической направленности.

Относительной количественной характеристикой функциональной активности энтеросорбентов является адсорбционная способность, определяемая по веществам-маркерам [3, 10]. При разработке и стандартизации новых видов энтеросорбционных препаратов требованиями нормативно-технической документации предусмотрено использование не менее двух общепринятых веществ-маркеров для оценки данной характеристики. С целью получения прогностической информации в отношении специфической адсорбционной активности вводятся тесты с конкретными патологическими агентами [10]. В качестве веществ-маркеров, как правило, используют метиленовую синь, имитирующую низко- и среднемолекулярные токсиканты, альбумины и желатин – для оценки белок-связывающей активности, обуславливающей детоксикационную сорбцию патологических агентов белковой природы [6]. При изучении специфических свойств энтеросорбентов применяют различные экзо-, эндотоксические и микробиологические маркеры, тест-металлы [10, 11].

Для разработки прототипа противохолерного препарата направленного антитоксического действия нами был сконструирован энтеросорбент, представляющий собой микрочастицы высокомолекулярного хитозана с иммобилизованными антиэнтеротоксическими иммуноглобулинами [1]. Такой специфический модификант должен сохранять способность к неспецифической сорбции, характерную для исходных микрочастиц хитозана, а также проявлять специфическую активность в отношении холерного токсина.

Целью данного исследования являлось изучение адсорбционной способности экспериментального энтеросорбента и микрочастиц хитозана в отношении стандартных фармакологических маркеров в тестах *in vitro* и их антитоксической активности в отношении энтеротоксина холерного вибриона в опыте *in vivo*.

### Материалы и методы

В работу взяты 3 серии экспериментального специфического противохолерного энтеросорбента и 3 серии хитозана пищевого высокомолекулярного (ЗАО «Биопрогресс», Россия), растворенного в 2,5 % растворе лимонной кислоты и использованного в

качестве сорбционной матрицы-носителя. В качестве препарата сравнения в углеволокнистом варианте использовали Карболайн – энтеросорбент IV поколения, разработанный в 90-х годах в институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины. Данный энтеросорбент проявляет высокую сорбционную активность в отношении различных патогенов и продуктов их метаболизма, в том числе холерного вибриона. Карболайн (первоначально Белосорб) – это единственный энтеросорбент, который был успешно применен для лечения холеры в Украине при вспышке заболевания в 1995 г.

В качестве веществ-маркеров для определения адсорбционной способности энтеросорбентов применяли растворы метиленового синего (МС), бычьего сывороточного альбумина (БСА) и желатина в концентрации 0,15, 0,5 и 0,6 % соответственно.

Определение неспецифической адсорбционной способности энтеросорбентов в отношении метиленового синего проводили по методике, изложенной в ФС 42-3246-95 «Таблетки угля активированного». Для этого к навеске энтеросорбента добавляли 0,15 % раствор метиленового синего. Взаимодействие сорбат-сорбент осуществлялось на лабораторном шейкере при средней скорости 150 колебательных движений в минуту. Равновесные растворы отделяли фильтрацией через мембраны с размером пор 0,45 мкм с последующим определением их оптической плотности на спектрофотометре в максимуме поглощения 664 нм в сравнении с оптической плотностью исходного раствора (раствор сравнения) метиленового синего. Адсорбционную способность вычисляли по формуле:

$$X = (D_0 - D) \cdot a \cdot 50/D_0 \cdot m \cdot (1 - 0,01 \cdot W),$$

где  $D_0$  – оптическая плотность раствора сравнения МС;  $D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $m$  – навеска препарата, г;  $a$  – фактическое содержание МС в растворе сравнения, мг/мл;  $W$  – влажность образца, %; 50 – объем раствора МС, мл.

Белок-связывающую активность изучали по методике ВФС 42-2148-92 «Полисорб» в модификации В.И.Решетникова (2005): к навескам энтеросорбентов добавляли 0,5 % раствор бычьего сывороточного альбумина и помещали на лабораторный шейкер. После экспозиции проводили осаждение коллоидных взвесей центрифугированием и осуществляли аналитическую детекцию непрореагировавшего БСА на спектрофотометре в максимуме поглощения 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали исходный раствор БСА. Адсорбционную способность энтеросорбентов вычисляли по формуле:

$$X = (D_0 - D) \cdot a \cdot 25/D_0 \cdot b \cdot (1 - 0,01 \cdot W),$$

где  $D_0$  – оптическая плотность раствора сравнения БСА;  $D$  – оптическая плотность испытуемого



раствора;  $m$  – навеска препарата, г;  $b$  – фактическое содержание БСА в растворе сравнения, мг/мл;  $W$  – влажность образца, %; 25 – объем раствора сравнения БСА, мл.

Адсорбционную активность по желатину определяли по методике ФС 42-3731-99 «Полисорб» в модификации В.И.Решетникова (2005). Навески сорбентов помещали в раствор сорбата и оставляли на лабораторном шейкере на 1 ч. Затем смеси центрифугировали. Определение непрореагировавшего белка в растворе желатина проводили в биуретовой реакции с построением калибровочного графика, учетом усредненных данных экстинкций трех повторностей колориметрирования стандартного раствора, в роли которого выступал 1 % раствор БСА.

Для изучения антитоксической активности применяли препарат очищенного холерного токсина с концентрацией белка 160 мкг/мл и удельной активностью  $8,2 \cdot 10^2$  ЕД<sub>50</sub>/мл. Определение величины ЕД<sub>50</sub> для холерного токсина проводили в опыте на белых мышах по отекогенному эффекту. Расчет величины ЕД<sub>50</sub> осуществляли по методу Кербера-Ашмарина [2].

В качестве биомodelей использовали беспородных белых мышей массой 18–20 г. Животных разделили на 5 экспериментальных групп по 8 шт. в каждой, отличающихся по характеру вводимого препарата: 1 группа – специфический энтеросорбент, 2 – микрочастицы хитозана, 3 – антитоксические иммуноглобулины, 4 – Карболайн, 5 – контроль (холерный токсин).

Определение антитоксической активности энтеросорбентов проводили следующим образом: навески сорбентов вносили в пробирки с раствором холерного токсина заданной концентрации, перемешивали и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После центрифугирования надосадочную жидкость отбирали, из полученных проб делали ряд последовательных разведений шагом 5 и вводили в объеме 50 мкл в подошвенную поверхность одной задней конечности. В противоположную конечность вводили такое же количество 0,9 % раствора натрия хлорида (контроль). Через 48 ч проводили эвтаназию животных и ампутировали опытную и контрольную лапы по коленному суставу. Ампутированные конечности взвешивали на электронных весах. Разница в

массе более 65 мг свидетельствовала о наличии токсина в пробе.

По результатам титрования на животных рассчитывали показатели относительной токсичности проб (по сравнению с контролем) по формуле:

$$OT = Co / Ck \cdot 100 \%,$$

где OT – относительная токсичность; Co – концентрация токсина (титр) в опытной пробе; Ck – концентрация токсина (титр) в контроле.

## Результаты и обсуждение

Полученные данные свидетельствуют (табл. 1), что для специфического энтеросорбента, изготовленного на основе хитозановой матрицы, как и для самой хитозановой матрицы, характерны высокие показатели адсорбционной способности по фармакологическим веществам-маркерам, сопоставимые с показателями таких медицинских энтеросорбционных препаратов как Полисорб и микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) с 11 % пектина [10]. При этом наблюдалось снижение сорбционной активности специфического модификанта при взаимодействии с метиленовой синью на 26 %, желатином – на 61 % по сравнению с хитозановой матрицей за счет иммобилизации иммуноглобулинового лиганда. Следует отметить, что по данным исследований В.И.Решетникова [10] и И.А.Самылиной и соавт. [11], метиленовая синь активнее сорбируется энтеросорбентами с низкой влажностью, а белки – более увлажненными. Подобная зависимость, характерная для различных групп энтеросорбентов, выявлена и при изучении сконструированного препарата и активированной хитозановой матрицы. Сорбционная активность противохолерного энтеросорбента в отношении БСА повышалась на 5 % за счет изменения электрохимических свойств активных поверхностей хитозана и образования дополнительных адсорбционных центров энтеросорбента для белкового маркера.

Для активированных углей существует другая зависимость, что подтверждено нами при исследовании функциональной активности Карболайна. При

Таблица 1

Адсорбционная способность энтеросорбентов по веществам-маркерам

Объект	Влажность, %	Адсорбционная способность, мг/г		
		По альбумину	По желатину	По метиленовой сини
Специфический энтеросорбент	1,23	432,4±5,3	56,0±5,3	149,71±8,5
Хитозан	0,9	410,5±7,8	141,5±7,2	200,36±6,2
Полисорб*	2,3	372,5±7,3	328,2±3,3	47,7±2,9
МКЦ+11 % пектин*	6,0	402,7±6	99,2±10,7	107±9
Карболайн	56,1	44±3,1	46,5±6,3	557,8±4,3
ОУ-А*	6,9	61,6±9,7	46,7±1,2	255,2±9,8
Карбосорб*	28,6	20,4±1,6	40,5±1,3	243,6±6,8

\* Литературные данные.

определении неспецифической сорбционной активности данного энтеросорбента, гранулы которого характеризуются высокой влажностью (до 60 %), установлено, что из всех представленных для сравнения энтеросорбентов он обладает наивысшей сорбционной активностью в отношении низко- и среднемолекулярных веществ и самой низкой активностью в отношении высокомолекулярных сорбатов (белков). Это характерно для всех углеродных энтеросорбентов, применяемых в практике здравоохранения [5].

Результаты определения токсиннейтрализующей активности, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что экспериментальный специфический препарат обладает высокой антитоксической активностью сопоставимой с Карболайном, что отражает величина коэффициента инактивации (КИ) – 8,8 и 8,3 соответственно, обеспечивая значительное снижение показателя относительной токсичности (ОТ) препарата холерного токсина, введенного экспериментальным животным.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены величины функциональной активности экспериментального антитоксического энтеросорбента, исходных микрочастиц хитозана по основным веществам-маркерам. Показано, что сконструированный энтеросорбент проявляет высокую специфическую активность в отношении холерного токсина, при этом хитозановая матрица сохраняет свои неспецифические сорбционные свойства после иммобилизации белкового лиганда.

Результаты исследований дают основание предполагать, что сконструированный антиэнтеротоксический энтеросорбент может рассматриваться как прототип современного эффективного средства для профилактики и лечения холеры.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аленкина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитоксического холерного энтеросорбента. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:66–9.
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А., Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 58 с.
- Беляков Н.А., Соломенников А.В. Энтеросорбция – механизм лечебного действия. *Эфферентная терапия.* 1997; 3(2):22–6.
- Бородин Ю.И., Рачковская Л.Н. Энтеросорбция и энтеросорбенты. *Консилиум.* 2000; 3(13):11–3.
- Гаврилов А.С., Гусельникова Е.В., Петров А.Ю. Технология получения таблеток угля активированного. *Химико-фармацевтический журн.* 2004; 38(1):58–60.
- Исмаилов М.Г., Махкамов Х.М., Исмаилов П.Л. Высокоэффективный углеродный сорбент медицинского назначения из хлопкового лигнина. *Химико-фармацевтический журн.* 2000; 12(34):38–40.
- Онищенко Г.Г. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе. *Журн. микробиол.,*

Таблица 2

#### Показатели антитоксической активности энтеросорбентов

Исследуемый препарат	Показатели антитоксической активности	
	ОТ*, %	КИ**
Специфический энтеросорбент	11,2±2,1	8,8±1,0
Хитозан	85,6±3,3	2,1±0,11
Антитоксические иммуноглобулины	15,3±4,0	6,6±1,0
Карболайн	12,6±2,3	8,3±1,0
Контроль	98±2,5	1,02±1,5

\*ОТ – относительная токсичность;

\*\*КИ – коэффициент инактивации токсина (1/ОТ).

*эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 4:13–23.

8. Пермитина М.И., Попилов А.Н., Ратникова Л.И. Эффективность энтеросорбентов при острых кишечных инфекциях. *Врач.* 2007; 7:22–5.

9. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. С. 264–77.

10. Решетников В.И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм. *Химико-фармацевтический журн.* 2003; 37(5):28–32.

11. Самылина И.А., Баландина И.А. Пути использования растительного сырья и его стандартизация. *Фармация.* 2004; 2:39–41.

#### References

- Alenkina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Prospective sorption matrices for antitoxic cholera enterosorbent constructing]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:66–9.
- Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz, 1962. 58 p.
- Belyakov N.A., Solomennikov A.V. [Enterosorption – the mechanism of curative action]. *Efferentnaya Terapiya.* 1997; 3(2):22–6.
- Borodin Yu.I., Rachkovskaya L.N. [Enterosorption and enterosorbents]. *Konsilium.* 2000; 3(13):11–3.
- Gavrilov A.S., Gusel'nikova E.V., Petrov A.Yu. [Method for the production of the activated carbon pills]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2004; 38(1):58–60.
- Ismailov M.G., Makhkamov Kh.M., Ismailov P.L. [Highly efficient carbon sorbent for medical use, made of cotton lignin]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2000; 12(34):38–40.
- Onishchenko G.G. [Current issues of infectious disease prophylaxis in the modern period]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 4:13–23.
- Permitina M.I., Popilov A.N., Ratnikova L.I. [Effectiveness of enterosorbents in case of acute diarrheal diseases]. *Vrach.* 2007; 7:22–5.
- Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. [Infectious Diseases and Epidemiology]. M.: GEOTAR-Media; 2007. P. 264–77.
- Reshetnikov V.I. [Assessment of the adsorption capacity of enterosorbents and their pharmaceutical forms]. *Khimiko-Farmatsevt. Zh.* 2003; 37(5):28–32.
- Samylin I.A., Balandina I.A. [Approaches to the usage of plant raw material and its standardization]. *Farmatsiya.* 2004; 2:39–41.

#### Authors:

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

Nikolaev V.G., Bardakhivskaya K.I. R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology, and Radiobiology. Kiev, Ukraine.

#### Об авторах:

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

Николаев В.Г., Бардахивская К.И. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины. Украина, Киев.

Поступила 16.06.14.