

www.epidemiyaas.ru

80 лет
Иркутскому
научно-исследовательскому
противочумному институту
Сибири и Дальнего Востока

Главный редактор

Покровский В.И. (академик РАН, д. м. н., профессор)

Заместители главного редактора:

Яковлева Т.В. (д. м. н., профессор)
Акимкин В.Г. (чл.-корр. РАН, д. м. н., профессор)
Михеева И.В. (д. м. н., профессор)

Редакционный совет:

Беляев Е.Н. (д. м. н., профессор)
Брико Н.И. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Грачев В.П. (д. б. н.)
Дроздов С.Г. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Зверев В.В. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Злобин В.И. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Зуева Л.П. (д. м. н., профессор)
Иванов С.И. (д. м. н., профессор)
Киселев О.И. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Львов Д.К. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Медуницын Н.В. (академик РАН, д. м. н., профессор)
Онищенко Г.Г. (академик РАН, д. м. н., профессор)

Редакционная коллегия:

Аксенова В.А. (Москва)
Ананьина Ю.В. (Москва)
Борисова В.Н. (Москва)
Брусина Е.Б. (научный редактор) (Кемерово)
Герасимова А.Г. (Москва)
Горбунов М.А. (Москва)
Горелов А.В. (ответств. секретарь) (Москва)
Даминов Т.А. (Узбекистан)
Иванова О.Е. (Москва)
Колесникова И.П. (Украина)
Комбарова С.Ю. (Москва)
Коренберг Э.И. (Москва)
Королева И.С. (Москва)
Костинов М.П. (научный редактор) (Москва)
Крамер А. (Германия)
Чу З. (Китай)
Кузин С.Н. (Москва)
Кузнецова М.В. (секретарь редакции) (Москва)
Мельник А.А. (Молдавия)
Наттелл П.А. (Великобритания)
Нимадава П. (Монголия)
Непесова Б.Б. (Туркменистан)
Огарков П.И. (Санкт-Петербург)
Ружек Д. (Чехия)
Саардак А.М. (шеф-редактор) (Москва)
Савилов Е.Д. (Иркутск)
Садовникова В.Н. (Москва)
Селькова Е.П. (Москва)
Семенов Т.А. (Москва)
Соминина А.А. (Санкт-Петербург)
Сухинин М.В. (Москва)
Филатов Н.Н. (Москва)
Фролова Н.В. (Москва)
Хан Х. (Германия)
Харит С.М. (Санкт-Петербург)
Чикун В. (Молдавия)
Шмелева Е.А. (Москва)
Юминова Н.В. (Москва)

Editor-in-Chief

Pokrovsky V.I.

Deputies editor-in-chief:

Yakovleva T.V.
Akimkin V.G.
Mikheeva I.V.

Editorial Board:

Belyaev E.N.
Briko N.I.
Grachyov V.P.
Drozdov S.G.
Zverev V.V.
Zlobin V.I.
Zueva L.P.
Ivanov S.I.
Kiselyov O.I.
L'vov D.K.
Medunicin N.V.
Onishchenko G.G.

Editorial Council:

Aksyonova V.A. (Moscow)
Ananyina Yu.V. (Moscow)
Borisova V.N. (Moscow)
Brusina E.B. (science editor) (Kemerovo)
Gerasimova A.G. (Moscow)
Gorbunov M.A. (Moscow)
Gorelov A.V. (academic secretary) (Moscow)
Daminov T.A. (Uzbekistan)
Ivanova O.E. (Moscow)
Kolesnikova I.P. (Ukraine)
Kombarova S.Yu. (Moscow)
Korenberg E.I. (Moscow)
Korolyova I.S. (Moscow)
Kostinov M.P. (science editor) (Moscow)
Kramer A. (Germany)
Qu Z. (China)
Kuzin S.N. (Moscow)
Kuznetsova M.V. (secretary) (Moscow)
Mel'nik A.A. (Moldova)
Nuttall P.A. (UK)
Nimadava P. (Mongolia)
Nepesova B.B. (Turkmenistan)
Ogarkov P.I. (St. Petersburg)
Ruzek D. (Czech Republic)
Saardak A.M. (chief-editor) (Moscow)
Savilov E.D. (Irkutsk)
Sadovnikova V.N. (Moscow)
Sel'kova E.P. (Moscow)
Semenenko T.A. (Moscow)
Sominina A.A. (St. Petersburg)
Suhinin M.V. (Moscow)
Filatov N.N. (Moscow)
Frolova N.V. (Moscow)
Hahn H. (Germany)
Harit S.M. (St. Petersburg)
Chiku V. (Moldova)
Shmelyova E.A. (Moscow)
Yuminova N.V. (Moscow)

Журнал входит в перечень изданий, которые рекомендованы ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С требованиями к статьям авторы могут ознакомиться на сайте: www.epidemvac.ru.

Полная версия журнала в электронном виде доступна на сайте Российской электронной библиотеки (www.elibrary.ru).

ISSN 2073-3046

В НОМЕРЕ

ЮБИЛЕЙ

- Поздравление руководителя Роспотребнадзора,
Главного государственного санитарного врача
Российской Федерации А.Ю. Поповой 4
- Иркутскому научно-исследовательскому
противочумному институту
Сибири и Дальнего Востока – 80 лет
С.В. Балахонов, А.Г. Трухина,
М.В. Чеснокова, В.М. Корзун 6

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

- Полногеномный анализ однонуклеотидных
полиморфизмов в изучении молекулярной
эпидемиологии холеры и эволюционной
истории возбудителя
Л.В. Миронова, С.В. Балахонов 10
- Связь холерного вибриона
с водными организмами
и ее значение в эпидемиологии холеры
Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович,
Е.Ю. Марков с соавт. 19
- Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым
инфекциям и сибирской язве
на территориях Приамурья, пострадавших
от паводка 2013 года, и прогноз на 2014 год
А.К. Носков, С.В. Балахонов,
З.Ф. Дугаржапова с соавт. 26
- Характеристика штамма вируса клещевого энцефалита
сибирского подтипа, изолированного от пациента
с прогрессивным течением болезни
Е.И. Андаев, С.И. Беликов, Н.В. Кулакова с соавт. 31
- Связь манифестных случаев клещевого вирусного
энцефалита с некоторыми демографическими,
социальными и экологическими факторами
О.В. Мельникова, Е.И. Андаев 37
- Основные особенности эпидемиологии
клещевого риккетсиоза в Забайкальском крае
А.К. Носков, А.О. Туранов, Е.И. Андаев 45
- Актуальные вопросы эпиднадзора
за лептоспирозами в Иркутской области
Е.Ю. Киселева, Н.В. Бренева,
М.Б. Шаракшанов с соавт. 51
- Потенциальная опасность мяса птицы
как фактора передачи кишечного иерсиниоза
Т.В. Каримова, В.Т. Климов, М.В. Чеснокова,
М.Б. Черепанова 57
- Апробация диагностических тест-систем
с использованием наночастиц серебра в качестве
маркеров специфических антител для скрининга
исследуемого материала на наличие антигенов

- возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии
и ботулотоксина в дот-иммуноанализе
Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов,
Е.Ю. Марков с соавт. 61
- Сравнительная оценка методов детекции
ботулотоксина в клиническом материале
от больных людей
Т.Ю. Загоскина, С.В. Балахонов,
Е.А. Чапоргина с соавт. 65

ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА

- Оценка морфологических изменений в органах
белых мышей под действием экспериментальных
препаратов *Brucella abortus*
Т.П. Старовойтова, С.А. Витязева,
В.И. Дубровина с соавт. 69
- Результаты изучения иммуногенной активности
клеточных оболочек *Francisella tularensis*
разных подвидов (сообщение 1)
А.В. Корнева, В.Б. Николаев,
К.Ю. Ястремская с соавт. 73
- Результаты исследования действия антигенного
препарата *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne
в сочетании с кобальт-арабиногалактаном
на активацию и апоптоз клеток крови *in vitro*
В.И. Дубровина, В.В. Войткова,
С.В. Лукьянова с соавт. 78
- Оценка иммуномодулирующих свойств
субклеточных фракций чумного микроба
в сочетании с адьювантами
В.В. Войткова, В.И. Дубровина,
С.А. Витязева с соавт. 83

ПРАКТИКА ВАКЦИНАЦИИ

- Вакцинация детей с хроническими
заболеваниями почек
М.П. Костинов, А.А. Тарасова 89

АНОНС

- Всероссийская научно-практическая конференция
с международным участием «Актуальные вопросы
обеспечения противоэпидемических мероприятий
в зоне чрезвычайных ситуаций». 23 – 24 сентября
2014 года, г. Иркутск 56
- Выход в свет монографии «Обеспечение санитарно-
эпидемиологического благополучия населения
при ликвидации последствий наводнения
на Дальнем Востоке»..... 77

ПОЗДРАВЛЕНИЯ 82, 88

ERRATA 50

К АВТОРАМ 92



IN SERIES

ANNIVERSARY

Congratulations of Head of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, of Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation Anna Y. Popova	4
Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East – 80 years	6

EPIDEMIOLOGY

Whole-Genome Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in Study of Cholera Molecular Epidemiology and Agent Evolutionary History L.V. Mironova, S.V. Balakhonov	10
Relationship of <i>Vibrio Cholerae</i> with Water Organisms and its Significance in Cholera Epidemiology E.S. Kulikalova, L.Ya. Urbanovich, E.Yu. Markov et al.	19
Epidemiological Situation for Natural-Focal Infections and Anthrax in Fore-Amur Territories Suffered from a High Water in 2013 and the Forecast for 2014 A.K. Noskov, S.V. Balakhonov, Z.F. Dugarzhapova et al.	26
Characterization of a Tick-Borne Encephalitis Virus of the Siberian Subtype Strain Isolated from a Patient with Chronic Disease E.I. Andaev, S.I. Belikov, N.V. Kulakova et al.	31
The Manifest Tick-Borne Encephalitis Cases and their Relationship with Some Demographic, Social and Ecological Factors O.V. Mel'nikova, E.I. Andaev	37
Main Features of the Epidemiology of Tick-Borne Rickettsiosis in the Trans-Baikal Territory A.K. Noskov, A.O. Turanov, E.I. Andaev	45
Actual Problems of Epidemiological Surveillance for Leptospiroses in Irkutsk Region E.Yu. Kiseleva, N.V. Breneva, M.B. Sharakshanov et al.	51
Potential Danger of Fowl Meat as a Factor of Intestinal Yersiniosis Transmission T.V. Karimova, V.T. Klimov, M.V. Chesnokova, M.B. Cherepanova	57
Approbation of Diagnostic Test-Systems with Use of Silver Nano-Particles as Markers of Specific Antibodies for Screening of the Investigated Material for Presence	

of Antigens of Plague, Brucellosis, Tularemia Causative Agents and Botulotoxin in Dot-Immunoassay T.Yu. Zagoskina, S.V. Balakhonov, E.Yu. Markov et al.	61
Comparative Estimation of Methods for Botulotoxin Detection in Clinical Material from Patients T.Yu. Zagoskina, S.V. Balakhonov, E.A. Chaporgina et al.	65

VACCINAL PREVENTION

Estimation of Morphological Alterations in White Mice Organs under the Influence of Experimental <i>Brucella Abortus</i> Preparations T.P. Starovojtova, S.A. Vityazeva, V.I. Dubrovina et al.	69
Results of the Study of the Immunogenic Activity of Cellular Membranes <i>Francisella tularensis</i> Different Subspecies (1. report) A.V. Korneva, V.B. Nikolaev, K.Yu. Yastremskaya et al.	73
Influence of <i>Bacillus Anthracis</i> 34F ₂ Sterne Antigen Preparations in Combination with Cobalttarabinogalactan on the apoptosis blood cells <i>in vitro</i> V.I. Dubrovina, V.V. Voytkova, S.V. Lukyanova et al.	78
Assessment of Immunomodulating Properties of Yersinia Pestis Subcellular Fractions In Combination with Adjuvants V.V. Voytkova, V.I. Dubrovina, S.A. Vityazeva et al.	83

VACCINAL PRACTICE

Vaccination of Children with Chronic Kidney Disease M.P. Kostinov, A.A. Tarasova	89
---	----

ANNOUNCEMENT

All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Current Issues of Anti-Epidemic Measures in the Area of Emergency». September 23 - 24, 2014, Irkutsk.....	56
Monograph Published: «Ensuring of Sanitary and Epidemiological Welfare of the Population in the Aftermath of Flooding in the Far East»	77

CONGRATULATIONS	82, 88
------------------------------	--------

ERRATA	50
---------------------	----

FOR AUTHORS	92
--------------------------	----

Издатель: ООО «Анториум».

Макет и верстка – О.Н. Крайнова. Корректоры – Л.В. Забродина, С.В. Никитина, Т.Д. Паршина

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 10.10.2000 г. (№ 011096). Тираж: 2500 экз.

Подписной индекс журнала на 2014 г.: 20140 в каталоге Роспечати.

Адрес для корреспонденции: 115162, г. Москва, а/я 49,

редакция журнала «Эпидемиология и Вакцинопрофилактика»;

тел./факс: (495) 626-84-01. E-mail: epidemvac@pochta.ru, epidemvac@yandex.ru.

Сайты: www.epidemvac.ru, www.epidemvac.ru/en/



Уважаемые коллеги!

5 июня 2014 года Иркутскому ордену Трудового Красного Знамени научно-исследовательскому противочумному институту Сибири и Дальнего Востока исполнилось 80 лет.

Формирование противочумной службы на территории Сибири и Дальнего Востока началось с организации Читинской противочумной лаборатории (1913 г.), основной задачей которой было недопущение распространения чумы из Забайкалья в соседние регионы. Эпидемические события по чуме и холере в 20 – 30-х годах прошлого столетия и обширность обслуживаемой территории потребовали создания разветвленной сети противочумных учреждений в Забайкалье и на Дальнем Востоке. Постановлением Наркомздрава РСФСР в г. Иркутске в 1923 году была учреждена противочумная лаборатория, которую возглавил профессор Алексей Михайлович Скородумов. Эта лаборатория стала центром, координирующим борьбу с чумой и другими заразными болезнями, местом проведения научно-исследовательских работ по изучению чумы и подготовке кадров для противочумных учреждений региона. Впоследствии Иркутская противочумная лаборатория по инициативе А.М. Скородумова была преобразована в институт (1934 г.). Это явилось завершающим этапом организации противочумной службы в Сибири и на Дальнем Востоке. Она объединила специализированный институт, противочумные станции (г. Чита, г. Хабаровск), противочумные отделения, а также противочумный поезд – прообраз специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) Роспотребнадзора.

За свою долгую историю Институт прошел путь от небольшой противочумной лаборатории до мощного многопрофильного научно-исследовательского противоэпидемического учреждения. На этом пути им был оздоровлен Забайкальский природный очаг чумы; открыты Горно-Алтайский и Тувинский природные очаги чумы, очаги бруцеллеза северных оленей; выявлены очаги туляремии, лептоспирозов, иерсиниозов, клещевого энцефалита и других арбовирусных инфекционных болезней; составлена карта распространения сибирской язвы на территории Восточной Сибири и Дальнего Востока; установлены особенности сохранения холерного вибриона в водной экосистеме региона; выделены два таксономически самостоятельных подвида чумного микроба; впервые обнаружены новые плазмидоварианты *Y. pestis*. Созданная в 1940-х годах Н.А. Гайским туляремиальная вакцина остается востребованной и сегодня.

В настоящее время в Институте активно идет процесс материально-технического перевооружения, что делает возможным развивать и внедрять в практику современные молекулярно-генетические, иммунологические, протеометрические методы лабораторных исследований. Это позволило получить новые данные о полной структуре геномов вируса клещевого энцефалита, бешенства, холерного вибриона и псевдотуберкулезного микроба. При эпидемиологической диагностике активно применяются ПЦР в режиме реального времени, методы VNTR-типирования, MLVA-анализ и MALDI-ToF-масс-спектрометрия.

Сотрудники Института успешно разрабатывают субъединичные вакцины нового поколения против холеры, чумы и сибирской язвы, а также диагностические тест-системы

с использованием наночастиц коллоидного золота/серебра для обнаружения бруцелл, ботулотоксина, возбудителя чумы.

Одним из приоритетных направлений в Институте является научно-методическое обеспечение совершенствования санитарной охраны территории страны. Продолжается оптимизация эпидемиологического надзора и системы прогнозирования эпизоотической ситуации по чуме, другим природно-очаговым инфекционным болезням на основе внедрения в мониторинг популяционных и фенотипических подходов, ГИС-технологий и математического анализа. Завершен первый этап реконструкции научно-производственной базы Института и начат процесс ее насыщения высокотехнологическим оборудованием, позволяющим выйти на качественно новый уровень производства профилактических и диагностических препаратов.

Значительное место в деятельности Института занимает оперативная работа. В рамках единой системы эпидемиологического надзора на базе Института эффективно функционируют Референс-центр по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекций, Региональный центр по мониторингу возбудителей I – II групп патогенности и Центр индикации возбудителей инфекционных болезней. Специалисты Института на постоянной основе принимают участие в противозидемическом сопровождении крупных новостроек на территории Сибири и Дальнего Востока.

Потенциал модернизированных в соответствии с Правительственной программой СПЭБ Института позволил обеспечить санитарно-эпидемиологическое благополучие населения при проведении саммита АТЭС-2012 года во Владивостоке и при чрезвычайных ситуациях в Приамурье (2013 г.), в Республиках Алтай и Хакасия, Алтайском крае (2014 г.).

Выражаю уверенность, что и в будущем коллектив Института будет развивать и укреплять свой творческий научный потенциал, направленный на совершенствование эпидемиологического надзора и профилактики опасных инфекционных болезней; разрабатывать и производить современные иммунобиологические и диагностические препараты; развивать научные и практические связи с учреждениями Роспотребнадзора, фундаментальной науки как внутри страны, так и за рубежом; обеспечивать санитарно-эпидемиологическую безопасность населения нашей страны как в повседневной жизни, так и в условиях стихийных бедствий и антропогенных катастроф, в том числе – актов биотерроризма.

**Желаю всему коллективу Института успехов
в профессиональной деятельности,
уверенности в будущем,
крепкого здоровья и семейного благополучия!**

*Руководитель Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор*

А.Ю. ПОПОВА

**Коллектив журнала поздравляет
Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противо-
чумный институту Сибири и Дальнего Востока
со славным юбилеем!**

**Желаем дальнейшего процветания на ниве отечественной науки
и надеемся на дальнейшее сотрудничество!**

Редакционный совет и редколлегия журнала

Иркутскому научно-исследовательскому противочумному институту Сибири и Дальнего Востока – 80 лет

С.В. Балахонов (adm@chumin.irkutsk.ru), А.Г. Трухина, М.В. Чеснокова, В.М. Корзун

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзор

Резюме

В статье представлены история создания и основные вехи деятельности Иркутского научно-исследовательского противочумного института с момента его основания по настоящее время.

Ключевые слова: Иркутский научно-исследовательский противочумный институт

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East – 80 years

S.V. Balakhonov (adm@chumin.irkutsk.ru), A.G. Truhina, M.V. Chesnokova, V.M. Korzun

Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

The article presents the history of Irkutsk Antiplague Research Institute and milestones of scientific activity since its founding to the present.

Key words: Irkutsk Antiplague Research Institute

Иркутскому ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательскому противочумному институту Сибири и Дальнего Востока исполнилось 80 лет.

Институт был учрежден Приказом Уполномоченного Совета труда и обороны при Совете народных комиссаров СССР от 5 июня 1934 года № 1 как научно-оперативный орган по борьбе с чумой. Его основателем и первым руководителем был выдающийся эпидемиолог-микробиолог профессор Алексей Михайлович Скородумов. По его инициативе была создана противочумная система Сибири и Дальнего Востока, включившая Институт, противочумные станции в Чите и Хабаровске, противочумные отделения, противочумный поезд; развернута работа по подготовке квалифицированных врачей-чумологов и биологов; начато строительство научно-лабораторного комплекса, организовано издание научных трудов. К сожалению, творческая деятельность А.М. Скородумова оборвалась в 1937 году, когда он был арестован по ложному обвинению, осужден как участник диверсионно-террористической организации и 14 апреля 1939 года приговорен к расстрелу. Реабилитирован Алексей Михайлович был посмертно 20 октября 1959 года.

После А.М. Скородумова Институт возглавляли: Ф.Ф. Бугайчук (1938 – 1940 гг.), В.Н. Тер-Вартанов (1940 – 1941 гг.), Н.И. Макаров (1941 – 1945 гг.), Н.Т. Быков (1945 – 1948 гг.), Н.Д. Алтарева (1948 – 1957 гг.), И.В. Домарадский (1957 – 1964 гг.), М.И. Анциферов (1964 – 1965 гг.), А.Д. Сафоно-

ва (1965 – 1978 гг.), Е.П. Голубинский (1978 – 2008 гг.). С 2008 года Институтом руководит доктор медицинских наук, профессор С.В. Балахонов.

В сферу ответственности Института кроме чумы вошли и другие опасные инфекционные болезни – холера, бруцеллез, туляремия, сибирская язва, лептоспироз, арбовирусные инфекции.

В годы Великой Отечественной войны, несмотря на то что многие сотрудники ушли на фронт и отсутствовали нужное оборудование, лабораторная посуда и сырье, Институт приступил к производству препаратов для лечения и профилактики чумы (вакцина, противочумная сыворотка), холерной вакцины, питательных сред. В эти тяжелые годы продолжалось дальнейшее изучение Забайкальского природного очага чумы, иммунитета и вакцинального процесса при туляремии, проводились противоэпидемические мероприятия в Бурят-Монгольской АССР, Читинской и Иркутской областях, Монголии. Крупным достижением военных лет стали разработка и апробация в больших коллективах живой туляремийной вакцины. Исследования возглавил талантливый ученый, организатор, опытный исследователь Н.А. Гайский, который за эту работу был удостоен Государственной (Сталинской) премии. Нельзя не назвать сотрудников, внесших значительный вклад в успехи Института в годы Отечественной войны, – это Н.Д. Алтарева, В.В. Донсков, Н.Д. Емельянова, Г.С. Летов, И.П. Бром, А.В. Коротаева, З.М. Вовчинская, В.С. Колесник и многие другие.

В послевоенные годы в коллектив пришли Л.А. Тимофеева, И.Ф. Жовтый, А.Ф. Пинигин, Л.Е. Хунданов, Р.С. Колесник, М.И. Анциферов, В.А. Краминский, Г.Г. Коробков, ставшие вскоре ведущими специалистами и возглавившие перспективные направления научной и практической деятельности Института. В эти годы были открыты противочумные отделения в Тувинской АССР (г. Кызыл) и Горно-Алтайской автономной области (г. Горно-Алтайск).

Плодотворной была деятельность Института и в последующие годы XX века. Были обнаружены Горно-Алтайский (Сайлюгемский, 1961 г.) и Тувинский (1964 г.) природные очаги чумы, изучены их пространственная и биоценотическая структура, особенности экологии носителей и переносчиков, биологические и культурально-морфологические свойства возбудителя чумы, определены основные закономерности протекания эпизоотического процесса. Выполнены экспериментальные исследования по изучению восприимчивости и чувствительности носителей к чумному микробу, отслежены взаимоотношения возбудителя чумы и блох массовых видов, определена эпизоотологическая роль отдельных видов блох.

Впервые выявлены очаги бруцеллеза северных и пятнистых оленей, маралов, яков, инфекционного эпидидимита баранов. Установлена природная очаговость бруцеллеза в районах Крайнего Севера. Проведена типизация природных очагов туляремии Сибири и Дальнего Востока.

Изучена этиологическая, биоценотическая, пространственная структура природных очагов вируса клещевого энцефалита (КЭ) в Сибири и на Дальнем Востоке, в отдельных регионах Монголии; выделен и изучен штамм Айна/1448, признанный прототипом самостоятельного сибирского подтипа вируса КЭ. Впервые в Прибайкалье выделен вирус Инко, установлено существование природных очагов ГЛПС, Гета, Батаи, показана их роль в формировании региональной патологии и иммуноструктуры населения. Проведен приоритетный цикл работ по изучению биологических свойств и диагностике вирусов Марбурга и Эбола. Расшифрована вспышка массовой гибели байкальской нерпы, вызванная морбилливирусом.

Сотрудниками Института выполнены масштабные экспериментальные исследования по экологии возбудителей холеры, бруцеллеза, сибирской язвы, арбовирусных инфекций, в ряде случаев максимально приближенные к естественным условиям, и показана их роль в формировании региональной патологии и иммуноструктуры населения.

Разработаны и внедрены в практику: сухие питательные среды на основе мясных, казеино-дрожжевых гидролизатов для диагностики и дифференциации возбудителей опасных инфекционных болезней; иммуноферментный (чума, холера, туляремия, бруцеллез, сибирская язва), иммунофлуоресцентный (сибирская язва) и иммуноэритроадсорбционный

(бруцеллез) методы; клеточный вариант ИФА для выявления антител к вирусу клещевого энцефалита, ДОТ-иммуноанализ с использованием антител или антигенов, меченных коллоидными металлами и углеродом, для диагностики чумы, бруцеллеза, туляремии, ботулизма. Сконструированы цветные туляремийный и бруцеллезный диагностикумы сухие. С применением молекулярно-биологических методов ДНК-ДНК-гибридизации, генного зондирования и ПЦР-генотипирования выполнены исследования по таксономии возбудителей опасных инфекционных болезней. Впервые выявлены дополнительные маркерные плазмиды чумного микроба, ассоциированные с определенными природными очагами. Получен иммуногенный препарат клеточных мембран холерного вибриона, раскрыты индуцируемые им механизмы и закономерности формирования естественной резистентности организма, и на этой основе разработаны пути эффективной иммунизации, проведена серия работ по конструированию вакцинных препаратов против чумы и бруцеллеза. Исследованы клеточные, гуморальные, эндокринные факторы иммунитета при чуме, туляремии, псевдотуберкулезе.

В настоящее время Институт – многопрофильное научно-исследовательское и противоэпидемическое учреждение, обеспечивающее совместно с центрами гигиены и эпидемиологии, управлениями Роспотребнадзора и противочумными станциями эпидемиологическое благополучие по опасным зоонозным и природно-очаговым инфекционным болезням бактериальной и вирусной этиологии в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах.

В стенах Института трудятся 81 научный сотрудник, из них 12 докторов и 41 кандидат наук. Активно развиваются направления исследований, связанные с изучением молекулярно-биологических и протеометрических характеристик, генодиагностики, таксономии, генетического разнообразия и изменчивости возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, вирусов КЭ, бешенства и других опасных инфекционных болезней, на основе современных молекулярно-генетических (ПЦР в реальном времени, полногеномное и фрагментарное сиквенс-типирование), иммунологических (иммуно-блоттинг) методов и протеомного анализа (MALDI-ToF-масс-спектрометрия). Показана возможность использования нанокомпозитов для повышения эффективности специфической профилактики инфекционных болезней.

Совместно со специалистами противочумных станций совершенствуется эпизоотический мониторинг природных очагов чумы Сибири. При изучении энзоотии этой инфекции используется популяционный подход, основанный на представлении о неравнозначности популяций и отдельных структурно-функциональных группировок носителей и переносчиков для циркуляции возбудителя чумы. Именно применение популяционного под-

хода как тактического приема направленного поиска возбудителя позволило обнаружить ряд новых эпизоотических участков в Горно-Алтайском и Тувинском природных очагах чумы. Комплексное изучение структуры отдельных компонентов паразитоценозов сибирских природных очагов чумы, ее пространственной и временной трансформации способствует выяснению основных закономерностей эпизоотического процесса, оптимизации мониторинга очагов, прогнозированию эпизоотической ситуации, научному обоснованию принципов профилактики чумы.

Приоритетные научные исследования, осуществляемые в Институте, направлены на совершенствование системных основ санитарной охраны территории, межведомственного взаимодействия, тактики применения и организации работы специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) в различных условиях функционирования. Кроме того, оптимизируются методы оценки и прогнозирования эпизоотического потенциала природных очагов опасных инфекционных болезней. Постоянно ведутся работы по совершенствованию методов лабораторной диагностики; продолжается изучение биохимии возбудителей, патогенеза и иммунологии опасных зоонозных и других природно-очаговых инфекций; разрабатываются вопросы противодействия биологическому терроризму и обеспечения биологической безопасности, стратегии и тактики неспецифической профилактики природно-очаговых болезней. Впервые начата регистрация изделий медицинского назначения – диагностических медицинских иммунобиологических препаратов и питательных сред, совершенствуется технология их производства.

На базе Института в 1969 году созданы три специализированные противозидемические бригады, которые за время своего существования с привлечением оперативных групп ведущих специалистов участвовали в ликвидации последствий 51-й чрезвычайной ситуации (ЧС) эпидемиологического характера, провели в 60 – 90-х годах прошлого века противозидемические и профилактические мероприятия в очагах холеры (Средняя Азия, Поволжье, Черноморское побережье, Украина, Западная Сибирь), сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, псевдотуберкулеза (Западная и Восточная Сибирь), в ситуациях с завозными случаями с подозрением на чуму (Новосибирская область, Красноярский край).

Во исполнение решений саммита Большой восьмерки (Санкт-Петербург, 2006 г.), в целях повышения эффективности мероприятий, направленных на борьбу с инфекционными болезнями, Распоряжением Правительства РФ от 21.05.2007 года № 642р модернизирована материально-техническая база СПЭБов на основе пневмокаркасных модулей и автошасси, что позволяет разнообразить тактику их применения. Современные СПЭБы успешно зарекомендовали себя при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия на-

селения в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012 (г. Владивосток, 2012 г.) и во время ЧС, вызванной дождевым паводком в Приамурье в 2013 году.

Институт выполняет функции:

- Референс-центра по мониторингу природно-очаговых инфекций бактериальной и вирусной этиологии;
- Регионального центра по мониторингу возбудителей инфекционных болезней I – II групп патогенности;
- Центра индикации и лабораторной диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней;
- Центра генной диагностики.

Институт успешно сотрудничает с противочумными учреждениями страны и другими научными организациями: ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (пос. Оболенск Московской области), Институтом эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург), Центральным НИИ эпидемиологии, Институтом полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, НИИ дезинфектологии, Лимнологическим институтом (г. Иркутск), Хабаровским институтом эпидемиологии и микробиологии, Всероссийским НИИ бруцеллеза и туберкулеза животных.

Институт поддерживает научные связи: с КНР – по изучению природно-очаговых инфекционных болезней на приграничных территориях России и Китая; с Национальным центром зоонозных инфекций Министерства здоровья Монголии и Казахским научным центром карантинных и зоонозных инфекций им. Масгута Айкимбаева – по мониторингу энзоотических по чуме сопредельных территорий двух стран; с Университетом Париж-Юг XI-Орсэй (Франция) по изучению генетического разнообразия и эволюции патогенных иерсиний.

С момента организации в 1938 году отдела подготовки и усовершенствования специалистов Институт проводит профессиональную подготовку врачей (биологов) и лаборантов по программам дополнительного профессионального образования для учреждений Роспотребнадзора, лечебной и ветеринарной служб, противочумной службы Монголии. Всего подготовлено более 6000 специалистов, в том числе 60 монгольских врачей.

На базе Института проходят производственную практику врачи-интерны, выполняют дипломные и курсовые работы студенты вузов, активно работает Совет молодых ученых и специалистов.

В последние годы проведены реконструкция помещений и оснащение современным оборудованием научных, научно-оперативных отделов (лабораторий) и научно-производственного отдела.

Институт имеет лицензии на право осуществления образовательной деятельности в сфере профессионального образования; деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний; медицинской деятельности; а также: Серти-

фикат аккредитации ИЛЦ; Свидетельство об аккредитации «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения; обеспечение защиты прав потребителей и потребительского рынка»; аккредитацию на научно-техническую компетенцию и независимость для разработки нормативных и методических документов по разделу «эпидемиология».

За годы существования Института его сотрудники участвовали в противоэпидемическом сопровождении крупнейших новостроек Сибири, в том числе Ангарской ГЭС, Байкало-Амурской магистрали, Накынского рудного поля, железнодорожной трассы Нерюнгри–Якутск, Томмотского транспортного узла и Талаканского нефтяного месторождения в Республике Саха (Якутия), газонефтепровода Сахалин-2, Богучанской ГЭС, объектов саммита Большой восьметки на острове Русский (г. Владивосток).

Сотрудниками Института опубликовано 33 монографии, более 5000 научных работ, подготовлено

свыше 300 нормативно-методических документов, получено 102 авторских свидетельства и патента на изобретения и полезные модели, защищено 147 кандидатских и 30 докторских диссертаций.

За заслуги в противоэпидемической, научно-исследовательской и научно-производственной работе в 1984 году Институт награжден орденом Трудового Красного Знамени.

Формат статьи не позволяет отразить все достижения Института за 80 лет его существования и перечислить имена всех выдающихся ученых и специалистов, среднего и младшего персонала, работников административно-хозяйственной части и бухгалтерии, которые плодотворно трудились и способствовали развитию научной и научно-практической деятельности учреждения и противочумной службы Сибири и Дальнего Востока по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения. ■

**Основатель и первый директор Иркутского противочумного института
доктор медицинских наук, профессор
Алексей Михайлович СКОРОДУМОВ (в центре)
с выпускниками первых курсов
подготовки врачей по особо опасным инфекциям (1936 г.)**



Полногеномный анализ однонуклеотидных полиморфизмов в изучении молекулярной эпидемиологии холеры и эволюционной истории возбудителя

Л.В. Миронова (mironova-lv@yandex.ru), С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

Интенсивное развитие технологий полногеномного секвенирования в последние годы обеспечило возможность эффективного генотипирования микроорганизмов на основе детекции в геноме однонуклеотидных полиморфизмов – SNP (от англ. single nucleotide polymorphisms). Такой подход характеризуется достаточно высокими информативностью, точностью, скоростью и разрешающей способностью.

В обзоре представлены общие характеристики SNP-типирования, а также основные направления и результаты его применения в молекулярной эпидемиологии, филогенетическом анализе, реконструкции эволюционных событий и выяснении направлений дивергенции возбудителя холеры. Рассмотрены вопросы установления с применением полногеномного SNP-типирования происхождения и родства пандемических клонов возбудителя холеры, закономерностей эволюционных преобразований и распространения этиологического агента седьмой пандемии, вероятных путей заноса и генетической гетерогенности клона *Vibrio cholerae*, обусловившего эпидемические осложнения в странах Карибского бассейна.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, однонуклеотидные полиморфизмы, высокопроизводительное полногеномное секвенирование, филогения, эволюция, молекулярная эпидемиология

Whole-Genome Analysis of Single-Nucleotide Polymorphisms in Study of Cholera Molecular Epidemiology and Agent Evolutionary History

L.V. Mironova (mironova-lv@yandex.ru), S.V. Balakhonov

Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

In recent years intensive development of whole-genome sequencing technologies has provided a possibility of effective microorganism genotyping on a basis of Single Nucleotide Polymorphisms detection (SNPs) in a genome. Such approach is characterized by enough high information value, accuracy, rate and resolution.

In the review general characteristics of SNP-typing and also the basic directions and results of its application in molecular epidemiology, phylogenetic analysis, reconstruction of evolutionary events and identification of *Vibrio cholerae* divergence directions are presented. Problems of an origin determination using whole genome SNP-typing and relationship of pandemic *V. cholerae* clones, patterns of evolutionary transformations and distribution of the seventh pandemic etiological agent, probable ways of importation and genetic heterogeneity of the *V. cholerae* clone caused epidemic complications in the Caribbean countries are considered.

Key words: *Vibrio cholerae*, single-nucleotide polymorphisms, high-throughput whole-genome sequencing, phylogeny, evolution, molecular epidemiology

В основе эволюции микроорганизмов лежит уникальная пластичность их геномов. Генетические преобразования (мутации, геномные перестройки, горизонтальный перенос генетической информации), происходящие в гетерогенных микробных популяциях под воздействием окружающей среды, приводят к дивергенции дочерних линий и формированию новых, в том числе высокопатогенных, клонов микроорганизмов [1 – 3]. Один из распространенных вариантов геномных перестроек – точечные мутации, возникающие в

процессе репликации ДНК и заключающиеся в замене одного нуклеотида на другой, – так называемые нуклеотидные замены [4, 5]. Нуклеотидные позиции в геноме, для которых в популяции установлены варианты (обусловленные заменой нуклеотидов), получили название однонуклеотидных полиморфизмов – SNP (от англ. single nucleotide polymorphisms), а метод молекулярного типирования на основе анализа таких полиморфизмов – SNP-генотипирование. При этом основным критерием для отнесения нуклеотидной вариации к SNP

является частота встречаемости варибельной аллели в популяции. Она должна составлять 1% и более [6], аллели с более низкой частотой встречаемости обозначаются как редкие мутации (вариации). Тем не менее чаще всего этим критерием пренебрегают и все выявленные при анализе генома вариации нуклеотидов относят к SNP.

Однонуклеотидные полиморфизмы характеризуются достаточно высокой плотностью в геноме, что служит одним из критериев эффективности их использования в молекулярном типировании для оценки популяционного разнообразия, выяснения закономерностей эволюции и филогенетического родства изучаемых объектов. Так, установлено, что в геноме человека встречается в среднем один полиморфизм на 1000 пар оснований [7, 8], для генома микроорганизмов характерна более высокая плотность SNP [9]. Однако очень высокая плотность SNP в определенных участках генома может свидетельствовать о рекомбинационном происхождении данной области, что соответственно снижает эффективность использования скрининга нуклеотидной варибельности локуса при филогенетическом анализе. Для SNP-генотипирования микроорганизмов рекомендуется использовать полиморфизмы, локализованные в консервативной части генома, которые встречаются с плотностью менее одного на 300 оснований [9]. В то же время в оперативном эпидемиологическом анализе при выяснении закономерностей распространения возбудителя высокоинформативными могут оказаться выявление и характеристика однонуклеотидных замен – независимо от их локализации в геноме. При этом SNP-генотипирование максимально эффективно в расследовании вспышек, обусловленных патогенами, для которых характерна высокая скорость накопления геномных вариаций в популяции [10]. Так, при молекулярно-эпидемиологическом анализе вспышки, вызванной карбапенем-резистентным клоном *Klebsiella pneumoniae* в Клиническом центре Национального института здоровья США в 2011 году, полногеномное SNP-типирование позволило провести реконструкцию путей распространения возбудителя и установить три независимых направления передачи инфекции от одного источника. При этом часть SNP, имеющих дифференцирующее значение, оказалась локализована в структуре генов резистентности к антибактериальным препаратам [11].

Другим критерием, определяющим возможность использования однонуклеотидных полиморфизмов в качестве маркеров для молекулярного типирования и эволюционного анализа, является их стабильность в геноме исследуемого объекта. Установлено, что SNP имеют достаточно низкий уровень мутаций на поколение ($\sim 10^{-8}$) [12]. Стабильность сохранения SNP в популяции связана с их локализацией. Расположение замены в кодирующей области генома повышает вероятность элиминации особи с данной мутацией из популя-

ции. При этом высокому селективному давлению подвержены так называемые несинонимичные замены, приводящие к замене кодируемой триплетом аминокислоты, а также нонсенс-мутации, в результате которых происходит замена триплета с кодирующего на стоп-кодон [4, 13]. Синонимичные нуклеотидные замены и SNP в некодирующей области генома характеризуются большей стабильностью и более распространены в сравнении с другими видами замен: в среднем, по опубликованным данным, SNP в некодирующих областях составляют 50%, а синонимичные в кодирующих – 25% от всех известных полиморфизмов [8]. Традиционно для оценки типа селективного давления, действующего на геном, применяется расчет соотношения частот несинонимичных и синонимичных замен (d_n/d_s): показатель меньше единицы свидетельствует о действии стабилизирующего отбора, равный единице – нейтрального и более единицы – диверсифицирующего [4, 14]. Вместе с тем в отдельных случаях для близкородственных геномов этот показатель может оказаться на уровне единицы и выше в одной клональной линии, что чаще всего обусловлено малым периодом времени, прошедшим с даты мутационного события, и невозможностью реализации в этот ограниченный временной отрезок очищающего отбора [14].

Подходы к выявлению однонуклеотидных полиморфизмов в геноме достаточно разнообразны и классифицируются в зависимости от принципа используемого метода. В частности, одним из первых применяемых с этой целью методов считается анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции, позволяющий выявлять известные нуклеотидные замены в специфических сайтах рестрикции ДНК [6]. В настоящее время используются скрининг SNP на ДНК-микрочипах, масс-спектрометрический анализ, секвенирование отдельных содержащих однонуклеотидные полиморфизмы участков генома, различные варианты амплификационного анализа, в том числе аллель-специфическая ПЦР, и целый ряд других методов [15 – 19].

Интенсивное развитие SNP-генотипирования микроорганизмов получило с разработкой технологий высокопроизводительного полногеномного секвенирования (high-throughput whole-genome sequencing) второго поколения и созданием в последние годы мономолекулярного ультравысокопроизводительного секвенирования (ultra high-throughput whole-genome sequencing) третьего поколения [10, 20 – 22]. Применяющиеся платформы высокопроизводительного массового параллельного секвенирования позволяют генерировать большие массивы данных о структуре геномов целевых объектов с высокими точностью, скоростью и разрешающей способностью [10, 20]. При этом тенденция к снижению стоимости исследования, сокращению времени получения результата, миниатюризации приборов, оптимизации лабораторных

протоколов способствует интеграции полногеномного секвенирования не только в научные исследования, но и в практику лабораторий клинической диагностики и систему эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями [21 – 23].

Так, определение полной нуклеотидной последовательности геномов бактерий стало надежным инструментом в разных отраслях микробной геномики, в частности в анализе структурной организации генов вирулентности (вирулом), метаболизма (метаболом), антибиотикорезистентности (резистом); в таксогеномике – для идентификации видов на основании определения структуры филогенетически информативных генов микроорганизмов; в метагеномике – для изучения особенностей генетической организации микробных сообществ [10, 20 – 24].

Применение массового параллельного секвенирования обеспечивает возможность обнаружения однонуклеотидных полиморфизмов по всему геному исследуемого объекта и сопоставления полученных результатов с геномными базами данных на сетевых ресурсах. Такой подход, несомненно, оказывается наиболее информативным в филогенетическом анализе при изучении эволюционной истории микроорганизмов в пределах как различных таксономических групп, так и одной клональной линии [14, 20, 25]. Особое место полногеномное SNP-генотипирование занимает при изучении филогении высококлональных мономорфных микроорганизмов, таких как *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella typhi*, в связи с низкой вариабельностью других маркеров в их геноме [21, 25].

Кроме того, возможность сравнения анализируемых геномов с разрешением в один нуклеотид определяет полногеномное секвенирование как мощный инструмент в молекулярно-эпидемиологическом анализе как при локальных эпидемических осложнениях с оценкой микроэволюционных изменений патогенов в объектах окружающей среды и организме хозяина (в т.ч. и патоадаптивных генетических изменений, приводящих к формированию клонов с повышенным патогенным потенциалом), так и при широкомасштабных проспективных эпидемиологических исследованиях для оценки глобальных тенденций распространения отдельных клонов возбудителей [20 – 22, 26]. Так, проведенный по результатам исследования полных геномов анализ послужил основой гипотез о механизмах появления и распространения метициллин-резистентных клонов *Staphylococcus aureus* [20, 27], высокопатогенных клонов *Clostridium difficile* с множественной лекарственной устойчивостью [28], высоковирулентного шига-токсинпродуцирующего энтероагрегативного штамма *Escherichia coli* O104:H4 [29] и др.

Таким образом, высокая частота встречаемости в популяции, плотность и стабильность однонуклеотидных полиморфизмов, а также наличие широкого круга подходов для их выявления (в том числе

платформ для высокопроизводительного секвенирования нового поколения) определяют SNP-генотипирование как эффективный, обладающий высокой разрешающей способностью и воспроизводимостью метод. Вместе с тем существуют и проблемные моменты применения SNP-типирования микроорганизмов на основе полногеномного секвенирования: сложность анализа данных при получении коротких прочтений, необходимость использования строгих критериев для отнесения вариабельного нуклеотида к SNP, проблемы в идентификации повторяющихся последовательностей и гомополимеров, потребность в проведении биоинформационного анализа больших объемов данных [21, 23, 30]. Решение этих вопросов возможно при одновременном использовании нескольких платформ для секвенирования или технологий, обеспечивающих генерирование более длинных прочтений. Для оптимизации подходов к биоинформационной характеристике данных требуется разработка стандартных алгоритмов анализа.

Детекция однонуклеотидных замен достаточно успешно применяется в молекулярной эпидемиологии, реконструкции эволюционных событий и выяснении направлений дивергенции возбудителя холеры.

В частности, идентификация нуклеотидных замен в генах патогенности холерного вибриона используется для генотипирования и оценки тенденций эволюционных преобразований патогенного потенциала этиологического агента холеры, а также анализа глобального распространения отдельных клональных линий. Так, на основании определения генотип-специфических нуклеотидных замен в гене субъединицы В холерного токсина установлено существование различных генотипов, ассоциированных с биоваром и серогруппой холерного вибриона. Первый генотип (*ctxB1*) специфичен для *V. cholerae* серогруппы O1 классического биовара, второй (*ctxB2*) – для *V. cholerae* O1 Эль-Тор из Австралии; третий (*ctxB3*) – для типичных *V. cholerae* O1 Эль-Тор, а также штаммов *V. cholerae* серогруппы O139; генотипы *ctxB4-6* выявлены только в штаммах серогруппы O139, *ctxB7* – в атипичных вариантах *V. cholerae* Эль-Тор серогрупп O1 и O139, *ctxB8-9* – в штаммах *V. cholerae* серогрупп O27 и O37 соответственно [31 – 34]. Известно, что на современном этапе седьмой пандемии холеры произошла замена типичных *V. cholerae eltor* атипичными генетически измененными вариантами с повышенным патогенным потенциалом, несущими классическую аллель гена субъединицы В холерного токсина – *ctxB1* [32 – 34]. Атипичные варианты вибриона Эль-Тор не только широко распространились в эндемичных странах, но и послужили причиной эпидемических осложнений на свободных от холеры территориях [32 – 38]. Более того, в последние годы обнаружен новый клон *V. cholerae eltor* с дополнительной заменой в позиции 58 гена *ctxB* классического типа (*ctxB7*-аллель). Указан-

ный вариант *V. cholerae eltor* вызвал серьезные эпидемические осложнения на острове Гаити с последующим заносом возбудителя в другие страны Карибского бассейна, Северную и Южную Америку и Европу [33, 39]. *V. cholerae eltor* с *ctxB7*-аллелью гена субъединицы В холерного токсина идентифицирован также в Индии, Непале, Камеруне, Шри-Ланке и других странах [40 – 43].

Однонуклеотидные вариации обнаружены и в других генах СТХ профага [44], а также в «острове патогенности» VPI-I атипичных вариантов вибриона Эль-Тор. Так, N.A. Hasan с соавт. [45] показали наличие в структуре гена *rstB* штаммов с острова Гаити, наряду с делецией GTA в позициях 77 – 79, характерной для вибрионов классического биоуара; двух однонуклеотидных полиморфизмов: А – G в позиции 192 (уникального для штаммов с о. Гаити) и G – А в позиции 108 (обнаруженного ранее в штаммах из Мексики) [45]. Кроме того, в гаитянских штаммах выявлена измененная аллель гена токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* с однонуклеотидной заменой в 266-й позиции – аллель *tcpA^{CIRS}*, обнаруженная ранее в штамме CIRS 101 из Бангладеш [43]. Указанные нуклеотидные замены можно рассматривать в качестве дополнительных генетических маркеров данной клональной линии вибрионов Эль-Тор.

Исследование генетической детерминированности устойчивости к антибактериальным препаратам в ряде случаев также основывается на скрининге нуклеотидных замен в генах-мишенях [46]. В частности, при установлении механизмов резистентности эпидемического штамма с острова Гаити показано, что его устойчивость к налидиксовой кислоте и сниженная чувствительность к ципрофлоксацину обусловлены заменами в генах *gyrA* (Ser83Ile) и *parC* (Ser85Leu). Структурным же анализом интегративного конъюгативного элемента ICEVchHai1, несущего часть приобретенных генов резистентности, и сопоставлением его полной нуклеотидной последовательности с семью подобными интегронами выявлена высокая степень гомологии указанного элемента с ICEVchInd5, обнаруженным в штаммах из Индии. При этом различия ICEVchHai1 и ICEVchInd5 заключаются в наличии пяти нуклеотидных замен в структуре указанных локусов [47].

Филогенетические исследования с применением SNP-анализа, направленные на выяснение происхождения и родства пандемических клонов возбудителя холеры, проведены L. Feng с соавт. [48]. На основании сопоставления полной нуклеотидной последовательности геномов штамма шестой пандемии, предпандемического изолята и штамма седьмой пандемии авторы проводили датирование времени дивергенции клонов с учетом концепции молекулярных часов, в соответствии с которой принято считать, что для конкретной генетической последовательности скорость эволюции постоянна во времени [4, 48]. При этом для повышения

достоверности расчета из анализа исключались рекомбинационные области генома и учитывались только мутационные SNP коровой области. В результате показано, что расхождение клонов шестой и седьмой пандемий произошло примерно в 1880 году и патогенный потенциал пандемических клонов формировался независимо друг от друга посредством приобретения или утраты отдельных генетических блоков [48].

Для выяснения закономерностей эволюционных преобразований и распространения в мире этиологического агента седьмой пандемии С. Lam с соавт. проводили SNP-генотипирование коллекции из 64 изолятов *V. cholerae*, выделенных в различные временные периоды на разных территориях [49]. Исследование предусматривало детекцию 30-ти локализованных на обеих хромосомах холерного вибриона мутационных SNP (в т.ч. 18-ти специфичных для серогруппы O1 и 12-ти – для серогруппы O139), отобранных как наиболее информативные при сравнении полных геномов *V. cholerae* (M66-2, N16961, MJ-1236), опубликованных на сайте NCBI. Кластерный анализ результатов типирования исследуемых изолятов и группы ранее охарактеризованных на основании полных (*V. cholerae* M66-2, N16961, MJ-1236) или частично секвенированных геномов (*V. cholerae* MO10, RC9, B33, CIRS 101) штаммов выявил десять SNP-профилей, объединенных в шесть групп. При этом общность профилей отдельных групп штаммов послужила основанием для заключения о вероятности заноса возбудителя в Латинскую Америку из Африки, а не из Азии, как считалось ранее. Вместе с тем присутствие изолятов из Африки в трех разных SNP-группах, наряду с присутствием в тех же группах азиатских изолятов, свидетельствует о неоднократных заносах эпидемических клонов на Африканский континент из Азии. Ступенчатость филогенетического дерева позволила авторам сделать вывод о последовательной эволюции холерного вибриона в период седьмой пандемии [49].

Данное предположение нашло подтверждение при полногеномном анализе однонуклеотидных полиморфизмов в группе из 154 штаммов *V. cholerae*, включающей 131 изолят седьмой пандемии [50]. В результате кластерного анализа изоляты биоуаров классического и Эль-Тор вошли в состав отдельных дистанцированных филогенетических линий, не объединенных общим предком, что послужило основанием для вывода о разной эволюционной истории клонов шестой и седьмой пандемий. Группа штаммов седьмой пандемии оказалась монофилетической, с наличием от 50 до 250 SNP в консервативной части генома, по сравнению с референсным штаммом *V. cholerae eltor* N16961, что может служить доказательством единого источника происхождения данной группы. При датировании эволюционных событий расчетная скорость накопления мутаций в этой группе составила 3,3 SNP в год с частотой $8,33 \times 10^{-7}$ SNP на сайт в год.

На основании указанных расчетов установлен вероятный период существования общего предка группы штаммов седьмой пандемии 1827 – 1936 годов, что согласуется с данными о первичном обнаружении вибриона Эль-Тор в 1905 году. Байесовский анализ структуры популяции штаммов седьмой пандемии выявил дифференциацию филогенетического дерева на три клады, которые отражают три волны распространения холеры и ассоциированы с особенностями организации генетического элемента CTX *V. cholerae*. Учитывая клональную кластеризацию изолятов седьмой пандемии, постоянную скорость накопления SNP, выявленные особенности временного и пространственного распространения, авторы пришли к выводу о глобальном распространении этиологического агента седьмой пандемии из одного источника (Бенгальский залив) тремя отдельными, но перекрывающимися волнами. При этом установленная относительно невысокая генетическая вариабельность коровой части генома возбудителя обусловлена, по мнению авторов, его периодическими эволюционными изменениями в указанном источнике [50].

Комплексные филогеографические исследования с применением полногеномного SNP-генотипирования проведены для установления происхождения и вероятных путей заноса клона *V. cholerae*, обусловившего продолжающуюся с октября 2010 года эпидемию на острове Гаити, которая впоследствии распространилась на ряд других стран Карибского бассейна.

C.S. Chin с соавт. [39] с использованием молекулярного секвенирования в реальном времени двух клинических изолятов с острова Гаити и последующего сравнения результатов с данными секвенирования группы различающихся географически и по времени выделения штаммов пришли к выводу о трансконтинентальной импортизации клона возбудителя холеры на остров из Южной Азии, поскольку и при сопоставлении однонуклеотидных вариаций в структуре 1588-ми консервативных генов-ортологов, и при генотипировании по 30-ти максимально информативным SNP гаитянские штаммы кластеризовались со штаммами *V. cholerae*, изолированными в Бангладеш. Изоляты же из Латинской Америки оказались расположенными в гетерологичных группах, что исключает ранее сформулированную гипотезу о вероятности заноса холерного вибриона на Гаити с данной территории [39]. Результаты этих исследований стали важным моментом в выяснении причин развития эпидемии холеры в регионе Карибского бассейна. Филогенетическое родство изолятов из Гаити и Доминиканской Республики со штаммами из Южной Азии установлено также R. Sealfon с соавт. [51].

Альтернативное заключение о вероятном направлении заноса инфекции на Гаити сделано при анализе SNP в 632-х ортологических генах группы гаитянских штаммов, изолированных в разные

временные периоды эпидемии (2010 – 2011 гг.), и коллекции *V. cholerae* из стран Азии и Африки [52]. Авторами показана кластеризация штамма из Гаити с тремя эпидемиологически не связанными изолятами из Камеруна и США (занос из Индии), с максимальным сходством с изолятом из Камеруна, различия с которым у гаитянских штаммов составили от четырех до семи нуклеотидов.

Исследование генетического разнообразия и эволюционной истории *V. cholerae* на острове Гаити на основании сравнения особенностей структуры 992 генов-ортологов также выявило кластеризацию гаитянских изолятов со штаммами из Камеруна, Бангладеш, Индии и Зимбабве [45].

R.S. Hendriksen с соавт. с целью проверки гипотезы о заносе холеры на Гаити из Непала миротворцами ООН и установления взаимосвязей эпидемических осложнений на указанных территориях осуществляли сопоставление полных геномов 24 штаммов из Непала и 10-ти ранее секвенированных штаммов (в т.ч. трех изолятов с острова Гаити) [53]. Реконструкция филогенетического дерева показала, что все изоляты из Непала принадлежат к одной монофилетической линии, которая включает и штаммы из Бангладеш и Гаити. При этом часть изолятов из Непала и все исследуемые с острова Гаити входят в один из кластеров этой линии (различия нуклеотидных последовательностей внутри кластера составляют лишь 1 – 2 SNP), что определяет близкое генетическое родство указанных *V. cholerae* и подтверждает непальское происхождение эпидемии на Гаити. Авторами отмечено, что дифференцирующие однонуклеотидные полиморфизмы в группе гаитянских штаммов относятся к несинонимичным, а соотношение d_w/d_s составляет больше единицы, свидетельствуя о действии диверсифицирующего отбора в данной линии и возможных селективных преимуществах гаитянских изолятов [53].

S.B. Pun, анализируя полученные R.S. Hendriksen с соавт. результаты, предположил, что вывод о непальском происхождении вспышки холеры на Гаити мог оказаться ошибочным в связи с нерепрезентативностью исследованной выборки *V. cholerae* и, соответственно, включение в филогенетический анализ изолированных в последние годы на территории других стран Азии штаммов может привести к изменению заключения о происхождении гаитянского клона *V. cholerae* [54].

Однако проведенное L.S. Katz с соавт. филогенетическое исследование с включением в анализ 108 штаммов, в том числе изолятов, представляющих эпидемические осложнения последних лет в странах Азии и Африки, подтвердило непальское происхождение эпидемии на Гаити [55]. На сконструированной по результатам скрининга 566 SNP в ортологических генах дендрограмме все гаитянские изоляты и три непальских вошли в одну монофилетическую группу, подтверждая тем самым близкое родство указанных групп штаммов.

Таким образом, анализ однонуклеотидных полиморфизмов на основании полногеномного секвенирования представительных коллекций *V. cholerae* позволил сделать убедительные выводы о филогенетической истории и направлении заноса эпидемического клона холерного вибриона на территорию Гаити.

Наряду с этим существенный интерес представляет и оценка перспективности использования полногеномного секвенирования и SNP-типирования для молекулярно-эпидемиологического анализа и изучения эволюционных преобразований ограниченной в пространстве популяции *V. cholerae* на примере столь длительной эпидемии холеры на острове Гаити. Так, A.R. Reimer с соавт. [52] при анализе микроэволюционного генетического разнообразия среди гаитянских штаммов по SNP в 632 генах-ортологах установили, что выделенные на территории острова Гаити в 2010 – 2011 годах исследуемые штаммы отличались друг от друга не более чем на два SNP коровой области генома. Несущественными различия оказались и при сопоставлении полногеномных последовательностей анализируемых штаммов с двумя охарактеризованными ранее клиническими изолятами [39] – выявлены лишь три однонуклеотидные вариации [52]. Эти данные подтверждают клональное происхождение вспышки на Гаити.

При SNP-генотипировании представительной коллекции штаммов седьмой пандемии с использованием схемы, включающей анализ 277 SNP, в том числе 70-ти синонимичных, 169-ти несинонимичных и 38-ми нуклеотидных полиморфизмов в межгенной области, локализованных как на большой, так и на малой хромосоме, удалось установить географические особенности распространения отдельных SNP-профилей [45]. Так, в геноме изолятов с острова Гаити выявлено 12 однонуклеотидных полиморфизмов, обозначенных как «Гаити-специфические SNP» (Haiti-specific SNPs), дистанцирующих данные изоляты от других на дендрограмме. Кроме того, показано и существование микроэволюционных процессов в популяции циркулирующих в период эпидемии *V. cholerae*, поскольку в группе гаитянских штаммов наряду с вариабельностью состава и структуры отдельных мобильных генетических элементов (RS1, TLC) обнаружено как минимум пять изолят-специфических SNP [45]. Эти данные подтверждают значимость использования детекции однонуклеотидных полиморфизмов в молекулярной эпидемиологии для углубленного анализа эпидемических проявлений холеры.

R. Sealfon с соавт. [51] для оценки динамики генетической изменчивости холерного вибриона в период эпидемии провели полногеномный анализ трех изолятов, выделенных на Гаити в октябре 2010 года и одного – в Доминиканской Республике в январе 2011 года. В этой группе штаммов выявлено четыре уникальных однонуклеотидных полиморфизма, в том числе один – в СТХ-элементе,

один – в SXT и два – в коровой части генома. Следует отметить, что три из этих SNP дифференцируют штаммы с острова Гаити и из Доминиканской Республики. Результаты скрининга SNP согласуются с установленной ранее для холерного вибриона скоростью накопления нуклеотидных замен в коровой области генома, составляющей 3,3 SNP в год, и свидетельствуют о динамических генетических преобразованиях популяции *V. cholerae* в период эпидемии, обусловленных, по всей вероятности, адаптацией патогена к условиям существования в организме хозяина или в окружающей водной среде [51].

Другой группой исследователей с целью выяснения вариантов и темпов эволюции популяции *V. cholerae* в период эпидемии на Гаити проведен филогенетический и байесовский анализ коллекции из 108 штаммов *V. cholerae*, изолированных как на разных территориях в период эпидемических осложнений на острове Гаити (2010 – 2012 гг.), так и в Южной Азии и на Африканском континенте [55]. Первоначальный скрининг коллекции по структуре 566 генов коровой области показал объединение в одну группу всех гаитянских изолятов и трех штаммов из Непала. Дальнейший кластерный анализ по 45hq SNP (high-quality SNP) в группе гаитянских и непальских штаммов продемонстрировал расхождение на дендрограмме многочисленных линий от одного генотипа, преобладающего в начальный период эпидемии, что свидетельствует о дивергенции изолятов от одного общего предшественника и подтверждает гипотезу о том, что изоляты являются частью одной вспышки, а не представителями вторичных заносов [55, 56]. При этом обнаруженные авторами нуклеотидные полиморфизмы (от одного до шести для отдельных штаммов) в штаммах согласуются с эпидемиологическими данными [57]. Так, датированная филогения с использованием молекулярных часов показала существование последнего общего предка нуклеотидных последовательностей гаитянских штаммов 28 сентября 2010 года (в пределах 23 июля – 17 октября 2010 г., ДИ – 95%). Оказалось, что доверительный интервал включал в себя дату прибытия непальских солдат на остров Гаити (9 октября 2010 г.) и первый случай госпитализации больного холерой (17 октября 2010 г.). Эти результаты подтверждают значимость полногеномного секвенирования при эволюционном анализе популяции патогена для определения сроков отдельных событий в пределах эпидемического осложнения, а также отслеживания путей распространения вспышечных клонов.

Полногеномное SNP-генотипирование использовалось при изучении популяционной динамики и направлений распространения *V. cholerae* в период вспышки холеры в Пакистане, зарегистрированной в 2010 году после серьезного наводнения [58]. При построении глобальной филогении по алгоритму максимального правдоподобия на основании SNP в геноме 38 изолятов из Па-

кистана и 146-ти доступных полногеномных последовательностей холерного вибриона было установлено, что изоляты из Пакистана дифференцируются на две отдельные субклады (PSC1 и PSC2) в составе третьей волны распространения седьмой пандемии. При сопоставлении эволюционных дистанций прослеживается филогеографическая корреляция между частотой мутаций, датой изоляции и направлением распространения изолятов отдельных субклад на территории Пакистана. Так, изоляты PSC1 были обнаружены преимущественно в прибрежных морских районах, тогда как изоляты субклады PSC2 распространились внутри страны и оказались связаны с паводковой ситуацией (первые изоляты этой кланды с меньшим количеством нуклеотидных замен обнаружены у истока реки Инд в начале наводнения, последующие, с большим количеством SNP, – ниже по течению реки в более поздние сроки вспышки) [58].

Филогенетический анализ консервативной части генома, по данным полногеномного секвенирования, также успешно применялся для выяснения происхождения выделенных на территории Ростовской области штаммов *V. cholerae* *eltor* [59], установления генетического родства изолированного от больного в 2013 году в Китае штамма серогруппы O139 [60].

Таким образом, SNP-типирование на основе высокопроизводительного полногеномного секвенирования

оказывается перспективным эффективным подходом как в изучении филогенетической истории возбудителя холеры, датировании эволюционных событий, установлении закономерностей формирования новых клонов патогена в глобальном масштабе, так и в молекулярно-эпидемиологическом анализе при выяснении микроразнообразия генетических преобразований популяции *V. cholerae*, путей заноса и распространения возбудителя в период отдельных эпидемических осложнений. При этом в эпидемиологическом анализе значимы не только установление мутационных изменений в консервативной части генома, скорость накопления которых невелика и может быть недостаточна для дифференциации отдельных изолятов в пределах вспышки, но и структурный анализ полиморфизмов мобильных генетических элементов. Вместе с тем необходимо отметить, что для повышения достоверности полученных по результатам полногеномного секвенирования выводов о происхождении, эволюции и распространении клонов возбудителя требуются стандартизация подходов к получению, анализу и аннотации данных, расширение глобальных баз данных, содержащих информацию о нуклеотидных последовательностях геномов штаммов *V. cholerae* с различными пространственно-временными характеристиками и эпидемическим потенциалом.

Литература

1. Darmon E., Leach D.R.F. Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014; 78 (1): 1 – 39.
2. Rocha E.P.C. The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* 2008; 42: 211 – 233.
3. Brill M., Lit P., Lacroix V., Sagot M.F. Short and long-term genome stability analysis of prokaryotic genomes. *BMC Genomics.* 2013; 14: 309.
4. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2009.
5. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика: Учебное пособие. 2-е изд. Новосибирск: Сиб. ун-т. изд-во; 2003.
6. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene.* 1999; 234: 177 – 186.
7. Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998; 8: 1229 – 1231.
8. Shastry B.S. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Meth. Mol. Biol.* 2009; 578: 3 – 22.
9. Van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *J. Clin. Microbiol. and Infect. Dis.* 2007; 13: 1 – 46.
10. Bertelli C., Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19 (9): 803 – 813.
11. Snitkin E.S., Zelazny A.M., Thomas P.J., Stock F., Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. (NISC comparative sequencing program, Henderson D.K., Palmore T.N., Segre J.A. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 148ra116.
12. Crow J.F. Spontaneous mutation as a risk factor. *Exp. Clin. Immunogen.* 1995; 12: 121 – 128.
13. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009; 9: 430 – 440.
14. Parkhill J., Wren B.W. Bacterial epidemiology and biology – lessons from genome sequencing. *Genome Biology.* 2011; 12: 230.
15. Komar A.A. Single nucleotide polymorphisms methods and protocols. Second Edition. Humana Press; 2009.
16. Hrabak J., Chudackova E., Walkov R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26 (1): 103.
17. Lechner D., Lathrop G.M., Gut I.G. Large-scale genotyping by mass-spectrometry: experience, advances and obstacles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6: 31–38
18. Zhang W., Qi W., Albert T.J., Motiwala A.S., Alland D., Hyttia-Trees E.K. et al. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2006; 16: 757 – 767.
19. Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 49 – 53.
20. Didelot X., Bowden R., Wilson D.J., Peto T.E.A., Crook D.W. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13 (9): 601 – 612.
21. Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., Sa-Lero R., van Dijk J.M., Laurent F. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20380.
22. Struelens M.J., Brisse S. From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20386.
23. Sibley C.D., Peirano G., Church D.L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012; 12: 505–521.
24. Chun J., Rainey F.A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2014; 64: 316 – 324.
25. Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2012; 367: 860 – 867.
26. Walker M.J., Beatson S.A. Outsmarting outbreaks. *Science.* 2012; 338: 1161 – 1162.
27. Harris S.R., Feil E.J., Holden M.T.G., Quail M.A., Nickerson E.K., Chantratita N. et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science.* 2010; 327: 469 – 474.
28. He M., Miyajima F., Roberts P., Ellison L., Pickard D.J., Martin M.J. et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat. Genet.* 2012; 45 (1): 109 – 113.

29. Rasko D.A., Webster D.R., Sahl J.W., Bashir A., Boisen N., Scheutz F. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic – uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 709 – 717.
30. Goering R.V., Kock R., Grundmann H., Werner G., Friedrich A.W. on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). From theory to practice: molecular strain typing for the clinical and public health setting. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20383.
31. Olsvik O., Wahlberg J., Pettersen B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K., Fields P.I. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (1): 22 – 25.
32. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiol.* 2010; 18 (1): 46 – 54.
33. Robins W.P., Mekalanos J.J. Genomic science in understanding cholera outbreaks and evolution of *Vibrio cholerae* as a human pathogen. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2014; DOI: 10.1007/82_366.
34. Mukhopadhyay A.K., Takeda Y., Nair G.B. Cholera outbreaks in the El Tor biotype era and the impact of the new El Tor variants. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2014; DOI: 10.1007/82_363.
35. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С., Афанасьев М.В. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журн. микробиол.* 2011; 5: 12 – 18.
36. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С., Половинкина В.С., Афанасьев М.В. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном округах России. *Молекул. генетика.* 2012; 2: 13 – 20.
37. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариативность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Молекул. генетика.* 2011; 3: 11 – 18.
38. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабеныхов Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. *Эпидемиол. и инфекц. бол.* 2012; 5: 31 – 35.
39. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R. et al. The origin of the haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 33 – 42.
40. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S. K., Kamboj D. V. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58: 234 – 238.
41. Kumar P., Mishra D.K., Deshmukh D.G., Jain M., Zade A.M., Ingole K.V. et al. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor strains with the ctxB7 allele driving cholera outbreaks in south-western India in 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 16: pii: 1567 – 1348.
42. Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2113 – 2120.
43. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M. et al. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010 – 2011. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2122 – 2129.
44. Kim E.J., Lee D., Moon S.H., Lee C.H., Kim D.W. CTX Prophages in *Vibrio cholerae* O1 Strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 24 (6): 725 – 731.
45. Hasan N. A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M. et al. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109 (29): E 2010 – 2017.
46. Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 397 – 407.
47. Sjolund-Karlsson M., Reimer A., Folster J.P., Walker M., Dahourou G.A., Batra D.G. et al. Drug-resistance mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 outbreak strain, Haiti. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2151 – 2154.
48. Feng L., Reeves P.R., Lan R., Ren Y., Gao C., Zhou Z. et al. Recalibrated molecular clock and origins for the cholera pandemic clones. *J. PLoS One.* 2008; 3 (12): e4053.
49. Lam C., Octavia S., Reeves P., Wang L., Lan R. Evolution of seventh cholera pandemic and origin of 1991 epidemic Latin America. *Emerg. Inf. Dis.* 2010; 16 (7): 1130 – 1137.
50. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic nature. 2011; 477: 462 – 466.
51. Sealon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L. et al. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and the Dominican Republic. *BMC Genomics.* 2012; 13: 468.
52. Reimer A. R., Domselaar G.V., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C. et al. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2113 – 2121.
53. Hendriksen R.S., Price L.B., Schupp J.M., Gillece J.D., Kaas R.S., Engelthaler D.M. et al. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the haitian outbreak. *mBio.* 2011; 2 (4): e00157.
54. Pun S.B. South Asia instead of Nepal may be the origin of the Haitian cholera outbreak strains. *mBio.* 2011; 2 (5): e00219.
55. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., Turnsek M.A. et al. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti. *mBio.* 2013; 4 (4): e00398.
56. Grad Y.H., Waldor M.K. Deciphering the origins and tracking the evolution of cholera epidemics with whole-genome-based molecular epidemiology. *mBio.* 2013; 4 (5): e00670.
57. Frerichs R.R., Keim P.S., Barrais R., Piarroux R. Nepalese origin of cholera epidemic in Haiti. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (6): e158 – 163.
58. Shah M.A., Mutreja A., Thomson N., Baker S., Parkhill J., Dougan G. et al. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 associated with floods, Pakistan, 2010. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20 (1): 13 – 20.
59. Кулешов К.В., Маркелов К.М., Дедков В.Г., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Керманов А.В. и др. Филогенетический анализ геномов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Ростовской области. *Журн. микробиол.* 2013; 6: 13 – 20.
60. Yi Y., Lu N., Liu F., Li J., Zhang R., Jia L. et al. Genome sequence and comparative analysis of a *Vibrio cholerae* O139 strain E306 isolated from a cholera case in China. *Gut Pathogens.* 2014; 6: 3.

References

1. Darmon E., Leach D.R.F. Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014; 78 (1): 1 – 39.
2. Rocha E.P.C. The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* 2008; 42: 211 – 233.
3. Brilli M., Lit P., Lacroix V., Sagot M.F. Short and long-term genome stability analysis of prokaryotic genomes. *BMC Genomics.* 2013; 14: 309.
4. Lukashov V.V. Molecular evolution and phylogenetic analysis. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2009.
5. Zhimulev I.F. General and molecular genetics: Textbook for university students. Second edition. Novosibirsk: Siberian University; 2003.
6. Brookes A.J. The essence of SNPs. *Gene.* 1999; 234: 177 – 186.
7. Collins F.S., Brooks L.D., Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998; 8: 1229 – 1231.
8. Shastry B.S. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Meth. Mol. Biol.* 2009; 578: 3 – 22.
9. Van Belkum A., Tassios P.T., Dijkshoorn L., Haeggman S., Cookson B., Fry N.K. et al. Guidelines for the validation and amplification of typing methods for use in bacterial epidemiology. *J. Clin. Microbiol. and Infect. Dis.* 2007; 13: 1 – 46.
10. Bertelli C., Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol. Infect.* 2013; 19 (9): 803 – 813.
11. Snitkin E.S., Zelazny A.M., Thomas P.J., Stock F., Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. (NISC comparative sequencing program, Henderson D.K., Palmore T.N., Segre J.A. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 148ra116.
12. Crow J.F. Spontaneous mutation as a risk factor. *Exp. Clin. Immunogen.* 1995; 12: 121 – 128.
13. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution.* 2009; 9: 430 – 440.
14. Parkhill J., Wren B.W. Bacterial epidemiology and biology – lessons from genome sequencing. *Gen. Biol.* 2011; 12: 230.
15. Komar A.A. Single nucleotide polymorphisms methods and protocols. Second Edition. Humana Press; 2009.
16. Hrabak J., Chudackova E., Walkov R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-ToF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26 (1): 103.
17. Lechner D., Lathrop G.M., Gut I.G. Large-scale genotyping by mass spectrometry: experience, advances and obstacles. *Cur. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6: 31 – 38.
18. Zhang W., Qi W., Albert T.J., Motiwala A.S., Alland D., Hyttia-Trees E.K. et al. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Res.* 2006; 16: 757 – 767.
19. Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16: 49 – 53.
20. Didelot X., Bowden R., Wilson D.J., Peto T.E.A., Crook D.W. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat. Rev. Gen.* 2012; 13 (9): 601 – 612.

21. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Lero R, van Diji JM, Laurent F. et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20380.
22. Struelens M.J., Brisse S. From molecular to genomic epidemiology: transforming surveillance and control of infectious diseases. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20386.
23. Sibley C.D., Peirano G., Church D.L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012; 12: 505 – 521.
24. Chun J., Rainey F.A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2014; 64: 316 – 324.
25. Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2012; 367: 860 – 867.
26. Walker M.J., Beatson S.A. Outsmarting outbreaks. *Science.* 2012; 338: 1161 – 1162.
27. Harris S.R., Feil E.J., Holden M.T.G., Quail M.A., Nickerson E.K., Chantratita N. et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science.* 2010; 327: 469 – 474.
28. He M., Miyajima F., Roberts P., Ellison L., Pickard D.J., Martin M.J. et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nat. Genet.* 2012; 45 (1): 109 – 113.
29. Rasko D.A., Webster D.R., Sahl J.W., Bashir A., Boisen N., Scheutz F. et al. Origins of the *E. coli* Strain causing an outbreak of hemolytic – uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 709 – 717.
30. Goering R.V., Kock R., Grundmann H., Werner G., Friedrich A.W. on behalf of the ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). From theory to practice: molecular strain typing for the clinical and public health setting. *Euro Surveill.* 2013; 18 (4): 20383.
31. Olsvik O., Wahlberg J., Peterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K., Fields P.I. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31 (1): 22 – 25.
32. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiol.* 2010; 18 (1): 46 – 54.
33. Robins W.P., Mekalanos J.J. Genomic science in understanding cholera outbreaks and evolution of *Vibrio cholerae* as a human pathogen. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2014. DOI: 10.1007/82_366.
34. Mukhopadhyay A.K., Takeda Y., Nair G.B. Cholera Outbreaks in the El Tor Biotype Era and the Impact of the New El Tor Variants. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2014. DOI: 10.1007/82_363.
35. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., Afanasyev M.V. Detection of «hybrid» *Vibrio cholerae* eltor strains during epidemic complications in Syberia and Far East. *Zh. Mikrobiol.* 2011; 5: 12 – 18 (in Russian).
36. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Y., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., Afanas'ev M.V. Molecular genetic analysis of epidemic dangerous imported *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated in Siberian and Far Eastern federal districts of Russia. *Molecul. Genet.* 2012; 2: 13 – 20 (in Russian).
37. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. Genome variability in the altered variants of vibrio cholerae biovar El tor isolated in Russia. *Mol. Gen.* 2011; 3: 11 – 18 (in Russian).
38. Savelyev V. N., Savelyeva I.V., Babenyshv B.V., Kulichenko A.N. The evolution of the pathogen and the clinical and epidemiological features of the recent cholera (el tor). *Epidemiol. Infect. disease.* 2012; 5: 31 – 35 (in Russian).
39. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R. et al. The origin of the haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 33 – 42.
40. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S. K., Kamboj D. V. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58: 234 – 238.
41. Kumar P., Mishra D.K., Deshmukh D.G., Jain M., Zade A.M., Ingole K.V. et al. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El. Tor strains with the ctxB7 allele driving cholera outbreaks in south-western India in 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 16: pii: 1567 – 1348.
42. Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2113 – 2120.
43. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M. et al. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010 – 2011. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2122 – 2129.
44. Kim E.J., Lee D., Moon S.H., Lee C.H., Kim D.W. CTX Prophages in *Vibrio cholerae* O1 Strains *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 24 (6): 725 – 731.
45. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M. et al. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(29): E 2010 – 2017.
46. Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60: 397 – 407.
47. Sjolund-Karlsson M., Reimer A., Folster J.P., Walker M., Dahourou G.A., Batra D.G. et al. Drug-Resistance Mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 Outbreak Strain, Haiti. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2151 – 2154.
48. Feng L., Reeves P.R., Lan R., Ren Y., Gao C., Zhou Z. et al. Recalibrated Molecular Clock and Origins for the Cholera Pandemic Clones. *J. PLoS One.* 2008; 3 (12): e4053.
49. Lam C., Octavia S., Reeves P., Wang L., Lan R. Evolution of Seventh Cholera Pandemic and Origin of 1991 Epidemic Latin America. *Emerg. Inf. Dis.* 2010; 16 (7): 1130 – 1137.
50. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic nature. 2011; 477: 462 – 466.
51. Sealfon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L. et al. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and the Dominican Republic. *BMC Genomics.* 2012; 13: 468.
52. Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C. et al. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Inf. Dis.* 2011; 17 (11): 2113 – 2121.
53. Hendriksen R.S., Price L.B., Schupp J.M., Gillece J.D., Kaas R.S., Engelthaler D.M. et al. Population genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: evidence on the origin of the Haitian outbreak. *mBio.* 2011; 2 (4): e00157.
54. Pun S.B. South Asia Instead of Nepal May Be the Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strains. *mBio.* 2011; 2 (5): e00219.
55. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., Turnsek M.A. et al. Evolutionary Dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a Single-Source Introduction to Haiti. *mBio.* 2013; 4 (4): e00398
56. Grad Y.H., Waldor M.K. Deciphering the origins and tracking the evolution of cholera epidemics with whole-genome-based molecular epidemiology. *Bio.* 2013; 4 (5): e00670.
57. Frerichs R.R., Keim P.S., Barrais R., Piarroux R. Nepalese origin of cholera epidemic in Haiti. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (6): e158 – 163.
58. Shah M.A., Mutreja A., Thomson N., Baker S., Parkhill J., Dougan G. et al. Genomic Epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 Associated with Floods, Pakistan, 2010. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20 (1): 13 – 20.
59. Kuleshov K.V., Markelov M.L., Dedkov V.G., Vodopianov S.O., Vodopianov A.S., Kermanov A.V. et al. Phylogenetic analysis of genomes of *Vibrio cholerae* strains isolated on the territory of Rostov region. *Zh. Mikrobiol.* 2013; 6: 13 – 20 (in Russian).
60. Yi Y., Lu N., Liu F., Li J., Zhang R., Jia L. et al. Genome sequence and comparative analysis of a *Vibrio cholerae* O139 strain E306 isolated from a cholera case in China. *Gut Pathogens.* 2014; 6: 3.

Связь холерного вибриона с водными организмами и ее значение в эпидемиологии холеры

Е.С. Куликалова¹ (e_kulikalo@mail.ru), Л.Я. Урбанович¹, Е.Ю. Марков¹, В.С. Вишняков², Л.В. Миронова¹, С.В. Балахонов¹, Т.Т. Шкаруба¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. Д.И. Папанина» РАН, Ярославская область, пос. Борок

Резюме

В настоящем обзоре представлены литературные данные, отражающие определяющую роль поверхностных водоемов с компонентами экосистем, существенно влияющих на основные эндемические и эпидемические проявления холеры в экологии вибриона Эль-Тор. Несмотря на то что поверхностные водоемы признаны Комитетом экспертов ВОЗ (1968 г.) самостоятельной заражающей средой, по существующей в России классификации инфекционных болезней холера относится к антропонозам с фекально-оральным механизмом передачи и единственным источником инфекции. В работе рассматриваются разные взгляды на холеру: от природной очаговости и сапронозной природы холеры до ее принадлежности к сапрозооантропонозам. Описаны типы взаимоотношений холерного вибриона с представителями водной окружающей среды, показана роль в его жизненном цикле высших водных растений, фитопланктона, рыб, ракообразных и водоплавающих птиц. Обосновывается целесообразность введения в классификацию инфекционных болезней дополнительных классов (подклассов) и отнесения холеры в раздел сапрозооантропонозов.

Ключевые слова: *V. cholerae*, эпидемиология, классификация инфекционных болезней, источник инфекции, резервуар, переносчик (вектор)

Relationship of *Vibrio Cholerae* with Water Organisms and its Significance in Cholera Epidemiology

E.S. Kulikalova¹, L.Ya. Urbanovich¹, E.Yu. Markov¹, V.S. Vishnyakov², L.V. Mironova¹, S.V. Balakhonov¹, T.T. Shkaruba¹

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Papanin Institute of Internal Water Biology of the Russian Academy of Sciences, Village Borok of Yaroslavl region

Abstract

Literary data reflecting the crucial role of surface water reservoirs with ecosystem components essentially influencing on the main endemic and epidemic cholera manifestations in *Vibrio cholerae* ecology are reviewed. In spite of the fact that the WHO Committee of Experts (1968) has recognized surface water reservoirs as an independent infecting environment, according to the Russian classification of infectious diseases the cholera is referred to anthroponoses with fecal-oral transmission and an unique source of an infection. Various views to cholera are considered in the paper: from natural cholera focality and its sapronosis nature to its belonging to saprozoanthroponosis. Types of mutual relations of *V. cholerae* with water environment representatives are described. The role of the higher water plants, phytoplankton, fishes, crustaceans and waterfowl in *V. cholerae* life cycle is showed. Reasonability of introduction of additional classes (subclasses) in classification of infectious diseases and cholera attribution to saprozoanthroponoses section is validated.

Key words: *Vibrio cholerae*, epidemiology, classification of infectious diseases, infection source, reservoir, carrier (vector)

За последние три десятилетия получены важные данные о роли окружающей среды, включая водную с ее обитателями, в развитии инфекционных заболеваний, в частности холеры. Связь этого заболевания с водой впервые эпидемиологически подтверждена в 1850-х годах, когда J. Snow установил зависимость между массовыми заболеваниями и небольшим колодцем в Лондоне [1]. Впоследствии, более ста лет спустя, интенсивные исследования показали, что *Vibrio cholerae* можно обнаружить повсеместно в

прибрежных зонах разнотипных водоемов средних широт, особенно в эндемичных очагах, в течение всего летне-осеннего периода. В настоящее время убедительно установлено значение поверхностных водоемов как сложной составной части среды обитания вибриона El-Tor, представляющей определенную самостоятельную роль в эпидемиологии холеры [2].

Несмотря на то что поверхностные водоемы признаны Комитетом экспертов ВОЗ (1968 г.) самостоятельной заражающей средой, по существующей в

России классификации инфекционных болезней [3 – 5] холера относится к антропонозам с фекально-оральным механизмом передачи и единственным источником инфекции.

Осмисливая механизмы и формы существования холерного вибриона как компонента естественных водных экосистем, В.И. Литвин с соавт. (1998 г.) и В.И. Сергеевнин (2002 г.) пришли к заключению о природной очаговости холеры и в систематике инфекционных болезней отнесли ее к сапронозам, то есть к инфекциям, первично связанным с экосистемой природных водоемов [6, 7]. Анализируя результаты исследований отечественных авторов, А.Б. Белов (2013 г.) полагает, что холере целесообразно отнести к сапрозооантропонозам, и уточняет понятие «резервуар возбудителя», куда, согласно его представлениям, должны включаться только живые организмы [8]. По-видимому, к их числу могут быть отнесены такие обитатели водоемов, как цветковые растения, ракообразные, простейшие, рыбы и др. По определению же J. Lederberg (1992 г.), понятие «резервуар возбудителя – человек, животное, членистоногие, растение, почва, иные субстанции (или их комбинации), в которых инфекционный агент нормально живет и размножается» несколько расширено [9]. При этом в качестве переносчика (вектора) распространения микроорганизмов могут выступать связанные с водоемами водоплавающие птицы, хирономиды, членистоногие и др.

Подтверждена преимущественно симбионтная связь между *V. cholerae* и зоопланктонными организмами водной окружающей среды. Адаптация к неблагоприятным условиям, являющаяся ключевым фактором для выживания *V. cholerae*, вероятно, объясняется его комменсальным сосуществованием с водными организмами, которые сами по себе находятся в состоянии покоя. Известны факты паразитических отношений вибрионов с простейшими, когда бактериальная популяция увеличивается при совместном культивировании в сравнении с численностью вибрионов в воде без инфузорий [10]. Кроме того, важным условием обитания холерного вибриона в экосистемах является наличие высших водных растений, фитопланктона, рыб, моллюсков и ракообразных.

***V. cholerae* и цветковые растения.** В работе W.M. Spira с соавт. [11] впервые было показано, что токсигенные *V. cholerae* биотипа El-Tor концентрируются на поверхности водного гиацинта (*Eichornia crassipes*) – повсеместно распространенного в тропических областях Бангладеш водоплавающего растения, которое, как предполагают авторы, может обеспечивать распространение холеры водным путем в эндемичных районах и служить резервуаром холерных вибрионов в межэпидемический период. Позже R. Bhanumathi с соавт. [12] обнаружили, что штаммы *V. cholerae* O139, выделенные с поверхности водного гиацинта в Индии, несут, как и клинические изоляты, коровую область генетического элемента СТХ (*ctxA*, *ctxB*, *zot* и

ace), структурные и регуляторные гены для токсин-корегулируемых пилей TCP (*tcpA*, *tcpI* и *toxR*), фактор адгезии (*ompU*), дополнительный фактор колонизации (*acfB*) и продуцируют холерный токсин. M.S. Islam с соавт. [13] в лабораторных экспериментах показали, что *V. cholerae* O1 El-Tor усиливает свое выживание на ряске *Lemna minor* и предположили, что эти растения также могут служить резервуаром холерного вибриона в природе.

Однако взаимоотношения растений-гидрофитов и патогенных бактерий не столь однозначны. Описано антибактериальное действие ряда флавоноидов растений, поступающих из растительных тканей в водоемы и почву, на штаммы бактерий таких родов, как *Shigella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, а также *Vibrio* и *Escherichia*. Полагают, что различная чувствительность к флавоноидам может быть одной из причин, изменяющих видовой состав естественных микробных сообществ [14].

***V. cholerae*, ракообразные и зоопланктон.** Неоднократно было показано, что холерный вибрион, находясь в поверхностных водоемах, прикрепляется к внешним и внутренним содержащим хитин поверхностям таких ракообразных, как креветки и крабы, а также к остаткам их экзоскелетов, продуктам их линьки и погадкам [15 – 22]. Холерный вибрион O1 серогруппы прикрепляется преимущественно к определенным группам ракообразных, таким как веслоногие (*Copepoda*), ветвистоусые (*Cladocera*), усоногие раки (*Cirripedia*), а также к коловраткам (*Rotifera*, *Rotatoria*) [19]. Установлено, что клетки *V. cholerae* O1 обладают большей колонизирующей способностью в отношении ракообразных, чем клетки *V. cholerae* O139, что может быть одной из причин доминирования *V. cholerae* O1 в качестве этиологического агента эпидемий холеры в эндемичных районах [21].

Показано, что холерные вибрионы, прикрепляясь к хитину ракообразных, способны размножаться с образованием биопленки, сохраняя метаболическую активность в течение длительного времени даже при низких значениях pH без потери жизнеспособности и вирулентности [20]. В ряде случаев в образцах различных видов копепод были обнаружены и некультивируемые формы клеток *V. cholerae* O1, содержащие гены *ctxAB* и *tcpA* [22, 23].

Высшие ракообразные являются важным объектом промысла во многих странах, и ассоциация *V. cholerae* с ними объясняет случаи заражения холерой при употреблении в пищу морепродуктов [2]. E.K. Lipp с соавт. [24] указывают, что помимо непосредственного пребывания *V. cholerae* в воде, его распространение также может быть связано с переносчиком или хозяином, так как присутствие ракообразных значительно повышает количество *V. cholerae* в воде.

Обнаруженные симбиотические взаимоотношения между холерными вибрионами и ракообразными имеют важное медицинское значение. Исследователями показано, что один планктонный

рачок может нести $10^4 - 10^6$ клеток *V. cholerae*, что превышает минимальную инфицирующую дозу, и поэтому случайное проглатывание нескольких ракообразных с неочищенной питьевой водой может вызвать заражение [24]. Наблюдениями в эпидемических районах показано, что фильтрация воды через нейлоновые фильтры и ткань сари, из которой делают традиционные национальные женские костюмы в Индии и Бангладеш, позволяет снизить заболеваемость холерой в сельской местности почти в два раза. Использование сари, сложенной в несколько слоев, удается отфильтровывать частицы размером более 20 мкм планктонных ракообразных и колониальные формы водорослей [25].

Замечена корреляция вспышек холеры с массовым размножением планктонных ракообразных в Бангладеш [26]. Предполагают, что ассоциация с зоопланктоном обуславливает высокую частоту изоляции *V. cholerae* в летние периоды в водоемах различных широт [19, 27 – 30].

Основой взаимодействия холерных вибрионов с ракообразными является хитин – гомополимер β -1,4-связанных остатков N-ацетил-D-глюкозамина, служащий не только поверхностью для колонизации и источником углерода и азота, но и индуктором состояния компетентности рецепторов микробной клетки к поглощению ДНК, присутствующей в окружающей среде, посредством процесса, известного как природная ДНК-трансформация, или горизонтальный перенос генов [31]. В частности, показано, что хитин индуцирует замену целого кластера генов, кодирующих синтез O1-специфического антигена, в клетках *V. cholerae* O1 El-Tor [32]. Более того, переноситься подобным образом могут СТХ профаг [33] и кластеры генов, кодирующие ферменты утилизации маннозы и диглюкозамина [34]. Механизмы этих процессов находятся в стадии изучения [31, 35 – 37] и заслуживают отдельного рассмотрения. Здесь же достаточно упомянуть, что в основе взаимодействия холерных вибрионов с ракообразными лежит продукция хитиназ, с помощью которых *V. cholerae* гидролизует хитин до олигосахаридов и дисахарида N-ацетил-D-глюкозамина [38].

Таким образом, взаимодействие *V. cholerae* с хитином ракообразных предоставляет микроорганизму ряд преимуществ, включая обеспечение питательными веществами, поверхностью для роста, размножения и образования биопленки, приобретение устойчивости к стрессовым воздействиям и защиту от поедания хищными организмами. Хитин, способствуя распознаванию и поглощению ДНК клетками *V. cholerae*, может стимулировать эволюционные преобразования *V. cholerae* и возникновение новых генетических вариантов патогенных штаммов.

***V. cholerae* и представители Protozoa.** Предполагается, что простейшие могут служить резервуаром для патогенных бактерий в почвенных и водных экосистемах, обеспечивая выживание в межэпиде-

мический период и сохранение определенной численности патогенных бактерий, а также участвуя в формировании эпидемически значимых вариантов возбудителей сапронозов во внешней среде.

В исследовании S. Thom с соавт. [39] продемонстрирована способность холерных вибрионов к росту и размножению в клетках амеб *Acanthamoeba polyphaga* и *Naegleria gruberi*, сохранению микроорганизмов при образовании цист и эксцистировании простейших. Кроме того, позже было показано, что *V. cholerae* O139 [40] и *V. cholerae* O1 [41] выживают и размножаются внутри *A. castellanii*, не вызывая при этом гибели амеб.

Изучение взаимоотношений *V. cholerae* O1 с инфузориями *Tetrahymena pyriformis* (отряд *Hymenostomatida*, подкласс *Holotrichia*) показало рост численности микробов за счет размножения устойчивых к фагоцитозу, сопровождающийся постепенным отмиранием тетрахимен [42]. В работе В.И. Погорелова [10] по изучению взаимодействия холерных вибрионов с простейшими в качестве модели использовалась аксеническая культура *T. pyriformis*. Результаты проведенных опытов продемонстрировали, что холерные вибрионы разной вирулентности длительно сохраняют жизнеспособность при совместном культивировании с инфузориями, служащими естественными хозяевами патогенных вибрионов.

В экологических взаимоотношениях патогенных бактерий, в том числе *V. cholerae*, и различных представителей протистофауны можно выделить общие закономерности: в процессе фагоцитоза большинство клеток исходно гетерогенной по устойчивости к перевариванию бактериальной популяции утилизируется, но отдельные особи в результате незавершенного фагоцитоза размножаются и, накапливаясь в фагосомах и в эндоплазме простейших, вызывают лизис клеток хозяина и выходят в окружающую среду [43].

Можно предположить, что цисты простейших, образующиеся в неблагоприятных условиях (при пересыхании или замерзании водоема) и сохраняющиеся до нескольких лет, могут обеспечить распространение патогена на значительные расстояния, так как в них благодаря прекращению фагоцитоза в стадии инцистирования могут сохраняться как вирулентные, так и авирулентные бактериальные клетки. Кроме того, результаты ряда исследований указывают на важную роль протозойно-бактериальных сообществ в обеспечении защиты патогенных и условно-патогенных микроорганизмов от воздействия дезинфицирующих агентов, таких как хлор [44]. Вероятно, внутриклеточная персистенция холерных вибрионов в водной окружающей среде также защищает эти микроорганизмы от дезинфицирующих веществ или микробного антагонизма, подобно хитину ракообразных.

Простейшие могут способствовать индукции реверсии некультивируемых форм бактерий во внешней среде [45]. Возобновление роста и частичное восстановление видоспецифических при-

знаков у некультивируемых форм *V. cholerae* получено в микрокосмах с разрушенными инфузориями *Paramecium caudatum*, водорослями *Scenedesmus quadricauda* и их экзометаболитами. Однако живые водоросли и инфузории препятствуют реверсии некультивируемых клеток [46].

V. cholerae и амфибиотические насекомые.

В ряде работ есть указания на роль яйцевых масс хирономид (комары-звонцы, *Diptera, Chironomidae*) в экологии *V. cholerae* [47, 48]. Личинки хирономид составляют основу зообентоса континентальных водоемов, а также способны существовать в литоральной зоне морей. Самки хирономусов откладывают в воду яйцевые массы, содержащие сотни яиц, покрытых слоем студенистого материала. М. Broza с соавт. [47] установили, что яйцевые массы хирономусов являются резервуаром *V. cholerae* в окружающей среде.

Показано [48], что *V. cholerae* O1, O139 и O9 серогрупп разлагают студенистую оболочку яиц хирономусов и не дают им дальше развиваться. Внеклеточным фактором, ответственным за деградацию яйцевых масс хирономид, оказалась секретиримая холерным вибрионом гемагглютинин-протеаза (НА/Р), субстратом для которой является гликопротеин яйцевых масс. Сравнительное изучение штаммов *V. cholerae* O1 и его мутанта по гену *hap* обнаружило, что последний не может разрушать кладки яиц комаров, и это подтверждает роль НА/Р в деградации яйцевых масс. Следует отметить, что гемагглютинин-протеаза (муциназа) используется холерным вибрионом для его открепления от эпителиоцитов тонкого кишечника за счет разрушения рецепторов различных гемагглютинин/адгезинов *V. cholerae* на поверхности слизистой, что обеспечивает выведение вибрионов из организма хозяина во внешнюю среду [49]. Кроме того, продукция в большом количестве гемагглютинин-протеазы определенными штаммами *V. cholerae* может являться фактором, предотвращающим их инфицирование фагом СТХ в окружающей среде и в организме человека. НА/Р также гидролизует фибронектин и муцин, расщепляет лактоферрин, которые входят в состав слизи, покрывающей эпителиальные клетки кишечника, лишая тем самым хозяина неспецифических механизмов защиты.

В исследованиях, проведенных в Израиле М. Halpern с соавт. (2004 г.), среди бактерий, выделенных от хирономусов, было идентифицировано тридцать пять различных серогрупп *V. cholerae*, при этом обнаружено, что пики численности популяции этих двукрылых насекомых сопровождаются последующим ростом численности вибрионов [50]. У *V. cholerae* не O1/O139, способных к деградации яйцевых масс, обнаружены гены, связанные с вирулентностью: *hapA* (100%), *toxR* (100%), *hlyA* (72%) и *ompU* (28%) [51]. Замечено также, что популяционные взаимоотношения между насекомыми и холерными вибрионами имеют характер типа «паразит–хозяин».

В полевых и лабораторных экспериментах М. Broza с соавт. [52] была зафиксирована передача *V. cholerae* насекомыми в стадии имаго из водной окружающей среды в резервуары с водой без бактерий. Исследователи предположили, что воздушная передача летающими хирономусами холерных вибрионов может также играть роль в распространении *V. cholerae* в природе. Однако в свое время Е.К. Lipp с соавт. [24], анализируя данные по Бангладеш, отмечали лишь незначительное количество яичных масс этих насекомых в водоемах, поэтому взаимосвязи между кладками яиц и эпидемиями холеры не установлено.

V. cholerae и водоплавающие птицы. Неоднократно было показано, что водоплавающие птицы способны служить переносчиками холерных вибрионов. *V. cholerae*, попавшие в кишечник птиц при поедании ими беспозвоночных, рыб и земноводных, могут переноситься во время перелетов на большие расстояния, чем, вероятно, объясняется обнаружение холерных вибрионов в водоемах, редко посещаемых человеком и удаленных от мест, где происходит постоянная циркуляция патогена.

В материале от птиц *V. cholerae* обнаружен в ряде южных штатов США. Так, холерный вибрион изолирован из помета 20 видов водоплавающих птиц в Колорадо и Юте во второй половине 1980-х годов. [53]. *V. cholerae* O1 биовара El-Tor сероварианта Ogawa выделен от цапель *Ardea herodias* и чаек *Larus delawarensis*, а также из образцов помета других птиц (*Larus californicus*, *Fulica americana*, *Phalacrocorax auritus*). В большинстве проб выявлены вибрионы не O1/O139, при этом одна особь могла нести больше чем одну серогруппу холерного вибриона. При исследовании проб, взятых от птенцов, показано, что водоплавающие птицы могут инфицироваться и становиться переносчиками этого микроорганизма уже в раннем возрасте.

В отечественных исследованиях продемонстрировано, что частота находок вибрионов среди особей различных отрядов птиц наиболее высока среди гусеобразных, чаек и куликов. *V. cholerae* не O1/O139 выделяются и от некоторых представителей врановых (сорок, ворон, грачей), обитающих в пределах поймы реки [54]. В значительно меньшей степени заражены вибрионами некоторые виды пастушковых, которые питаются в основном растительными кормами. Важно отметить, что характерной чертой питания этих птиц является постоянное или эпизодическое поедание ими гидробионтов.

В работе J.E. Ogg с соавт. (1989 г.) увеличение частоты изоляции *V. cholerae* весной также связывалось с возвращением мигрирующих водоплавающих птиц в северные широты [53].

Высокая степень зараженности рыбоядных и околородных птиц холерными вибрионами может играть значительную роль в расширении границ пораженных вибрионами водных источников, так как птицы могут служить связующим звеном между водоемами разных стран и континентов, в том чис-

ле и эндемичных по холере областей Южной и Юго-Восточной Азии [55].

V. cholerae и рыбы. При микробиологическом мониторинге в летне-осенний период поверхностных водоемов г. Иркутска нетоксигенный холерный вибрион Эль-Тор выделен из кишечника карася (*Carassius carassius*) на 1,5 мес раньше, чем обнаружен в поверхностном слое воды этого же водоема, что подтверждает роль рыб в экологии холерного вибриона [56]. Причиной возникновения вспышки холеры на Украине (33 больных, 24 вибрионосителя) в 2011 году стал завоз холеры из-за рубежа на территорию Мариуполя в первой декаде мая 2011 года, что привело к контаминации (в результате сброса неочищенных хозяйственно-бытовых сточных вод г. Мариуполя) воды и рыбы реки Кальмиус и далее – Азовского моря токсигенным холерным вибрионом Эль-Тор [57]. Заражение больных происходило преимущественно при обработке свежельвленной рыбы в местах несанкционированного сброса сточных вод или при употреблении изготовленных из нее блюд [58].

Таким образом, существует обширная доказательная база, собранная исследователями за период седьмой пандемии холеры, которая подтверждает решающее значение в экологии вибриона Эль-Тор поверхностных водоемов с компонентами экосистемы, существенно влияющих на основные эндемические и эпидемические закономерности холеры, которые невозможно не учитывать [59].

Водный характер вспышек холеры в Сибири и на Дальнем Востоке России, связанный с попаданием токсигенного холерного вибриона в водоемы посредством заноса, дальнейшего сохранения и накопления возбудителя до инфицирующих доз обосновывает роль организма человека как источника инфекции и подтверждает антропонозную природу болезни. Однако обнаружение холерного вибриона в кишечнике рыб, а также у водоплавающих птиц говорит и о роли зоонозного компонента в фазе резервации и эпидемического распространения этого заболевания. Многообразные связи холерного вибриона в составе пищевых цепей водных экосистем раскрывают механизмы резервации, с помощью которых осуществляется поддержание жизнедеятельности популяции возбудителя инфекции. Небезынтересно отметить существование взгляда исследователей на первичность функции вирулентности вибрионов, необходимой для успешной конкуренции с хищными простейшими в водной среде, в сравнении с подобной функцией для реализации патогенного потенциала в организме человека [27, 60].

Представленные в настоящем обзоре материалы, касающиеся связи холерного вибриона с водными организмами и ее значения в эпидемиологии холеры, подтверждают точку зрения А.Б. Белова (2013 г.) о целесообразности введения в классификацию инфекционных болезней дополнительных классов (подклассов) и отнесения холеры в раздел сапрозооантропонозов [8]. ■

Литература

- Rosenberg C.E. The Cholera Years: The United States in 1832, 1849 and 1866. Chicago: The University of Chicago Press; 1962.
- Sathiyamurthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Microbiol. Res. J.* 2013; 3 (4): 538 – 549.
- Беляков В. Д., Яфаев Р. Х. Эпидемиология: Учебник. Москва: Медицина; 1989.
- Зуева Л., Яфаев Р. Эпидемиология. Санкт-Петербург: Фолиант; 2006.
- Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник для ВУЗов. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
- Литвин В. Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарёва В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. Москва: Фармарус принт; 1998.
- Сергеев В.И. Эколого-эпидемиологическая классификация инфекционных и паразитарных болезней человека: проблемы и пути решения. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2002; 2: 54 – 57.
- Белов А.Б. Вероятные перспективы развития экологической классификации инфекционных болезней человека по резервуарам возбудителей. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2013; 1 (68): 6 – 14.
- Lederberg J., Shope R.E., Oaks S.C. Emerging infections: microbial threats to health in the United States. Washington, D.C.: National Academy Press; 1992.
- Погорелов В.И. Оценка экологических факторов, влияющих на циркуляцию вибрионов эльтор в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока: Дис. ... канд. мед. наук. Иркутск; 1997: 171.
- Spira W.M., Huq A., Ahmed Q.S., Saeed Y.A. Uptake of *Vibrio cholerae* biotype *eltor* from contaminated water by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Appl. Environ. Microbiol.* 1981; 42 (3): 550 – 553.
- Bhanumathi R., Sabeena F., Isac S.R., Shukla B.N., Singh D.V. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69 (4): 2389 – 2394.
- Islam M.S., Drasar B.S., Bradley D.J. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84 (3): 422 – 424.
- Максимов А.Ю., Ремезовская Н.Б., Демаков В.А. Влияние флавоноидов на экологию энтеробактерий. *Экология.* 2003; 2: 121 – 125.
- Bartlett D.H., Azam F. Chitin, cholera, and competence. *Science.* 2005; 310 (5755): 1775 – 1777.
- Elhadi N., Radu S., Chen C.H., Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J. Food Prot.* 2004; 67 (7): 1469 – 1475.
- Huq A., Huq S.A., Grimes D.J., O'Brien M., Chu K.H., Capuzzo J.M., Colwell R.R. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 52 (3): 586 – 588.
- Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45 (1): 275 – 283.
- Martinelli Filho J.E., Lopes R.M., Rivera I.N.G., Colwell R.R. *Vibrio cholerae* O1 detection in estuarine and coastal zooplankton. *J. Plankton Res.* 2011; 33 (1): 51 – 62.
- Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M. et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2012; 2: 1 – 8.
- Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (24): 7926 – 7933.
- Shukla B.N., Singh D.V., Sanyal S.C. Attachment of non-culturable toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995; 12 (2): 113 – 120.

23. Binsztein N., Costagliola M.C., Pichel M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (12): 7481 – 7486.
24. Lipp E.K., Hug A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious diseases: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (4): 757 – 770.
25. Colwell R.R., Huq A., Islam M.S. et al. Reduction of cholera in Bangladesh villages by simple filtration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100 (3): 1051 – 1055.
26. Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A., Morris J.G., Khan M.N., Siddique A.K., Yunus M., Albert M.J., Sack D.A., Colwell R.R. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71 (8): 4645 – 4654.
27. Литвин В.Ю. Экосистемный пусковой механизм эпидемического проявления сапронозов (на примере холеры Эль-Тор). *Журн. микробиол.* 1996; 3: 11 – 15.
28. Литвин В.Ю., Марамович А.С., Гинцбург А.Л. Стратегия адаптивной изменчивости холерных вибрионов в природных водоемах. *Вестник РАМН.* 2001; 11: 20 – 24.
29. Марамович А.С., Пинигин А.Ф., Ганин В.С., Осауленко О.В. Сапрофитическая фаза в экологии холерного вибриона. *Экология возбудителей сапронозов: Сб. науч. тр. Москва: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи; 1988: 52 – 65.*
30. Goncalves E.G., Lopes M.J., de Oliveira E.G., Hofer E. Associaca o de *Vibrio cholerae* com o zooplancton de guasaestu rias da Baia de Sao Marcos/Soo Luis – MA, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37 (4): 318 – 323.
31. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science.* 2005; 310 (5755): 1824 – 1827.
32. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3 (6): e81. Doi: 10.1371/journal.ppat.0030081.
33. Udden S.M., Zahid M.S., Biswas K., Ahmad Q.S., Cravioto A., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105 (33): 11951 – 11956.
34. Miller M.C., Keymer D.P., Avelar A., Boehm A.B., Schoolnik G.K. Detection and transformation of genome segments that differ within a coastal population of *Vibrio cholerae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (11): 3695 – 3704.
35. Blokesch M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. *Environ. Microbiol.* 2012; 14 (8): 1898 – 1912.
36. Dalia A.B., Lazinski D.W., Camilli A. Identification of a membrane-bound transcriptional regulator that links chitin and natural competence in *Vibrio cholerae*. *MBio.* 2014; 5 (1): e01028-13. Doi: 10.1128/mBio.01028-13.
37. Yamamoto S., Mitobe J., Ishikawa T., Wai S.N., Ohnishi M., Watanabe H., Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2014; 91 (2): 326 – 347.
38. Bhowmick R., Ghosal A., Chatterjee N.S. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae* J. *Appl. Microbiol.* 2007; 103 (1): 97 – 108.
39. Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* 1992; 36 (5): 303 – 306.
40. Abd H., Weintraub A., Sandstrom G. Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ. Microbiol.* 2005; 7 (7): 1003 – 1008.
41. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60 (1): 33 – 39.
42. Михайлова А.Е., Хайтович А.Б. Факторы сохранения холерных вибрионов в водоемах. *Журн. микробиол.* 2000; 6: 99 – 104.
43. Пушкарева В.И. Паразитизм в простейших как стратегия существования патогенных бактерий в почвах и водоемах. *Успехи совр. биол.* 2006; 126 (4): 323 – 333.
44. King C.H., Shotts E.B., Wooley R.E., Porter K.G. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988; 54 (12): 3023 – 3033.
45. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17 (2): 413 – 433.
46. Соколенко А.В., Ломов Ю.М., Титова С.В., Миронова А.В., Меншикова Е.А. Динамика обратимого перехода холерного вибриона в НС в присутствии органических и неорганических компонентов микрокосма. *Журн. микробиол.* 2005; 4: 27 – 32.
47. Broza M., Gancz H., Halpern M., Kashi Y. Adult non-biting midges: possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. *Environ. Microbiol.* 2005; 7 (4): 576 – 585.
48. Halpern M., Gancz H., Broza M., Kashi Y. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease degrades chironomid egg masses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69 (7): 4200 – 4204.
49. Смирнова Н.И. Адгезины *Vibrio cholerae*: фенотипический анализ и генетический контроль синтеза. *Молекуляр. ген.* 1995; 6: 18 – 26.
50. Halpern M., Broza Y. B., Mittler S. et al. Chironomid egg masses as a natural reservoir of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 in freshwater habitats. *Microb. Ecol.* 2004; 47 (4): 341 – 349.
51. Halpern M., Raats D., Lavion R., Mittler S. Dependent population dynamics between chironomids (nonbiting midges) and *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006; 55 (1): 98 – 104.
52. Broza M., Halpern M. Pathogen reservoirs: chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2001; 412 (6842): 40.
53. Ogg J.E., Ryder R.R., Smith H.L. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55: 95-99.
54. Мухамедов С.М., Ривкус Ю.З., Митропольский О.В. Выделение неагглютинирующихся вибрионов от птиц в долине реки Сырдарья. *Матер. VII Науч. конф. Алма-Ата; 1971: 472, 473.*
55. Ривкус Ю.З., Митропольский О.В., Семиотрочев В.Л. Циркуляция вибрионов эльтор как природное явление. *Актуальные вопросы патогенеза, диагностики, клиники и профилактики бактериальных инфекций.* Ташкент; 1985: 59 – 62.
56. Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С. Эколого-микробиологические аспекты эпиднадзора за холерой (по материалам Сибири и Дальнего Востока). Saarbr ucken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2013.
57. <http://www.oblscs.donetsk.ua>. (Reference date: 2.04.2014 г.).
58. <http://ria.ru/danger/20110608/385904573.html#13957275440533&message=resize&relto=register&action=addClass&value=registration>. (Reference date: 2.04.2014 г.).
59. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Шкаруба Т.Т. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2009; 2: 21 – 25.
60. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00375.

References

1. Rosenberg C.E. The Cholera Years: The United States in 1832, 1849 and 1866. Chicago: The University of Chicago Press; 1962.
2. Sathiyamurthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Microbiol. Res. J.* 2013; 3 (4): 538 – 549.
3. Belyakov V.D., Yafaev R.H. Epidemiology. Textbook. Moscow: Meditsina; 1989 (in Russian).
4. Zueva L., Yafaev R. Epidemiology. St. Petersburg: Foliant; 2006 (in Russian).
5. Pokrovsky V.I., Pak S.G., Briko N.I., Danilkin B.K. Infectious diseases and epidemiology. Textbook for High Schools. Moscow: GEOTAR-Media; 2007 (in Russian).
6. Litvin V.Yu., Gintsburg A.L., Pushkareva V. I., Romanova Yu.M., Boev B.V. Epidemiological aspects of bacteria ecology. Moscow: Pharmarus print; 1998 (in Russian).
7. Sergevin V.I. Ecological-epidemiological classification of infectious and parasitic human diseases: problems and ways of decision. *Epidemiologiya i Infektsionnie. Bolesni.* 2002; 2: 54 – 57 (in Russian).
8. Belov A.B. Probable prospects of development of ecological classification of human infectious diseases in the causative agent reservoirs. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika.* 2013; 1 (68): 6 – 14 (in Russian).
9. Lederberg J., Shope R.E., Oaks S.C. Emerging infections: microbial threats to health in the United States. Washington, D.C.: National Academy Press; 1992.
10. Pogorelov V.I. Estimation of the ecological factors influencing on *Vibrio cholerae* El Tor circulation in surface water reservoirs in Siberia and the Far East: Doctorate of med. sci. diss. Irkutsk: 1997: 171 (in Russian).
11. Spira W.M., Huq A., Ahmed Q.S., Saeed Y.A. Uptake of *Vibrio cholerae* biotype *eltor* from contaminated water by water hyacinth (*Eichornia crassipes*). *Appl. Environ. Microbiol.* 1981; 42 (3): 550 – 553.
12. Bhanumathi R., Sabeena F., Isac S.R., Shukla B.N., Singh D.V. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69 (4): 2389 – 2394.

13. Islam M.S., Drasar B.S., Bradley D.J. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84 (3): 422 – 424.
14. Maksimov A.Yu., Remezovskaya N.B., Demakov V.A. Influence of flavonoids on enterobacteria ecology. *Ecologiya*. 2003; 2: 121 – 125 (in Russian).
15. Bartlett D.H., Azam F. Chitin, cholera, and competence. *Science*. 2005; 310 (5755): 1775 – 1777.
16. Elhadi N., Radu S., Chen C.H., Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. *J. Food Prot.* 2004; 67 (7): 1469 – 1475.
17. Huq A., Huq S.A., Grimes D.J., O'Brien M., Chu K.H., Capuzzo J.M., Colwell R.R. Colonization of the gut of the blue crab (*Callinectes sapidus*) by *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 52 (3): 586 – 588.
18. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45 (1): 275 – 283.
19. Martinelli Filho J.E., Lopes R.M., Rivera I.N.G., Colwell R.R. *Vibrio cholerae* O1 detection in estuarine and coastal zooplankton. *J. Plankton Res.* 2011; 33 (1): 51 – 62.
20. Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M. et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2012; 2: 1 – 8.
21. Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (24): 7926 – 7933.
22. Shukla B.N., Singh D.V., Sanyal S.C. Attachment of non-culturable toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995; 12 (2): 113 – 120.
23. Binsztajn N., Costagliola M.C., Pichel M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 (12): 7481 – 7486.
24. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious diseases: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (4): 757 – 770.
25. Colwell R.R., Huq A., Islam M.S. et al. Reduction of cholera in Bangladesh villages by simple filtration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (3): 1051 – 1055.
26. Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A., Morris J.G., Khan M.N., Siddique A.K., Yunus M., Albert M.J., Sack D.A., Colwell R.R. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71 (8): 4645 – 4654.
27. Litvin V.Yu. Ecosystemic starting mechanism of epidemic manifestation of sapronoses (on an example of cholera El-Tor). *Zhurn. mikrobiol.* 1996; 3: 11 – 15 (in Russian).
28. Litvin V.Yu., Maramovich A.S., Gintsburg A.L. Strategy of *Vibrio cholerae* adaptive variability in natural water reservoirs. *Vestnik of the Russian Academy of Medical Science*. 2001; 11: 20 – 24 (in Russian).
29. Maramovich A.S., Pinigin A.F., Ganin V.S., Osaulenko O.V. Saprophytic phase in *Vibrio cholerae* ecology. Ecology of sapronoses causative agents. Collected papers, Research Institute of Epidemiology and Microbiology of N.F. Gamaleya, 1988: 52 – 65 (in Russian).
30. Goncalves E.G., Lopes M.J., de Oliveira E.G., Hofer E. Associaçao de *Vibrio cholerae* com o zooplankton de guasaestu rias da Baia de Sao Marcos/Soo Luis – MA, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37 (4): 318 – 323.
31. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*. 2005; 310 (5755): 1824 – 1827.
32. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3 (6): e81. Doi: 10.1371/journal.ppat.0030081.
33. Udden S.M., Zahid M.S., Biswas K., Ahmad Q.S., Cravioto A., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105 (33): 11951 – 11956.
34. Miller M.C., Keymer D.P., Avelar A., Boehm A.B., Schoolnik G.K. Detection and transformation of genome segments that differ within a coastal population of *Vibrio cholerae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (11): 3695 – 3704.
35. Blokesch M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin-induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression. *Environ. Microbiol.* 2012; 14 (8): 1898 – 1912.
36. Dalia A.B., Lazinski D.W., Camilli A. Identification of a membrane-bound transcriptional regulator that links chitin and natural competence in *Vibrio cholerae*. *MBio*. 2014; 5 (1): e01028-13. Doi: 10.1128/mBio.01028-13.
37. Yamamoto S., Mitobe J., Ishikawa T., Wai S.N., Ohnishi M., Watanabe H., Izumiya H. Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2014; 91 (2): 326 – 347.
38. Bhowmick R., Ghosal A., Chatterjee N.S. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae* J. *Appl. Microbiol.* 2007; 103 (1): 97 – 108.
39. Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* 1992; 36 (5): 303 – 306.
40. Abd H., Weintraub A., Sandstrom G. Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ. Microbiol.* 2005; 7 (7): 1003 – 1008.
41. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007; 60 (1): 33 – 39.
42. Mikhailova A.E., Hajtovich A.B. Factors of *Vibrio cholerae* preservation in water reservoirs. *Zhurn. mikrobiol.* 2000; 6: 99 – 104 (in Russian).
43. Pushkareva V.I. Parasitism in protozoan as strategy of pathogenic bacteria existence in soils and water reservoirs. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2006; 126 (4): 323 – 333 (in Russian).
44. King C.H., Shotts E.B., Wooley R.E., Porter K.G. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988; 54 (12): 3023 – 3033.
45. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17 (2): 413 – 433.
46. Sokolenko A.V., Lomov Yu.M., Titova S.V., Mironova A.B., Menshikova E.A. Dynamic of *Vibrio cholerae* reversible transition in nonculturable state in the presence of organic and inorganic microcosm components. *Zhurn. Mikrobiol.* 2005; 4: 27 – 32 (in Russian).
47. Broza M., Gancz H., Halpern M., Kashi Y. Adult non-biting midges: possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. *Environ. Microbiol.* 2005; 7 (4): 576 – 585.
48. Halpern M., Gancz H., Broza M., Kashi Y. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease degrades chironomid egg masses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69 (7): 4200 – 4204.
49. Smirnova N.I. *Vibrio cholerae* adhesins: phenotypic analysis and genetic control of synthesis. *Molekul. Gen.* 1995; 6: 18 – 26 (in Russian).
50. Halpern M., Broza Y. B., Mittler S. et al. Chironomid egg masses as a natural reservoir of *Vibrio cholerae* non-O1 and non-O139 in freshwater habitats. *Microb. Ecol.* 2004; 47 (4): 341 – 349.
51. Halpern M., Raats D., Lavion R., Mittler S. Dependent population dynamics between chironomids (nonbiting midges) and *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006; 55 (1): 98 – 104.
52. Broza M., Halpern M. Pathogen reservoirs: chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2001; 412 (6842): 40.
53. Ogg J.E., Ryder R.R., Smith H.L. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55: 95 – 99.
54. Mukhamedov S.M., Rivkus Yu.Z., Mitropolsky O.V. Isolation of non-agglutinating vibrios from birds in a valley of Syr-Darya river. *Materials of VII Sci. Conference. Alma-Ata*; 1971: 472, 473 (in Russian).
55. Rivkus Yu.Z., Mitropolsky O.V., Semiotrochev V.L. Circulation of *Vibrio cholerae* as the natural phenomenon. *Actualnye voprosy patogenez, diagnostiki, kliniki i profilaktiki bakterialnykh infektsii*. Tashkent; 1985: 59 – 62 (in Russian).
56. Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S. Ecological microbiological aspects of epidemiological surveillance for cholera (in Siberia and the Far East). Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing. 2013 (in Russian).
57. <http://www.oblss.donetsk.ua>. (Reference date: 2.04.2014 r.).
58. <http://ria.ru/danger/20110608/385904573.html#13957275440533&message=resize&relto=register&action=addClass&value=registration>. (Reference date: 2.04.2014 r.).
59. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Shkaruba T.T. Role and value of surface water reservoirs in formation and development of VII cholera pandemic. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2009; 2: 21 – 25 (in Russian).
60. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. Doi: 10.3389/fmicb.2013.00375.

Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям и сибирской язве на территориях Приамурья, пострадавших от паводка 2013 года, и прогноз на 2014 год

А.К. Носков (noskov-epid@mail.ru), С.В. Балахонов, З.Ф. Дугаржапова, М.В. Чеснокова, С.А. Косилко, Е.И. Андаев, В.А. Вишняков, Н.В. Бренева, С.А. Татарников, Г.В. Вдовиченко, Н.В. Яковчиц, М.Б. Шаракшанов, Е.А. Вершинин, А.Я. Никитин, С.А. Борисов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

Ретроспективный анализ эпидемиологической ситуации по природно-очаговым инфекциям и сибирской язве на территории Приамурья, пострадавшей от дождевого паводка 2013 года, показал, что в период, предшествовавший чрезвычайной ситуации, на территории Амурской области, Хабаровского края и Еврейской автономной области сохранялась стабильно благополучная эпидемиологическая ситуация по этой группе болезней, с регистрируемым уровнем заболеваемости ниже среднего по стране. Результаты эпизоотолого-эпидемиологического обследования подвергшихся паводку и прилегающих к ним территорий дают основание для прогноза, что серьезные изменения в эпидемиологической ситуации по туляремии и инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами, в ближайший послепаводковый период в Приамурье маловероятны. Это же можно констатировать и в отношении сибирской язвы, однако в связи с подтоплением некоторых сибиреязвенных захоронений в Еврейской автономной области не исключается вероятность возникновения локальных эпизоотических очагов. Прогнозируется умеренный рост заболеваемости лептоспирозами и геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Хабаровском крае и Еврейской автономной области.

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, сибирская язва, Амурская область, Хабаровский край, Еврейская автономная область, дождевой паводок, чрезвычайная ситуация

Epidemiological Situation for Natural-Focal Infections and Anthrax in Fore-Amur Territories Suffered from a High Water in 2013 and the Forecast for 2014

A.K. Noskov (noskov-epid@mail.ru), S.V. Balakhonov, Z.F. Dugarzhapova, M.V. Chesnokova, S.A. Kosilko, E.I. Andaev, V.A. Vishnyakov, N.V. Breneva, S.A. Tatarnikov, G.V. Vdovichenko, N.V. Yakovchits, M.B. Sharakshanov, E.A. Vershinin, A.Ya. Nikitin, S.A. Borisov
Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

Retrospective analysis of an epidemiological situation for natural-focal infections and anthrax in Fore-Amur territory suffered from a rain high water in 2013 showed that stably safe epidemiological situation for this group of diseases with registered level of morbidity below the average index in the country remained at the period previous to the emergency situation in the Amur region, Khabarovsk territory and the Jewish autonomous region. Results of epizootic-epidemiological inspection of the flood suffered and adjoining territories demonstrated that serious epidemiological complications for tularemia and ixodes tick-borne infections were improbable in the nearest after-flood period in Fore-Amur region. The epidemiological situation for anthrax in these subjects was also characterized as safe. However, the probability of local epizootic foci occurrence is not excluded due to flooding of some anthrax burial places in the Jewish autonomous region. Moderate increase of leptospiroses and hemorrhagic fever with renal syndrome morbidity is predicted in Khabarovsk territory and the Jewish autonomous region.

Key words: natural-focal infection, anthrax, Amur region, Khabarovsk territory, Jewish autonomous region, a rain high water, emergency situation

Введение

В конце июля 2013 года на фоне обильных муссонных дождей и циклонических ливней начался стремительный подъем уровня воды в Амуре и его притоках, что привело к крупномасштабному паводку в бассейне реки, затронувшему Амурскую об-

ласть, Хабаровский край и Еврейскую автономную область (Еврейская АО).

Наводнение в Амурской области достигло пика 17 августа, в зону чрезвычайной ситуации попали 22 из 28-ми муниципальных образований, 126 населенных пунктов, пострадали более 350 объектов

социального назначения, в том числе здравоохранения. Всего число потерпевших в области превысило 127 тысяч человек, из них 16 тысяч были эвакуированы [1].

Пик подъема воды в районе Хабаровска пришелся на 3 – 5 сентября. В зону паводка попал 61 населенный пункт в девяти муниципальных районах края, где было подтоплено 2065 жилых домов, 2488 приусадебных участков с общим числом проживающих – 17 708 человек, из них эвакуировано более 3600 [2].

В Еврейской автономной области в зону паводка попало шесть муниципальных районов, подтоплено около 1500 жилых домов, 5500 приусадебных участков и 41 объект социального назначения, в том числе 11 учреждений здравоохранения в 27-ми населенных пунктах. Пострадало около 61% населения автономной области. Из зоны бедствия было эвакуировано 8500 человек [3].

Крупномасштабное наводнение в Приамурье существенно осложнило социально-экономическую обстановку в регионе, значительно ухудшило состояние среды обитания и создало предпосылки для осложнения эпидемиологической ситуации по опасным (сибирская язва, туляремия) и другим природно-очаговым инфекционным заболеваниям (лептоспирозы, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и др.) [4].

Цель работы – эпизоотолого-эпидемиологический анализ ситуации по природно-очаговым инфекциям и сибирской язве на территориях Приамурья, пострадавших от паводка 2013 года, и прогноз на 2014 год.

Материалы и методы

Эпидемиологический анализ по туляремии, лептоспирозам, геморрагической лихорадке с почечным синдромом, клещевому вирусному энцефалиту, иксодовым клещевым боррелиозам, клещевому риккетсиозу, моноцитарному эрлихиозу и гранулоцитарному анаплазмозу человека проведен на основе архивных, ретроспективных и оперативных данных Референс-центра по мониторингу природно-очаговых болезней бактериальной и вирусной этиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института; управлений Роспотребнадзора по Амурской области, Хабаровскому краю, Еврейской автономной области; Хабаровской противочумной станции; Центров гигиены и эпидемиологии в Амурской области, Хабаровском крае и Еврейской автономной области.

Для оценки эпизоотологической ситуации использовались данные, полученные в ходе мероприятий по обследованию зон подтопления в период деятельности специализированных противочумных бригад (СПЭБ) Иркутского научно-исследовательского противочумного института (Амурская область – 1 СПЭБ, Хабаровский край и Еврейская автономная область – 2 СПЭБ). Лабораторное обеспечение деятельности СПЭБ проводилось в рамках Испытательного лабора-

торного центра (аттестат аккредитации № РОСС. RU.0001.517955 от 08.08.2013 г., действителен до 08.08.2018 г.). В зоне стихийного бедствия отработано 1234 человеко-дня, исследовано 3626 проб, из них: 383 – воды, одна – ила, 177 – почвы и один костный фрагмент. Обследовано 25 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), 25 скотомогильников и сибиреязвенных захоронений. В десяти муниципальных образованиях Амурской области, двух – Хабаровского края и пяти – Еврейской АО отловлено и исследовано 1499 особей мелких млекопитающих 17 видов. Лабораторные исследования проводились бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим методами.

Результаты и обсуждение

Туляремия. Территории Амурской области, Хабаровского края и Еврейской автономной области эндемичны по туляремии. Особенностью природных очагов туляремии в Приамурье является их низкая эпидемическая активность, проявляющаяся единичными случаями заболевания людей [5].

В Амурской области в паводковый и послепагодный периоды проведено эпизоотолого-эпидемиологическое обследование на территории десяти муниципальных образований. Лабораторно-диагностические исследования органов грызунов, отловленных в Белогорске и Белогорском районе показали наличие у них антител к возбудителю туляремии в 15,6% и антигена – в 1,6% случаев; в Благовещенске и Благовещенском районе – в 10,6% случаев; в Михайловском районе – в 18,4% случаев. На территории Архаринского, Серышевского, Свободненского, Мазановского и Октябрьского районов серологические исследования дали отрицательный результат. В Хабаровском районе антитела к возбудителю туляремии выявлены у 39,5% мелких млекопитающих, в Хабаровске и его окрестностях – у 3,8%.

В Сидовичском районе (Еврейская АО) ДНК возбудителя туляремии обнаружена у 2,0% обследованных грызунов, а антитела к возбудителю туляремии выявлены у 3,0%, в Биробиджанском районе – у 8,6%, в Ленинском – у 4,5%, в Облученском – у 4,0%.

Исследования показали, что на территориях Приамурья преобладающим видом грызунов является полевая мышь (*Apodemus agrarius*), которая относится ко второй группе млекопитающих по восприимчивости и чувствительности к возбудителю туляремии и, как правило, не вовлекается в активную передачу туляремийного микроба, в том числе при трансмиссивных вспышках. Поэтому серьезные эпидемиологические осложнения по туляремии в Приамурье маловероятны. Однако не исключается возможность возникновения спорадических случаев туляремии среди людей, контактировавших с инфицированными грызунами и продуктами их жизнедеятельности на ограниченных территориях Сидовичского, Ленинского, Облученского, Биробиджанского районов Еврейской АО и в Хабаровске и Хабаровском районе.

Лептоспирозы. Последние случаи заболевания людей в Амурской области зарегистрированы в 1994 году (16 случаев), в Еврейской АО – по одному случаю в 1993, 1996 и 1998 годах. В Хабаровском крае в 2003 – 2012 годах зарегистрировано 55 случаев лептоспирозов. В предшествовавший паводку период эпидемиологическую и эпизоотологическую обстановку по лептоспирозам на территориях зоны затопления можно оценить как стабильно благополучную с отсутствием официально регистрируемой заболеваемости в Амурской области и Еврейской АО на протяжении последних десяти лет и с единичными случаями – в Хабаровском крае на фоне низкой эпизоотической активности природных и антропогенных очагов [6].

В Амурской области при обследовании методом ПЦР в реальном времени 125 почек мелких млекопитающих, отловленных в Благовещенске, Белогорске и Благовещенском районе Амурской области, ДНК/РНК патогенных лептоспир обнаружены в шести случаях (5,7%). При исследовании 140 смывов с органов грудной полости мелких млекопитающих, отловленных в Благовещенске, Белогорске, Благовещенском, Михайловском, Архаринском, Серышевском и Октябрьском районах, специфические антитела к патогенным лептоспирам обнаружены у девяти (6,4%) мелких млекопитающих, отловленных в Благовещенском районе.

В Еврейской АО методом ПЦР обследовано 107 мелких млекопитающих, из которых 45 особей инфицированы (42,1%). Также инфицированы 79,2% мелких млекопитающих, отловленных в Биробиджанском районе, в Ленинском – 58,3%, в Смидовичском – 28,6% и в Облученском – 8,3%. Результаты ПЦР показали чрезвычайно высокую инфицированность носителей лептоспир в Биробиджанском районе. Серологическим методом исследовано 156 смывов с органов грудной полости мелких млекопитающих, отловленных в Биробиджанском и Ленинском районах, положительные результаты получены в 21,3% смывов.

При обследовании 212-ти мелких млекопитающих, отловленных в Хабаровске и Хабаровском районе, у 41 особи (19,3%) в ПЦР получен положительный результат. ДНК патогенных лептоспир обнаружена у 35,4% синантропных грызунов, отловленных в Хабаровске, в Хабаровском районе – у 5,3% мелких млекопитающих. В Хабаровском районе в РМА специфические антитела к патогенным лептоспирам выявлены у 23,4% мелких млекопитающих.

Эпизоотическая обстановка по лептоспирозам в паводковый период оценена как неблагоприятная. Настораживает чрезвычайно высокая инфицированность лептоспирами мелких млекопитающих в Еврейской АО. Развитие эпизоотии связано, вероятно, с интенсивным перемещением животных с подтопленных территорий и увеличением контактов между больными и здоровыми зверьками. Заселение инфицированными зверьками территорий вблизи жилья человека может привести к вовлече-

нию в эпизоотический процесс домашних и сельскохозяйственных животных.

На основании проведенного анализа допустимо прогнозировать умеренный рост заболеваемости лептоспирозами в Хабаровске, Комсомольске-на-Амуре и Хабаровском районе. Не исключается возникновение спорадической заболеваемости людей в Благовещенске и Благовещенском районе Амурской области, а также в Смидовичском, Биробиджанском, Облученском и Ленинском районах Еврейской АО.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС).

С 2003 по 2012 год в Хабаровском крае зарегистрирован 301 случай заболевания людей ГЛСП, среднемноголетний краевой показатель составил 2,1 на 100 тыс. населения. Основное количество больных регистрировалось в Хабаровске, Хабаровском и им. Лазо районах, в Комсомольске-на-Амуре, Комсомольском, Амурском и Вяземском районах.

В Еврейской АО за этот же период отмечено 95 случаев ГЛПС, среднеобластной показатель составил 5,1 на 100 тыс. населения. По муниципальным районам заболевания людей регистрировались в Облученском районе, Биробиджане и Биробиджанском, Ленинском, Октябрьском и Смидовичском районах.

В 1984 году в сходной ситуации, связанной с наводнением на Амуре, сложилась крайне неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по ГЛПС в Хабаровском крае и Еврейской АО. В этот год в Хабаровском крае был зарегистрирован 141 больной, показатель заболеваемости достигал 8,3 на 100 тыс. населения, в зону наибольшего поражения входили Хабаровск и Хабаровский район. В Еврейской АО было зарегистрировано 100 случаев ГЛПС, интенсивный показатель заболеваемости составлял 50,0 на 100 тыс. населения. В основном случаи ГЛПС регистрировались в Биробиджанском, Октябрьском, Ленинском районах и в Биробиджане. Реальный уровень заболеваемости, по-видимому, был выше, так как в 1984 году практически отсутствовали известные сегодня методы лабораторной диагностики ГЛПС и диагноз ставили по клинико-эпидемиологическим данным [7]. В период паводка 2013 года лабораторными методами обследовано 682 мелких млекопитающих 15 видов. В Хабаровском районе у 13,1% восточноазиатских мышей (*Apodemus peninsulae*) и 9,1% красно-серых полевков (*Myodes rufocanus*) из хвойно-широколиственных лесов обнаружены специфические антитела к хантавирусам. В исследуемом материале от мелких млекопитающих с территории луговых комплексов и смешанных лесов у 12,5% больших полевков (*Microtus fortis*) выявлена РНК хантавирусов. У восточноазиатской мыши в 2,4% случаев обнаружена РНК, в одном из двух образцов – антигены вируса, в 9,8% случаев – антитела к хантавирусам. У всех исследованных красно-серых полевков подтверждено наличие антигенов возбудителя и у 11,8% – специфических антител. Антигены возбудителя ГЛПС обнаружены у двух из

четырёх полевых мышей, а у 3,4% – антитела. В материале от животных, добытых на территории Хабаровска, обнаружены антитела к хантавирусам у большой полевки (8,3%) и серой крысы (10,0%).

При исследовании полевого материала с территории Биробиджанского района обнаружены антитела к возбудителю ГЛПС у полевой мыши (19,2%). В Смидовичском районе вирусная РНК выявлена у 9,1% красных полевков, антигены вируса обнаружены в легких 16,7% больших полевков, а антитела – у 12,5% больших полевков и у 7,1% полевых мышей. В Ленинском районе ПЦР-позитивные находки отмечены при исследовании материала от полевой мыши (7,1%), антитела к хантавирусам обнаружены у красной (*Myodes rutilus*) (25,0%) и большой (20,0%) полевков и полевой мыши (10,5%). В Облученском районе выявлена РНК хантавируса при исследовании материала от большой (25,0%) и красной полевков (20,0%), восточноазиатской мыши (12,5%), антитела к возбудителю ГЛПС обнаружены у 12,5% восточноазиатских мышей. В Биробиджанском районе антитела к хантавирусам обнаружены у 19,2% полевых мышей. В Смидовичском районе выявлены: у 16,4% большой полевки – антиген вируса и у 12,5% – специфические антитела, у полевой мыши – антитела (7,1%). В Ленинском районе хантавирусные антитела обнаружены у 7,1% полевых мышей. Также обнаружены антитела у 25,0% красных и 20,0% больших полевков. В Облученском районе 12,5% проб легких восточноазиатской мыши содержали антиген возбудителя ГЛПС.

Анализ ретроспективных данных о заболеваемости ГЛПС и результаты оперативного мониторинга эпидемиологической обстановки в послепаводковый период свидетельствуют о возможном осложнении эпидемиологической ситуации по этой инфекции во всех муниципальных районах и городских округах, подвергшихся подтоплению и граничащих с ними: Хабаровске, Хабаровском, Вяземском, Найнском, Комсомольском, Амурском, им. Лазо, Бикинском, Ульском, Николаевском районах, Биробиджане, Биробиджанском, Ленинском, Смидовичском, Октябрьском и Облученском районах.

Природно-очаговые инфекции, передаваемые иксодовыми клещами. На территории Приамурья в пределах ареала иксодовых клещей существуют природные очаги клещевого энцефалита (КЭ), иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), клещевого риккетсиоза (КР), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), гранулоцитарного анаплазмоза (ГАЧ). Наибольшее распространение и эпидемиологическое значение в субъектах, подвергшихся подтоплению, имеют клещевые риккетсиозы и ИКБ.

Риккетсиозы. Наиболее актуальной из всех клещевых инфекций в зоне подтопления является КР. Больше всего случаев заболевания КР в 2012 и 2013 годах пришлось на Хабаровский край: 151 и 166 случаев с показателем 10,8 и 12,4 на 100 тыс. населения; в Еврейской АО – 18 и 15 случаев (10,2 и 8,6 на 100 тыс. населения). В Амурской об-

ласти показатель значительно ниже и составил соответственно 0,8 и 2,1 на 100 тыс. населения.

ИКБ. В Хабаровском крае в 2013 году уровень заболеваемости снизился почти в 2 раза – с 4,6 на 100 тыс. населения (64 случая) в 2012 году до 2,5 на 100 тыс. населения (34 случая). В Еврейской АО также произошло двукратное снижение заболеваемости – с 2,3 до 1,2 на 100 тыс. населения. В Амурской области, напротив, этот показатель увеличился с 0,2 (2 случая) до 1,1 на 100 тыс. населения (9 случаев).

КЭ. Особенностью проявлений эпидемического процесса КЭ стал низкий уровень заболеваемости. В 2013 году показатель заболеваемости на территории Хабаровского края составил 0,07 на 100 тыс. населения (1 случай), что в 5 раз ниже показателя 2012 года (0,37 на 100 тыс. населения). В Еврейской АО в 2013 году заболели два человека, один из них умер, показатель заболеваемости – 1,2 на 100 тыс. населения (2012 г. – 0,5 на 100 тыс. населения). В Амурской области в 2013 году случаев КЭ не зарегистрировано (в 2012 – 2 случая, 0,2 на 100 тыс. населения). В 2013 году в Хабаровском крае вирусофорность клещей, снятых с людей и собранных с объектов окружающей среды, составила соответственно 3,6 и 1,03%, в Еврейской АО – 6,3 и 4,1%, в Амурской области – 1,34 и 0%.

На основании анализа проявлений инфекционных болезней, передаваемых клещами, ухудшения эпидемиологической ситуации в весенне-летний период 2014 года не ожидается, при условии сохранения на прежнем уровне численности мелких млекопитающих, являющихся прокормителями иксодовых клещей. С учетом спорадических проявлений в последние два года вероятно снижение или сохранение уровня заболеваемости ИКБ и КР в Амурской области, удержание на прежнем уровне или небольшое повышение заболеваемости КЭ, ИКБ и КР в Хабаровском крае и Еврейской АО.

Сибирская язва. На территории Приамурья очаги сибирской язвы в основном сконцентрированы вдоль реки Амур и ее притоков. Из 176-ти старых неманифестных (неактивных) стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) наибольшая доля учтена в Амурской области (61,4%), затем в Хабаровском крае (26,1%) и Еврейской АО (12,5%). Последние случаи сибирской язвы отмечались в Еврейской АО в 1964 году, в Хабаровском крае – в 1965 году и в Амурской области – в 1987 году [8].

В настоящее время на территории этих субъектов учтено 345 захоронений и скотомогильников, в том числе 22 сибиреязвенных захоронения в Ленинском (9 СНП), Биробиджанском (8 СНП), Октябрьском (4 СНП) и Смидовичском (1 СНП) районах Еврейской АО. Расположения сибиреязвенных захоронений в Амурской области и Хабаровском крае неизвестны [9, 10].

В период паводка на реке Амур и ее притоках в зоне подтопления и прилегающей к ней территории находились 39 СНП и 25 скотомогильников. Всего в зоне паводка и прилегающей территории в При-

амурье в период чрезвычайной ситуации отобраны 183 пробы и проведено 549 лабораторных исследований (Хабаровский край – 225, Амурская область – 168, Еврейская АО – 156). При исследованиях проб почв скотомогильников и сибиреязвенных захоронений, костных фрагментов сельскохозяйственных животных возбудитель сибирской язвы и его ДНК не обнаружены.

Таким образом, эпизоотическая и эпидемическая ситуация по сибирской язве в этих субъектах характеризуется как относительно благополучная. В то же время, учитывая затопление некоторых скотомогильников и сибиреязвенных захоронений Еврейской АО и неизвестное местоположение почвенных очагов сибирской язвы в Амурской области и Хабаровском крае, в послепаводковый период не исключается возможность возникновения эпизоотических проявлений в локальных очагах сибирской язвы.

Выводы

1. Ретроспективный анализ эпидемиологической ситуации по природно-очаговым инфекциям и сибирской язве на территории Приамурья, пострадавшей от

давшей от дождевого паводка 2013 года, показал, что в период, предшествовавший чрезвычайной ситуации на территории Амурской области, Хабаровского края и Еврейской автономной области, сохранялась стабильно благополучная эпидемиологическая ситуация по этой группе болезней.

2. Результаты эпизоотолого-эпидемиологического обследования подвергшихся паводку и прилегающих территорий показали, что серьезные эпидемиологические осложнения по туляремии и инфекциям, передаваемым иксодовыми клещами, в ближайший послепаводковый период в Приамурье маловероятны.

3. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве характеризуется как благополучная, однако в связи с подтоплением некоторых сибиреязвенных захоронений в Еврейской автономной области существует вероятность возникновения локальных эпизоотических очагов.

4. Не исключается умеренный рост заболеваемости лептоспирозами и геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Хабаровском крае и Еврейской автономной области.

Литература

1. Курганова О.П., Павлова И.И. О мерах по стабилизации эпидемиологической обстановки в условиях чрезвычайной ситуации в Амурской области. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 26 – 29.
2. Отт В.А., Зайцева Т.А., Караванская Т.Н., Гарбуз Ю.А., Троценко О.Е. Организация работы учреждений Роспотребнадзора Хабаровского края по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения в период наводнения в 2013 году. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 33 – 36.
3. Янович В.А., Никулина О.Н., Мироненко Е.С., Ишуткина О.А., Чабан В.В., Бутенко И.С. и др. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Еврейской автономной области во время паводка и в послепаводковый период 2013 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 44 – 46.
4. Балахонov С.В., Косилко С.А., Носков А.К., Михайлов Л.М., Чеснокова М.В., Куликалова Е.С. и др. Итоги работы специализированных противозаразных бригад Иркутского научно-исследовательского противочумного института в Амурской области, Хабаровском крае и Еврейской автономной области в 2013 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 15 – 19.
5. Мазепа А.В., Татарников С.А., Косилко С.А., Носков А.К., Михайлов Л.М., Афанасьев М.В. и др. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по туляремии на юге Дальнего Востока в период паводка 2013 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 102 – 105.
6. Бренева Н.В., Носков А.К., Киселева Е.Ю., Шаракшанов М.Б., Борисов С.А., Курганова О.П. и др. Анализ ситуации по лептоспирозам в Приамурье. Опыт работы в зоне затопления в 2013 г. и прогноз на 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 94 – 98.
7. Онищенко Г.Г., Балахонov С.В., Носков А.К., Иванов Л.И., Троценко О.Е., Отт В.А. и др. Анализ эпидемиологической ситуации по геморрагической лихорадке с почечным синдромом в Хабаровском крае и Еврейской автономной области, прогноз ее развития на послепаводковый период 2013 – 2014 гг. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 56 – 60.
8. Дугаржапова З.Ф., Носков А.К., Михайлов Л.М., Косилко С.А., Кравец Е.В., Балахонov С.В. и др. Прогноз эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве в зоне паводка реки Амур и его притоков на территории Хабаровского края, Амурской и Еврейской автономной областей на 2014 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2014; 1: 98 – 102.
9. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник / Под ред. Б.Л. Черкасского. Москва: ОАО «ИнтерСЭН»; 2005: 829.
10. Перечень скотомогильников (в том числе сибиреязвенных), расположенных на территории Российской Федерации: Информ. издание. Ч. 2. Москва: ФГНБНУ «Росинформагротех»; 2012: 260.

References

1. Kurganova O.P., Pavlova I.I. About measures for stabilization of epidemiological conditions during an emergency situation in the Amur region. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 26 – 29 (in Russian).
2. Ott V.A., Zaitseva T.A., Karavanskaya T.N., Garbuz Yu.A., Trotsenko O.E. The organization of activities of Rospotrebnadzor Institutions in Khabarovsk territory for support of sanitary-epidemiological human well-being during flooding in 2013. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 33 – 36 (in Russian).
3. Yanovich V.A., Nikulina O.N., Mironenko E.S., Ishutkina O.A., Chaban V.V., Butenko I.S. et al. Support of sanitary-epidemiological human well-being in the Jewish autonomous region during a high water and after-flood period in 2013. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 44 – 46 (in Russian).
4. Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Mikhailov L.M., Chesnokova M.V., Kulikalova E.S. et al. Results of activities of specialized anti-epidemic teams from Irkutsk antiplague research institute in the Amur region, Khabarovsk territory and the Jewish autonomous region in 2013. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 15 – 19 (in Russian).
5. Mazepa A.V., Tatarnikov S.A., Kosilko S.A., Noskov A.K., Mikhailov L.M., Afanasiev M.V. et al. Epizootological-epidemiological situation for tularemia at the south of the Far East in a high water period of 2013. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 102 – 105 (in Russian).
6. Breneva N.V., Noskov A.K., Kiseleva E.Yu., Sharakshanov M.B., Borisov S.A., Kurganova O.P., et al. Analysis of leptospirosis situation in Fore-Amur territory. Operational experience in a flooding area in 2013 and the forecast for 2014. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 94 – 98 (in Russian).
7. Onishchenko G.G., Balakhonov S.V., Noskov A.K., Ivanov L.I., Trotsenko O.E., Ott V.A. et al. Analysis of an epidemiological situation for hemorrhagic fever with renal syndrome in Khabarovsk territory and the Jewish autonomous region, the forecast of its development at the after-flooding period in 2013 – 2014. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 56 – 60 (in Russian).
8. Dugarzhapova Z.F., Noskov A.K., Mikhailov L.M., Kosilko S.A., Kravec E.V., Balakhonov S.V. et al. The forecast of an epizootological-epidemiological situation for anthrax in an area of a high water at the Amur river and its inflows in Khabarovsk territory, Amur and Jewish autonomous areas for 2014. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2014; 1: 98 – 102 (in Russian).
9. Cadastre of permanently-unsuccessful anthrax points in the Russian Federation: A directory / Editorship of B.L. Cherkassky. Moscow: Open Society «InterSEN»; 2005: 829 (in Russian).
10. The List of burial ground for animal refuses (including anthrax) located in the Russian Federation territory: An informational publication. P. 2. Moscow: FGNBNU «Rosinformagrotech»; 2012: 260 (in Russian).

Характеристика штамма вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа, изолированного от пациента с прогрессивным течением болезни

Е.И. Андаев¹ (e.andaev@gmail.com), С.И. Беликов² (sergeibelikov47@gmail.com),
Н.В. Кулакова² (ninkul@mail.ru), Т.И. Борисова¹,
Е.А. Сидорова¹ (sidorovavirusolog@yandex.ru)

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

²ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения РАН, г. Иркутск

Резюме

Из крови пациента с диагнозом «клещевой энцефалит, двухволновое течение, энцефалитическая форма, затяжное течение, правосторонний преходящий легко выраженный дистальный нижний монопарез» на 143-и сутки со дня заболевания выделен штамм вируса клещевого энцефалита Irkutsk-12, определенный путем внутримозгового заражения белых мышей и клеточных культур почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Целью данной работы были изучение его биологических свойств и расшифровка полной нуклеотидной последовательности генома. Получена и депонирована в базу данных GenBank полноразмерная последовательность (11 068 н.п.) генома штамма с номером доступа JN003209. Штамм отнесен к сибирскому подтипу – сходство нуклеотидных последовательностей кодирующего региона штамма Irkutsk-12 со штаммом Vasilchenko составило 96,3%, тогда как со штаммами Sofjin-HO (AB062064) и Neudoerfl (U27495) – 85,5 и 84,7% соответственно. Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей штаммов позволило обнаружить 34 аминокислотные замены, по которым штамм Irkutsk-12 отличался от прототипного штамма Vasilchenko. Замены обнаружены во всех белках, кроме капсидного белка С.

Вирулентность штамма для беспородных белых мышей массой 6 – 8 г составила при внутримозговом заражении 8,95 лг ЛД₅₀/мл, при подкожном – 6,24 лг ЛД₅₀/мл, индекс инвазивности – 2,71. Титр вируса на пятые сутки культивирования составил 10^{6,25} ЦПД₅₀/мл. В культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием вирус образует бляшки размером от 2 до 3 мм на пятые сутки.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, сибирский подтип вируса, прогрессивное течение болезни, полногеномное секвенирование

Characterization of a Tick-Borne Encephalitis Virus of the Siberian Subtype Strain Isolated from a Patient with Chronic Disease

E.I. Andaev¹ (e.andaev@gmail.com), S.I. Belikov² (sergeibelikov47@gmail.com), N.V. Kulakova² (ninkul@mail.ru), T.I. Borisova¹,
E.A. Sidorova¹ (sidorovavirusolog@yandex.ru)

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Federal State Budget Institution of Science «Limnological Institute» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk

Abstract

A tick-borne encephalitis virus Irkutsk-12 strain was isolated from blood of a patient with diagnosis «Tick-borne encephalitis, two-wave course, encephalitic form, protracted clinical course, right-hand transient slightly expressed distal foot monoparesis» by intrabrain infection of white mice and cellular cultures of a pig fetus kidney at the 143 day. The aim of this work included studying of its biological properties and decoding the nucleotide sequences of the whole genome. The full-size sequence (11 068 bp) of the strain genome was resulted and deposited in GenBank database with access number JN003209. The strain was attributed to the Siberian subtype because the similarity of nucleotide sequences of the coding region of Irkutsk-12 and Vasilchenko's strains was 96.3%, whereas Sofjin-HO (AB062064) and Neudoerfl (U27495) – 85.5 and 84.7%, respectively. Comparison of the translated amino acid sequences of the strains permitted to reveal 34 amino acid replacements by which Irkutsk-12 strain differed from the Vasilchenko's prototype. Replacements were found out in all proteins except capsid protein C.

The strain virulence for outbred white mice in weight 6 – 8 g was 8.95 lg LD₅₀/ml by intrabrain infection and 6.24 lg LD₅₀/ml by subcutaneous injection, the invasiveness index was 2.71. A virus titer at the 5 day of cultivation was 10^{6.25} CPE₅₀/ml. The virus formed plaques in size from 2 to 3 mm at the 5 day in cell culture of a pig fetus kidney under agar covering.

Key words: tick-borne encephalitis virus, siberian subtype, progredient course of a disease, whole genome sequencing

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) – природно-очаговая вирусная инфекция, поражающая центральную нервную систему (ЦНС) – отделы головного и

спинного мозга, периферическую нервную систему. Распространен в лесной и лесостепной умеренной климатической зоне на большей части Евразийского континента и характеризуется весенне-летней

сезонной активностью. По современным представлениям, вирус КЭ (ВКЭ) включает три подтипа – дальневосточный, европейский и сибирский. Установлена преимущественная циркуляция каждого подтипа: дальневосточного – на Дальнем Востоке, европейского – в европейской части страны, в Центральной, Западной, Восточной и Северной Европе, сибирского – на Урале и в Сибири [1, 2].

Длительное время наиболее тяжелые поражения ЦНС с развитием очаговых форм и летальностью связывали с дальневосточным, а заболевания, которые отличаются доброкачественным течением и единичными очаговыми формами, – с европейским или сибирским подтипами вируса [3 – 5]. В последние годы изменилось представление о патогенности сибирского подтипа ВКЭ в связи с его способностью вызывать очаговые летальные формы КЭ на европейской и азиатской территории России, а в отдельных случаях – у многократно вакцинированных пациентов [6]. Исходя из ведущего симптома, выделяют три основные клинические формы болезни: лихорадочную, менингеальную и очаговую менингоэнцефалитическую [7, 8]. Многие исследователи отмечают рост числа больных с лихорадочной формой при уменьшении числа менингеальных и очаговых форм болезни [8, 9]. С другой стороны, на Южном Урале в течение 11 лет наблюдается рост удельного веса тяжелых клинических форм КЭ, рост очаговых форм [9]. Несмотря на способность ВКЭ к персистенции в организме, чаще прогрессивное течение КЭ наблюдается у пациентов в Сибири и на Дальнем Востоке России [10, 11].

Цель настоящей работы – изучение биологических свойств и расшифровка полной нуклеотидной последовательности кодирующей области генома штамма вируса КЭ, выделенного от больного с прогрессивным течением КЭ.

Материалы и методы

Для изоляции ВКЭ использовали клинический материал – кровь от пациента С. с лихорадочной формой клещевого энцефалита с двухволновым течением, наблюдавшегося в Иркутской областной инфекционной клинической больнице.

Вирусологические исследования проведены в Иркутском научно-исследовательском противочумном институте Сибири и Дальнего Востока.

Изоляцию вируса из крови больного проводили путем внутримозгового заражения двухсуточных беспородных белых мышей и перевиваемых клеточных культур почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Эксперименты *in vivo* выполнены в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 года № 267. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Для последующих пассажей и дальнейших вирусологических и молекулярно-биологических исследований использовали 10%-ную суспензию

головного мозга заболевших мышей и вирусосодержащую культуральную жидкость. Клетки СПЭВ заражали вирусосодержащей культуральной жидкостью с целью выявления цитопатического действия (ЦПД) и идентификации ВКЭ в зараженных клетках методом непрямой иммунофлуоресценции (ИМФА), ИФА и ОТ-ПЦР в соответствии с Инструкцией изготовителя.

Титр вируса в Ig ЦПД₅₀/мл рассчитывали по методу Рида и Менча (1938).

Гемагглютинирующую активность вируса в культуральной жидкости исследовали в реакции гемагглютинации (РГА) с эритроцитами гуся при pH 6,2.

Нейровирулентность выделенного штамма вируса изучали титрованием на беспородных белых мышцах массой 6 – 8 г при заражении в мозг и под кожу (0,03 и 0,25 мл соответственно), определяя величину в Ig ЛД₅₀/мл. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности – разнице титров в Ig ЛД₅₀/мл при внутримозговом и подкожном заражении.

Вирусную РНК выделяли из 10%-ной суспензии головного мозга мышей с помощью набора Рибозоль А («АмплиСенс», Москва). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора Реверта L («АмплиСенс», Москва). Для получения специфичной ДНК использовали праймеры, фланкирующие фрагменты генома вируса КЭ длиной около 1000 нуклеотидов. Для получения полноразмерной последовательности генома изолированного штамма перекрывающиеся фрагменты были амплифицированы и очищены. Для постановки реакции секвенирования смешивали 100 нг очищенного ПЦР продукта, 5 пикомолей праймера и реагенты из набора DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, США). Анализ результатов реакций проводили на приборе CEQ 8800 (Beckman Coulter, США).

Иммунотипирование штаммов проводили в реакции диффузной преципитации в агаре (РДПА)

Анализ нуклеотидных последовательностей. Последовательность генома штамма Irkutsk-12 получена на основе выравнивания нуклеотидных фрагментов при сравнении с референтным штаммом Vasilchenko в программе BioEdit V.7.0.5.3 [12] и депонирована в международную базу данных GenBank с номером доступа JN003209.

Вторичные структуры нетранслируемых регионов 3' и 5' построены с помощью программы RNAfold [13].

Филогенетический анализ. Реконструкция филогенетических отношений проведена на основе анализа кодирующей части генома. Кроме штаммов вируса КЭ сибирского подтипа (номера доступа GenBank приведены на рисунке 1) для реконструкции филогенетических отношений анализировали штаммы европейского (с номерами доступа в GenBank: U27495, GU183379 – GU183381, GU183383, U39292, GQ266392, DQ401140, FJ572210, AM600965, NC001672, HM535610) и дальневосточного (AY182009, JF819648,

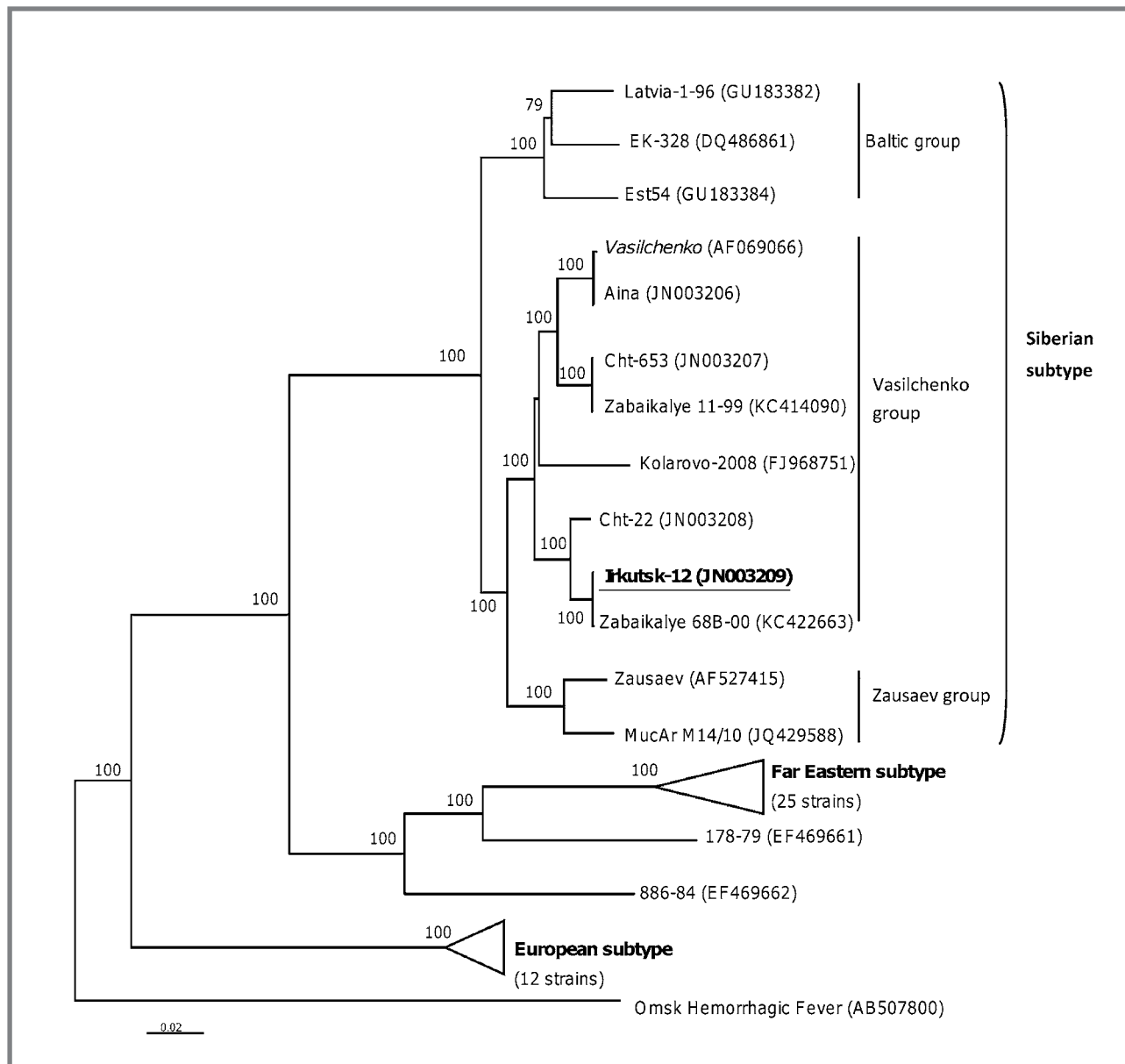
JN229223, JN003205, HQ901366, HQ901367, JF316707, JF316708, EU816450 – EU816455, HQ201303, HM859894, HM859895, AY169390, GQ228395, GU121642, FJ997899, FJ906622, FJ402285, FJ402286, AB062064) подтипов. Расчет филогенетических отношений и построение деревьев проводили с помощью метода Байеса с применением модели GTR + G + I.

Реконструкцию филогенетических отношений проводили на основе кодирующих нуклеотидных последовательностей 53 геномов вируса КЭ, в качестве аутгруппы включали вирус омской геморрагической лихорадки (AB507800). Для анализа оценивали 100 000 генераций mcmc (марковские цепи Монте-Карло).

Результаты и обсуждение

Из анамнеза установлено, что 16-летний юноша С. заболел 5 июля 2010 года. Предъявлял жалобы на умеренную слабость, высокую температуру 38 °С, боли в мышцах. С его слов, присасывание клеща произошло 30 июня 2010 года во время пребывания в спортивном лагере в Тункинской долине, расположенной на эндемичной по КЭ территории Республики Бурятия. Клеща удалил сам (клеща на зараженность вирусом КЭ не исследовали), против КЭ не вакцинирован, иммуноглобулин не вводили. С 5 по 9 июля отмечено повышение температуры до 38 °С и легкие катаральные явления. Лечение симптоматическое. С 26 июля наблюдалась вторая волна повышения температуры до 39 °С. На протяжении

Рисунок 1. Филогенетическое положение штамма *Irkutsk-12*. Байесовское дерево построено на основе анализа кодирующей части генома с применением модели GTR+G+I



Примечание: жирным шрифтом обозначены основные субтипы ВКЭ. Исследуемый в работе штамм выделен жирным шрифтом и подчеркиванием. В узлах указаны апостериорные вероятности в процентах. Шкала соответствует количеству нуклеотидных замен.

пяти дней предъявлял жалобы на головные боли в лобно-височной области, тошноту, повторную рвоту. После приема жаропонижающих препаратов и антибиотиков температура снизилась, головные боли уменьшились. В крови методом ИФА выявлены иммуноглобулины G и M (4 августа 2010 г.). С 5 по 10 августа 2010 года находился на лечении в Иркутской областной инфекционной клинической больнице. Диагноз: клещевой энцефалит, двухволновое течение, лихорадочная форма средней степени тяжести. По объективным данным, состояние средней тяжести, очаговые и менингеальные симптомы отсутствовали.

21 декабря 2010 года при совместной консультации врачей – инфекционистов и невролога – на основании клинических проявлений при динамическом наблюдении и лабораторного исследования (отсутствие нарастания титра антител IgG, по данным ИФА, – 1:2000 в парных сыворотках крови, отрицательный результат на РНК вируса КЭ в ОТ-ПЦР) поставлен диагноз: «Клещевой энцефалит, двухволновое течение, энцефалитическая форма, затяжное течение, правосторонний переходящий легко выраженный дистальный нижний монопарез».

В конце ноября 2010 года клинический материал от больного поступил в институт для вирусологического исследования.

Вирус КЭ выделен из крови больного на 143-й день с момента начала заболевания путем внутримозгового заражения двухсуточных беспородных белых мышей. На 4-е сутки у мышей извлекли головной мозг и использовали для последующего заражения мышей и культуры клеток СПЭВ. На первом пассаже на 5-е сутки после заражения у мышей наблюдали парезы задних конечностей. При последующем пассаже инкубационный период сократился до трех-четырех суток. Вирулентность штамма для беспородных белых мышей массой 6 – 8 г составила при внутримозговом заражении 8,95 lg ЛД₅₀/мл, при подкожном – 6,24 lg ЛД₅₀/мл, индекс инвазивности – 2,71. Гибель животных наблюдали на 4 – 12-е сутки при внутримозговом заражении и на 5 – 13-е – при подкожном. Изолированный патогенный агент идентифицирован в ИФА, в реакции непрямой иммунофлюоресценции и ОТ-ПЦР как вирус КЭ и назван Irkutsk-12.

Заражение культуры клеток СПЭВ на втором-третьем пассажах вызывало деструкцию клеточного монослоя. Титр вируса на 5-е сутки культивирования составил 10^{6,25} ЦПД₅₀/мл. В НМФА на слайд-антигенах, приготовленных из зараженных клеток, с иммуноасцитической жидкостью к штамму Софьин в цитоплазме наблюдали яркое гранулярное свечение, характерное для антигенов ВКЭ.

В культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием вирус на 5-е сутки образовывал бляшки, размер которых варьировал от 2 до 3 мм.

Выделенный штамм агглютинировал эритроциты гуся при pH 6,2. Титр гемагглютинаина в культуральной жидкости составил 1:32.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей перекрывающихся фрагментов вирусного генома получена полноразмерная последовательность генома штамма, которая депонирована в базе данных GenBank с номером доступа JN003209. Размер генома составил 11 068 н.п. и значительно превышал полноразмерную последовательность генома штамма Vasilchenko (L40361) длиной 10 927 н.п. Нетранслируемые регионы 5' и 3' фланкировали открытую рамку считывания полипротеина, а структура генома соответствовала структуре геномов других представителей ВКЭ. Сходство нуклеотидных последовательностей кодирующих регионов штамма Irkutsk-12 со штаммом Vasilchenko составило 96,3%, тогда как сходство со штаммами Sofjin-HO (AB062064) и Neudoerfl (U27495) – 85,5 и 84,7% соответственно. Сходство 5' НТР штаммов Irkutsk-12 и Vasilchenko составило 95,3%. В последовательности 5' НТР было обнаружено шесть нуклеотидных замен по типу трансверсий.

Вторичная структура 5' НТР для штаммов Irkutsk-12 и Vasilchenko была сходной. Структура 3' НТР штамма Irkutsk-12 была характерна для ВКЭ и содержала консервативные и вариабельные регионы. По сравнению со штаммом Vasilchenko штамм Irkutsk-12 содержал вставку длиной 183 н.п., локализованную в вариабельном регионе 3' НТР. Ранее, в работе G. Wallner с соавт. [14], было показано, что структура 3' НТР не зависит от таких параметров, как год изоляции, географическое и эволюционное происхождение штаммов и источник изоляции. Однако наибольшее сходство 3' НТР штамма Irkutsk-12 наблюдалось с географически и филогенетически близкими штаммами IR99 (Иркутская область) и Cht-22 (г. Чита), длина 3' НТР которых составила 730 н.п., а уровень гомологии нуклеотидных последовательностей – 94,2 – 98,9%.

Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей штаммов позволило обнаружить 34 аминокислотных замены, по которым штамм Irkutsk-12 отличался от прототипного штамма Vasilchenko. Замены обнаружены во всех белках, кроме капсидного белка С (табл. 1).

Неконсервативные замены обнаружены в 14 сайтах. Наибольшее число мутаций отмечено в белке NS5, что, вероятно, связано с наибольшей протяженностью этого белка. Замены в белке E, несущем главные антигенные детерминанты, локализованы на поверхности во II (позиции 81 и 279 относительно полипротеина штамма Vasilchenko) и III (позиция 349) доменах. Обнаруженные вариабельные сайты были распределены по всему полипротеину, за исключением белка С, однако функциональная роль отдельных мутаций остается неясной.

Филогенетический анализ байесовского дерева показал, что все штаммы формируют три отдельные клады, соответствующие европейскому, сибирскому и дальневосточному подтипам. Штамм Irkutsk-12 наиболее близко кластеризуется со

Таблица 1.
Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей

Белки	Позиция	Штамм Vasilchenko	Штамм Irkutsk-12
prM	91	T	S
	154	I	V
	155	T	A
	156	V	I
E	81	T	A
	279	A	T
	349	F	S
NS1	318	T	A
NS2A	125	F	L
	130	K	E
	142	L	F
	174	I	V
	199	T	S
	211	E	G
NS2B	70	E	G
NS3	11	R	H
	16	K	R
	186	M	T
	258	M	V
	563	N	S
NS4A	57	V	M
NS4B	205	V	A
NS5	3	A	S
	39	K	R
	51	T	M
	202	R	Q
	261	I	T
	286	R	K
	387	A	V
	642	L	I
	703	S	G
	830	K	R
	832	T	A
875	V	I	

Примечание: Жирным шрифтом выделены неконсервативные замены.

штаммами, изолированными в Забайкальском крае (Zabaikalye 68B-00 и Cht-22), и входит в группу штаммов сибирского подтипа, близких к штамму Vasilchenko (см. рис. 1).

Несмотря на незначительное количество представленных в GenBank полноразмерных последовательностей геномов «сибирских» штаммов, на филогенетическом дереве штаммы сибирского

подтипа вируса КЭ представляют достаточно гетерогенную группу. В отличие от двух других подтипов для штаммов сибирского подтипа характерна географическая кластеризация, где «балтийские» штаммы и штаммы группы Vasilchenko представляют две отдельные эволюционные ветви, распространенные на территории балтийских стран и в Восточной Сибири соответственно. Поиск и сравнение близкородственных нуклеотидных последовательностей позволили определить, что исследуемый штамм имел наибольшее сходство по гомологии нуклеотидных последовательностей со штаммами группы Vasilchenko. Две другие филогенетические линии сибирского подтипа представлены «балтийскими» штаммами (Baltic group) и штаммами группы Zausaev (штамм Zausaev выделен в лаборатории В.В. Погодиной из мозга умершего больного с хронической формой КЭ в 1986 г.), которые достоверно, с высокой степенью вероятности (100%), отличаются от штаммов группы Vasilchenko.

О существовании хронических форм клещевого энцефалита известно с середины XX века. Прогрессирующее течение инфекции возникает реже, чем другие формы КЭ, в основном – на территории Сибири и Дальнего Востока, и чаще связано с сибирским подтипом вируса КЭ [11]. В некоторых регионах России в структуре всех случаев КЭ больные с хронизацией патологического процесса составляют от 1 до 3% [15]. В.В. Погодиной и соавт. приводятся сведения о 12 больных с хроническим проявлением КЭ: шесть больных – в Иркутской области и по одному – в Республике Бурятия, Читинской

и Томской областях, Казахстане, Красноярском и Приморском краях. По результатам антигенного типирования в РДПА и определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена белка Е штаммов, изолированных от этих больных, показана их принадлежность к сибирскому подтипу [16]. На Южном Урале у 8,4% больных, перенесших очаговые формы, развилось хроническое течение КЭ [9]. Дальневосточный и европейский подтипы ВКЭ также способны вызывать прогрессирующее течение КЭ, что подтверждается клиническими данными, изоляцией и типированием отдельных штаммов (дальневосточных) от больных [11]. В Европе (в Литве) у двух больных наблюдали прогрессирующее развитие болезни через 3 и 13 месяцев с появлением гемиплегий [17]. Приведенные выше данные показывают, что хронически текущий процесс могут вызвать вирусы КЭ всех трех подтипов, хотя и с разной частотой.

Выводы

1. Штамм Irkutsk-12, выделенный от больного с прогрессирующим течением КЭ, является представителем филогенетической линии штаммов, близкородственных штамму Vasilchenko, которая объединяет штаммы из Сибири, вызвавшие различные клинические формы КЭ у людей – как с прогрессирующим течением (Aina, Vasilchenko), так и с летальными исходами (Cht-653, Cht-22).
2. Проведенные исследования расширяют информацию о сибирском подтипе и его связи с хроническим течением КЭ в Сибири.

Литература

1. Адельшин Р.В., Злобин В.И., Беликов С.И., Джиоев Ю.П., Демина Т.В., Газо М.Х. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах Балтии, Восточной и Юго-Восточной Европы. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2006; 2: 27 – 34.
2. Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии. 2007; 6: 4 – 12.
3. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае: вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. Владивосток: Дальнаука; 1997.
4. Вотяков В.И., Злобин В.И., Мишаева Н.П. Клещевые энцефалиты Евразии (вопросы экологии, молекулярной эпидемиологии, нозологии, эволюции). Новосибирск: Наука; 2002.
5. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит: Руководство для врачей. Новосибирск: Государственная медицинская академия МЗ РФ; 2001.
6. Погодина В.В., Левина Л.С., Скрынник С.М., Травина Н.С., Карань Л.С., Колясникова Н.М. и др. Клещевой энцефалит с молниеносным течением и летальным исходом у многократно вакцинированного пациента. Вопросы вирусологии. 2013; 2: 33 – 37.
7. Аитов К.А., Тарбеев А.К., Борисов В.А. Современные аспекты клиники клещевого энцефалита. Вопросы вирусологии. 2007; 5: 33 – 37.
8. Борисов В.А., Аитов К.А., Злобин В.И., Малов И.В., Савилов Е.Д. Изучение некоторых клинико-эпидемиологических аспектов клещевого энцефалита в Прибайкалье. Журнал инфекционной патологии. 2004; 11 (3 – 4): 39 – 41.
9. Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита на Южном Урале. Сибирский медицинский журнал. 2011; 4: 92 – 95.
10. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P. et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. J. Virol. 2003; 77 (1): 25 – 36.
11. Погодина В.В. Мониторинг популяций вируса клещевого энцефалита и этиологической структуры заболеваемости за 60-летний период. Вопросы вирусологии. 2005; 3: 7 – 13.
12. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999; 41: 95 – 98.
13. Hofacker I.L. Vienna RNA secondary structure server. Nucleic Acids Res. Jul 1, 2003; 31 (13): 3429 – 3431.
14. Wallner G., Mandl C.W., Kunz C., Heinz F.X. The flavivirus 3' noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. Virology. 1995; 213: 169 – 178.
15. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. Этиология, иммунология, патогенез. Новосибирск: Наука; 1986.
16. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С., Фролова Т.В., Левина Л.С., Маленко Г.В. и др. Мониторинг популяции вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России. Практические аспекты проблемы. Биопрепараты. 2004; 2 (14): 7 – 13.
17. Haglund M., Gunther G. Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. Vaccine. 2003; 21 (Suppl. 1): 11 – 18.

References

1. Adel'shin R.V., Zlobin V.I., Belikov S.I., Dzhioev Yu.P., Demina T.V., Gazo M.Kh. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis in the European part of Russia and some of the Baltic countries, Eastern and Southeastern Europe. Epidemiology and Vaccinal Prevention 2006; 2: 27 – 34 (in Russian).
2. Zlobin V.I., Verkhosina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Adel'shin R.V., Kozlova I.V. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis. Voprosy Virusologii. 2007; 6: 4 – 12 (in Russian).

3. Leonova G.N. Tick-borne encephalitis in Primorsky district: Virological and ecological and epidemiological aspects. Vladivostok: Dal'nauka; 1997 (in Russian).
4. Votyakov V.I., Zlobin V.I., Mishaeva N.P. Encephalitis Eurasia (environmental, molecular epidemiology, nosology, evolution). Novosibirsk: Nauka; 2002 (in Russian).
5. Ierusalimskiy A.P. Tick-borne encephalitis. Guidance for doctors. Novosibirsk: State Medical Academy, Ministry of the Russian Federation; 2001.
6. Pogodina V.V., Levina L.S., Scrynnik S.M., Travina N.S., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Tick-borne encephalitis with fulminant course and lethal outcome in patients after plural vaccination. *Voprosy Virusologii*. 2013; 2: 33 – 37 (in Russian).
7. Aitov K.A., Tarbeev A.K., Borisov V.A. Modern aspects of clinical encephalitis. *Voprosy Virusologii*. 2007; 5: 33 – 37 (in Russian).
8. Borisov V.A., Aitov K.A., Zlobin V.I., Malov I.V., Savilov E.D. Study of the clinical and epidemiological aspects of tick-borne encephalitis in the Baikal region. *Journal of infectious diseases*. 2004; 11 (3 – 4): 39 – 41.
9. Kon'kova-Reydmann A.B., Zlobin V.I. Clinico-epidemiological characteristics of tick-borne encephalitis in the southern Urals. *Siberian Journal of Medicine*. 2011; 4: 92 – 95 (in Russian).
10. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P. et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol*. 2003; 77 (1): 25 – 36.
11. Pogodina V.V. Monitoring populations borne encephalitis virus and the etiological structure of morbidity in 60-year period. *Voprosy Virusologii*. 2005; 3: 7 – 13 (in Russian).
12. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999; 41: 95-8.
13. Hofacker I.L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* Jul 1, 2003; 31 (13): 3429 – 3431.
14. Wallner G., Mandl C.W., Kunz C., Heinz, F.X. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1995; 213: 169 – 178.
15. Pogodina V.V., Frolova M.P. and Erman B.A. Chronic tick-borne encephalitis. Etiology, immunology, pathogenesis. Novosibirsk: Nauka; 1986 (in Russian).
16. Pogodina V.V., Bochkova N.G., Karan' L.S., Frolova T.V., Levina L.S., Malenko G.V. et al. Monitoring of tick-borne encephalitis virus population in the European and Asian parts of Russia. Practical aspects of the problem. *Biologics*. 2004; 2 (14): 7 – 13 (in Russian).
17. Haglund M., Gunther G. Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*. 2003; 21 (Suppl. 1): 11 – 18.

Связь манифестных случаев клещевого вирусного энцефалита с некоторыми демографическими, социальными и экологическими факторами

О.В. Мельникова (melnikovaovit@gmail.com), Е.И. Андаев (e.andaev@gmail.com)

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

Клинические формы и тяжесть течения клещевого энцефалита (КЭ) в пределах его ареала демонстрируют разнообразие проявлений. Кроме пространственно-временных, имеют место социальные, демографические и экологические различия, играющие свою роль в каждом отдельном регионе в определенный период. В обзоре анализируются гендерные, возрастные, поведенческие и некоторые другие факторы, влияющие на инцидентность КЭ. Выделены группы риска инфицирования и группы риска по тяжести заболевания.

Ключевые слова: клещевой энцефалит (КЭ), формы и тяжесть заболевания, группы риска

The Manifest Tick-Borne Encephalitis Cases and their Relationship with some Demographic, Social and Ecological Factors

O.V. Mel'nikova (melnikovaovit@gmail.com), E.I. Andaev (e.andaev@gmail.com)

Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Research Antiplague Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

Clinical forms and severity of tick-borne encephalitis (TBE) within its area show diversity of manifestations. Besides spatial and temporal, there are social, demographic and ecological differences which play their own role in each region during certain period. Gender, age, behavioral and some other factors influence on TBE incidence have been analyzed in the review. The risk groups for infecting and for severity of the illness have been marked out.

Key words: tick-borne encephalitis (TBE), forms and severity of the illness, the risk groups

Клещевой энцефалит (КЭ) – природно-очаговая инфекция, распространенная в умеренном поясе Евразии, передающаяся человеку, как правило, через «укус» зараженного иксодового клеща. Только часть популяции иксодид инфицирована вирусом в количестве, достаточном для за-

ражения человека. Частота манифестных случаев КЭ варьирует по регионам от 0,67 – 1,4% (европейская часть России) до 2,6 – 5,7% (Сибирь) от общего числа пострадавших от присасывания клещей [1, 2]. Наиболее тяжелые проявления у человека болезни наблюдаются на востоке ареала (Дальний

Восток России), тогда как на западе (Европа) чаще встречаются легкие лихорадочные формы. Это принято объяснять распространением в разных частях ареала разных генотипов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) – дальневосточного, сибирского и европейского, которые ассоциируются с разной степенью тяжести заболевания [3, 4]. Между тем прямой корреляционной связи между клинической картиной заболевания, тяжестью его течения и генотипом вируса не выявлено [5]. Кроме того, на отдельных взятых территориях клиника КЭ имеет свои особенности, не всегда совпадающие со сложившимся представлением о доминирующем в данной местности генотипе вируса. Например, на северо-западе Российской Федерации преобладает менингеальная форма (60%), часто встречаются и очаговые формы (19%) [6]. В Ярославской области до половины всех случаев приходится на тяжелые формы, а летальность в отдельные годы достигает до 6 – 10% [7]. В Польше среди пациентов, госпитализированных с 1993 по 2008 год, менингит имел место в 41% случаев, менингоэнцефалит – в 51,3%, менингоэнцефаломиелит – в 7,6% [8]. Имеются сведения о патоморфозе КЭ, который проявляется в одних регионах утяжелением клинического течения, ростом числа очаговых форм [9 – 12], в других – увеличением удельного веса неочаговых форм в условиях подъема заболеваемости [13].

Помимо клинических проявлений в разных участках ареала клещевого энцефалита имеются пространственно-временные различия в динамике заболеваемости, возрастной, гендерной и социальной структуре больных. Причины этих различий не всегда понятны и требуют всестороннего изучения. В литературе накоплен большой фактический материал, касающийся эпидемиологических проявлений КЭ на разных участках его ареала, с попытками объяснения этих проявлений и связи их с социальными и экологическими факторами. В данной работе представлен обзор данных, касающихся тяжести проявлений заболевания в различных гендерных, возрастных и социальных группах в разных частях ареала ВКЭ, включая аналогичные сведения по г. Иркутску [14].

Гендерные различия. В большинстве работ, касающихся заболеваемости КЭ, в качестве фактора риска отмечается принадлежность к мужскому полу [15 – 17]. Доля мужчин среди заболевших в разных регионах составляет 60% и более [1, 7, 12, 18]. Только в Пермском крае распределение заболеваемости среди мужчин и женщин в современных условиях не имеет достоверных различий – их доли равны [19]. Среди больных КЭ иркутян мужчин в среднем было $68,1 \pm 1,23\%$, но это число значительно колебалось (от 51,9 до 83,7%) и зависело от географии заражения [20].

Факт преобладания лиц мужского пола среди больных КЭ исследователи обычно объясняют активной деятельностью мужчин на открытом воздухе. Нам это истолкование кажется несколько одно-

сторонним. И.В. Козлова на данных обследования более 56 тыс. человек констатирует, что среди лиц, обратившихся за диагностической и профилактической помощью по поводу присасывания клеща, число мужчин и женщин различалось несущественно: 53,3 и 46,7% соответственно. Это соотношение сохранялось приблизительно на одном уровне в течение 12-летнего периода исследований [21] и примерно соответствует соотношению полов в Иркутске по данным последней переписи населения [22]. Более реалистичным объяснением нам представляются особенности иммунной системы мужчин и женщин. По наблюдениям Г.Н. Леоновой, по поводу присасывания клеща чаще обращались лица мужского пола в возрасте до 50 лет. В то же время среди лиц в возрасте от 51 года и старше достоверно чаще обращались женщины. При оценке иммунологической эффективности вакцинации в зависимости от возраста и пола выяснилось, что женщины всех возрастных групп имели более напряженный иммунный ответ [6]. По информации Роспотребнадзора о случаях КЭ с летальным исходом в 17 субъектах РФ в 2010 году, доля мужчин составила 57,7%, женщин – 42,3%. В Курганской области летальность от КЭ (8 случаев) за последние девять лет была обусловлена очаговыми формами преимущественно у мужчин (6 случаев, из них 3 – фульминантных) [23].

Мы проанализировали данные о больных КЭ по Иркутску с 1995 по 2013 год и не обнаружили достоверных различий по частоте встречаемости тяжелых форм заболевания у мужчин и женщин. Из 11-ти летальных исходов, имевших место в течение этого времени, мужчин и женщин было почти поровну: 6 и 5 соответственно. Средняя продолжительность инкубационного периода у мужчин и женщин также не различалась ($10,9 \pm 0,29$ и $10,9 \pm 0,45$ суток соответственно).

Возрастные различия. Многие исследователи обращают внимание на факт зависимости тяжести заболевания от возраста пациента [24 – 27]. Чаще речь идет о преобладании среди больных КЭ лиц старшего возраста [7, 12, 25, 28 – 30] и о более тяжелом течении заболевания у них [26, 27]. Из упомянутых выше случаев КЭ с летальным исходом в РФ в 2010 году на долю лиц старше 50 лет приходится 63,6 (женщины) – 66,6% (мужчины).

Но имеются и другие тенденции. Большая доля детей среди больных КЭ наблюдается в Австрии и Прибалтике [31], при этом отмечается, что инфекции ЦНС у детей часто протекают в легкой форме, однако это таит в себе опасность вероятных осложнений в будущем. Если заболевание протекает без выраженных специфических симптомов, это может привести к «ускользанию» диагноза [32]. В Западной Богемии самое большое число случаев выявлено в возрастной группе 15 – 19 лет (юноши – 6,2 на 100 тыс. населения, девушки – 4,3 на 100 тыс. населения) [33]. Российская Федерация: в Кемерово 20 – 30% случаев заболевания КЭ приходится

на детей до 14 лет [2], в Тюмени наиболее поражаемая возрастная группа – 18 – 29 лет (25%) [34]. Г.Н. Леонова утверждает, что именно дети составляют значительную долю заболевших КЭ – от 23 до 27% и их можно рассматривать как индикаторную систему степени инфицированности населения ВКЭ в разные периоды сезона [35].

При сравнении групп риска по возрастам в разные временные периоды прослеживались изменения. В Кировской области в 1990-х годах стали преобладать больные в возрасте 30 – 50 лет – 68% (в 1980-х – 49%). Доля людей старше 60 лет выросла до 10% (в 1980-х годах – 4%). В Чехии с 1970 по 2008 год изменилось распределение инцидентности по возрастам: до конца 1990-х годов максимум случаев приходился на возрастную группу 15 – 19 лет с постепенным снижением в старших возрастных группах. В 2000-х годах инцидентность выросла в группе 60 – 64-летних с выраженным ростом среди лиц старше 65 лет [36]. Анализ более 13 тыс. случаев КЭ за рассматриваемый период (1970 – 2008 гг.) продемонстрировал, что демография влияет на инцидентность в отсутствие других факторов [37].

Средний возраст больных КЭ по Иркутску за последние 19 лет – $33,6 \pm 0,52$ года при среднем возрасте популяции $36,3$ [22]. При этом средний возраст мужчин в популяции не отличается от возраста заболевших мужчин, но возраст пациенток женского пола достоверно ниже, чем средний по Иркутску ($35,5 \pm 0,98$ против $38,5 \pm 0,09$, $P < 0,01$). Различия в риске заболеть в зависимости от возраста и пола становятся особенно наглядными при сопоставлении доли людей, заболевших КЭ, с соответствующими группами всей популяции (табл. 1).

Среди больных КЭ дошкольного возраста доля девочек была в два раза больше, чем мальчиков ($10,0 \pm 1,42$ против $5,2 \pm 0,72\%$, $P < 0,001$,

в таблице не показано), среди больных КЭ от 20 до 29 лет выражено преобладали мужчины ($P < 0,01$), а в возрастной группе 60 – 69 лет снова значительно превалировала доля женщин ($P < 0,01$). В работе В.И. Злобина с соавт. [3] невысокий процент больных старше 61 года связывается с ограниченной мобильностью данной возрастной группы и ее малым контактом с лесом. Думаем, что подобное объяснение не вполне справедливо по нескольким причинам. Во-первых, категория «старше 61» слишком велика для объединения по признаку активности и мобильности, и ее следует подразделить на несколько групп. Во-вторых, заражение клещевым энцефалитом в настоящее время в основном происходит в антропоургических очагах, в частности – на дачных участках, где люди старше 60 проводят свой досуг. В-третьих, среди людей старшего возраста, длительно проживающих на данной территории, высока вероятность большей иммунной прослойки. Наконец, в-четвертых, доля данной возрастной группы в заболеваемости может не совпадать с ее относительным количеством в популяции, а отклонение в ту или другую сторону может свидетельствовать о большей или меньшей степени риска. При сравнении возрастных групп больных КЭ в г. Иркутске с соответствующими группами по всей популяции оказалось, что чаще прочих заболевают люди обоего пола в возрасте 40 – 49 лет, девочки до 14 лет и пожилые женщины от 60 до 69 лет. Напротив, в целом наименьший риск отмечается в возрастных группах 20 – 29 лет и старше 70 лет.

Чтобы отследить изменение возрастной структуры больных КЭ по г. Иркутску во времени, мы сравнили информацию, имеющуюся в базе данных [14] за 1995 – 2013 годы, с данными В.А. Борисова с соавт. 1988 – 1992 годов [38]. Для лучшей сопоставимости временных отрезков мы разбили имеющуюся в базе данных 19-летнюю выборку на

Таблица 1.

Половозрастная структура населения г. Иркутска и больных клещевым энцефалитом (в процентах от общей численности населения)

Возраст (лет)	Вся популяция			Больные КЭ		
	вся выборка	мужчины	женщины	вся выборка	мужчины	женщины
0 – 14	$15,7 \pm 0,05$	$18, \pm 0,08$	$13,8 \pm 0,06$	$21,2 \pm 1,08$	$20,1 \pm 1,28$	$23,7 \pm 1,99$
15 – 19	$8,1 \pm 0,04$	$8,6 \pm 0,05$	$7,7 \pm 0,05$	$7,6 \pm 0,70$	$8,8 \pm 0,9$	$5,1 \pm 1,03$
20 – 29	$20,4 \pm 0,05$	$21,6 \pm 0,08$	$19,3 \pm 0,07$	$16,5 \pm 0,98$	$18,5 \pm 1,24$	$12,3 \pm 1,54$
30 – 39	$15,6 \pm 0,05$	$16,5 \pm 0,07$	$14,9 \pm 0,06$	$15,1 \pm 0,94$	$16,3 \pm 1,18$	$12,5 \pm 1,55$
40 – 49	$12,1 \pm 0,04$	$12,4 \pm 0,06$	$11,8 \pm 0,06$	$15,5 \pm 0,95$	$15,1 \pm 1,14$	$16,5 \pm 1,74$
50 – 59	$12,5 \pm 0,04$	$11,4 \pm 0,06$	$13,3 \pm 0,06$	$12,8 \pm 0,88$	$12,0 \pm 1,04$	$14,5 \pm 1,65$
60 – 69	$7,4 \pm 0,03$	$6,2 \pm 0,05$	$8,4 \pm 0,06$	$8,5 \pm 0,74$	$6,9 \pm 0,81$	$11,9 \pm 1,52$
70 – 79	$5,7 \pm 0,03$	$3,9 \pm 0,04$	$7,3 \pm 0,05$	$2,4 \pm 0,40$	$2,1 \pm 0,46$	$2,9 \pm 0,78$
80 и старше	$2,3 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,02$	$3,3 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,15$	$0,2 \pm 0,14$	$0,7 \pm 0,38$

три периода: 1995 – 2000, 2001 – 2006 и 2007 – 2013 годы. (табл. 2). В течение 25 лет произошли изменения в заболеваемости КЭ в различных возрастных группах с тенденцией снижения случаев КЭ во всех группах, кроме самой старшей. Особенно значительно ($P < 0,05$) уменьшилась доля больных КЭ среди подростков 15 – 19 лет. В то же время с 1995 по 2013 год значительно выросла заболеваемость среди детей до 6 лет ($P < 0,01$). На детей до 14 лет в последние годы приходится 23,7% всех случаев КЭ. С учетом того что данная возрастная группа составляет всего 15,6% населения Иркутска, ответственным службам необходимо обратить особое внимание на этот серьезный факт. Следует отметить, что соотношение возрастных групп лиц, обратившихся за помощью по поводу присасывания клеща в Иркутске с 1995 по 2004 год [21], примерно соответствует соотношению таких групп среди больных КЭ за аналогичный период.

Инкубационный период КЭ у детей до 6 лет был самым коротким ($9,0 \pm 0,85$ дня), достоверно отличаясь от среднего ($10,9 \pm 0,25$, $P < 0,05$). Н.Б. Мерзлова и М.Н. Самаров [39] приводят аналогичную продолжительность инкубационного периода у больных КЭ детей в Пермском крае ($8,3 \pm 2,6$ дня). Сравнение длительности инкубационного периода при разных формах заболевания в Иркутске показало, что он значительно короче при лихорадочной форме (9,8 дня) по сравнению с менингеальной и очаговыми (12,7 и 12,8 дня соответственно, $P < 0,001$ в обоих случаях).

Что касается тяжести заболевания, то очаговые формы гораздо реже встречались у детей 7 – 14 лет ($1,97 \pm 0,99\%$) по сравнению со всеми прочими возрастными группами, кроме младшей ($3,1 \pm 1,77\%$) и подростковой ($2,8 \pm 1,60\%$). Наоборот, наибольший процент очаговых форм имел место среди пациентов 50 лет и старше ($10,3 \pm 1,67$), а менингеальных – среди 40 – 49-летних ($35,7 \pm 3,25\%$). Из 11-ти летальных исходов, произошедших с 1995 по 2013 год, семь пришлось на лиц старше 50 лет (пять женщин и два мужчины).

Локализация присасывания. Есть данные о существовании весьма высокого уровня корреляции между локализацией присасывания клеща и возникновением клинически и серологически подтвержденных случаев клещевого энцефалита. А.Н. Алексеев приводит следующее распределение: голова или шея – 55,0%, грудь и спина – 18,6%, руки и подмышки – 13,7%, ноги или пах – 8,8% [40]. Анализ локализации мест «укусов» на теле здоровых людей, пострадавших от нападения клещей в Приангарье, дал такой результат: голова и шея – 25%, туловище – 47,5%, верхние конечности – 13,4%, нижние конечности – 11,3%, множественные «укусы» имели место в 2,8% случаев [5]. М. Blasko-Markic и М. Socan обнаружили, что влияли на локализацию присасывания клеща при КЭ возраст и пол: у мужчин клещ чаще присасывался к туловищу, а у женщин – к ногам. Клещи, присосавшиеся к голове и шее, чаще встречались у дошкольников по сравнению со школьниками и взрослыми [41]. Н.В. Шубин [42] не выявил связи между длительностью инкубационного периода и местом присасывания клеща. В литературе есть указания, что у больных с множественными «укусами» клещей чаще регистрируются очаговые формы заболевания. Г.Н. Леонова отмечает, что самые высокие показатели очаговых форм и общей летальности зарегистрированы в случаях с множественными «укусами» клещей (67 и 32% соответственно), а летальные исходы при очаговых формах особенно часто случались при присасывании к голове (13%) и при множественных присасываниях (5%) [6]. По наблюдениям М.М. Окуловой и соавт. [43], наибольшее число летальных исходов приходится на «укусы» в верхние конечности – 18,3%, голову и шею – 16,7%. В.В. Погодина и соавт. утверждают, что отягощающими факторами при летальном КЭ, вызванном сибирским подтипом, являются принадлежность пациентов к старшей возрастной группе, сопутствующие заболевания, локализация «укуса» в области головы и высокая вирулентность заражающего штамма [44].

Таблица 2.
Динамика возрастной структуры больных клещевым энцефалитом в г. Иркутске с 1988 по 2013 год

Возраст больных (лет)	Доля больных данной возрастной группы (%)			
	1988 – 1992 гг. * (n = 355)	1995 – 2000 гг. (n = 841)	2001 – 2006 гг. (n = 363)	2007 – 2013 гг. (n = 236)
0 – 6	–	$6,1 \pm 0,7$	$5,5 \pm ,20$	$12,3 \pm 2,14$
7 – 14	–	$15,5 \pm 0,17$	$13,5 \pm 1,79$	$11,4 \pm 2,07$
15 – 19	$14,4 \pm 1,86$	$7,8 \pm 0,09$	$7,7 \pm 1,40$	$6,4 \pm 1,59$
20 – 29	$23,9 \pm 2,26$	$14,7 \pm 0,16$	$19,3 \pm 2,07$	$18,6 \pm 2,54$
30 – 39	$24,5 \pm 2,28$	$16,4 \pm 0,18$	$12,4 \pm 1,73$	$14,4 \pm 2,29$
40 – 49	$15,5 \pm 1,92$	$16,9 \pm 0,18$	$14,6 \pm 1,85$	$12,7 \pm 2,17$
50 и старше	$23,7 \pm 2,26$	$22,6 \pm 0,24$	$27,0 \pm 2,33$	$24,2 \pm 2,79$

Примечание: *По Борисову с соавт. [38].

В исследованной нами выборке больных КЭ ($n = 1209$) места присасывания инфицированных клещей распределялись следующим образом: голова и шея – $28,5 \pm 1,30\%$, туловище – $26,3 \pm 1,27\%$, руки и подмышки – $21,6 \pm 1,18\%$, ноги и пах – $17,0 \pm 1,08\%$. На множественные присасывания пришлось $6,6 \pm 0,71\%$. У мужчин достоверно чаще отмечались множественные «укусы» ($P < 0,01$) и присасывание к нижним конечностям ($P < 0,001$), у женщин клещи чаще локализовались на голове и туловище ($P < 0,01$ и $P < 0,05$ соответственно).

При сравнении локализации присасывания клещей по возрастным группам выяснилось, что у детей до 6 лет на область головы и шеи приходится $79,8 \pm 4,26\%$ «укусов», у детей 7 – 14 лет – $53,0 \pm 3,87\%$, что достоверно превышает среднюю цифру как по всей выборке, так и по каждой другой возрастной группе в отдельности. В группе 50 лет и старше доля присасываний клещей, зараженных ВКЭ, к голове снижается до $17,7 \pm 2,23\%$, преобладающее количество «укусов» приходится на туловище ($35,1 \pm 2,78\%$).

Инкубационный период был короче в случае присасывания клеща в области головы и шеи (10,0 дня, $P < 0,05$).

Очаговые формы заболевания чаще встречались у пациентов с множественными присасываниями клещей ($11,7 \pm 4,14$ против $6,6 \pm 3,21\%$), но достоверной зависимости формы заболевания и тяжести течения от места присасывания инфицированного клеща на теле пострадавшего нами не выявлено.

Социальные факторы. 90-е годы прошлого столетия – время беспрецедентного роста заболеваемости клещевым энцефалитом по всему его ареалу. Многие исследователи констатируют, что наряду с общебиологическими закономерностями регуляции эпидемиологического процесса на первое место стали выступать социальные факторы [45 – 50]. Н.Б. Мерзлова с соавт. подчеркивают, что опасность инфекционных заболеваний непосредственно связана с тем, как относится к ней население. Анкетирование разных групп населения показало, что рейтинги социальных факторов риска распространения инфекционных заболеваний на первое место выводят неаккуратность, небрежность самих людей. В то же время выяснилось, что ожидания медицинских работников и представителей других групп населения в сфере инфекционной опасности не совпадают [49]. По мнению Е.И. Болотина, причиной роста заболеваемости КЭ с середины 80-х годов в южных регионах Приморья явились резко ухудшающиеся социально-экономические условия, приводящие к увеличению контактов городского населения с клещами. В северной части Приморья доминирует сельское население, уклад жизни которого остался прежним, и многолетняя динамика заболеваемости здесь определяется в основном естественными колебаниями численности переносчиков и их зараженности ВКЭ

[46]. S.E. Randolph одной из причин резкого подъема заболеваемости КЭ в странах Прибалтики считает безработицу и общее снижение уровня жизни населения после распада СССР [47, 48]. В Латвии люди с низким социально-экономическим статусом, поведение которых вело к наибольшему риску подвергнуться нападению клеща в лесу, включая людей с низким уровнем образования и самыми низкими доходами, вакцинируются реже всех [51]. Социально-экономические факторы, такие как уровень доходов и образование, были количественно связаны с частотой посещения лесов и подверженности нападению клещей. Случаи заболевания КЭ в сельских районах Латвии чаще регистрировались у сборщиков дикоросов, реже – у путешественников [52]. В Польше исследовали индивидуальные факторы риска инфицирования ВКЭ. Отсутствие занятости (безработица) и сбор дикоросов оказались в числе наибольших факторов риска [50]. Сборщики папоротника и черемши составили почти 30% среди больных клещевым энцефалитом в Прибайкалье с 1974 по 2001 год [3]. Большой процент незанятого населения (пенсионеров и безработных) отмечен среди больных КЭ в Томской [15], Кировской [1] и Ярославской [7] областях. В то же время другие исследователи считают недоказанной роль социально-экономических факторов как ведущей причины роста заболеваемости КЭ [37, 53].

Доля незанятого населения среди больных манифестными формами КЭ в Иркутске (1995 – 2013 гг.) составила $30,4 \pm 1,21\%$, из них пенсионеры и инвалиды – $12,3 \pm 0,87\%$, безработные – $18,0 \pm 1,01\%$. В первой группе (средний возраст 63,2 года) соотношение полов было 1:1, во второй (средний возраст 34,5 года) мужчин было почти в три раза больше. Множественные «укусы» клещей в последней категории составляли свыше 11%, достоверно превышая среднее количество по выборке ($6,6 \pm 0,71\%$, $P < 0,001$). Доля тяжелых форм (менингеальные + очаговые) в группе незанятого населения значимо превышала таковую среди занятого ($40,7 \pm 2,35$ и $34,3 \pm 1,50\%$ соответственно, $P < 0,05$). Относительное количество пенсионеров среди больных КЭ в Иркутске соответствует их доле в общей численности населения области по данным переписи населения [22], то есть риск заражения в этой группе не выше прочих. В то же время очаговые формы у лиц пенсионного возраста развивались гораздо чаще, чем у всех остальных пациентов ($P < 0,001$), и больше половины от общего числа летальных исходов пришлось именно на эту группу больных КЭ.

Из обстоятельств заражения в архивных материалах Управления Роспотребнадзора по г. Иркутску чаще всего приводится «отдых» или «дача, отдых», что малоинформативно и даже вносит путаницу, поскольку непонятно, произошло ли заражение во время пикника в лесу, по дороге на дачу или непосредственно на садовом участке. Доля «профессионального» заражения – $0,8 \pm 0,24\%$, все –

непривитые. Для сравнения поведения людей, приведшего к контакту с инфицированным клещом, мы выбрали «сбор дикоросов», что является целеполаганием движения человека в природный очаг. В среднем за 19 лет при этих обстоятельствах произошло заражение 16,4% заболевших КЭ иркутян ($n = 1443$), преимущественно мужчин ($P < 0,05$). Если сравнить временные отрезки: 1995 – 2000, 2001 – 2006 и 2007 – 2013 годы, – оказывается, что в конце 1990-х годов (время тяжелого экономического положения в стране и максимального подъема заболеваемости КЭ как по всей России, так и в Иркутской области) гораздо больше людей посещало лес с целью сбора «даров природы» по сравнению с двумя другими периодами – относительного благополучия и снижения заболеваемости ($P < 0,001$ для 2001 – 2006 гг. и $P < 0,01$ для 2007 – 2013 гг.). Почти треть безработных причиной пребывания в лесу назвали сбор дикоросов, что существенно больше среднего числа по выборке ($P < 0,001$). Интересно, что похожие цифры приводит Л.Д. Щучинова, сравнивая причины заражения клещевым энцефалитом в Республике Алтай в разные периоды и делая акцент на увеличении доли людей, отдыхающих на природе, в связи с ростом уровня жизни и вытекающим из этого ростом автомобилизации населения [54].

Таким образом, по мнению большинства исследователей, незанятое население представляет собой группу повышенного риска заражения КЭ, а низкий уровень жизни населения является фактором, способствующим росту заболеваемости этой природно-очаговой инфекцией.

Неясный путь заражения. Основной путь передачи клещевого энцефалита – трансмиссивный. В западной части ареала заболевание иногда (до 10% случаев) связывают с употреблением сырого молока, чаще козьего [12, 33, 55]. В то же время присасывание клеща отрицают до 30% заболевших (по разным данным) [1, 56]. В какой-то части случаев незамеченным может оставаться при-

сасывание клещей преимагинальных стадий, что свойственно в основном нимфам *Ixodes ricinus*. В зоне распространения *I. persulcatus* более высока вероятность не обратить внимания на «укус» самца, поскольку он прикрепляется на короткий период [40, 57], которого, по-видимому, бывает достаточно для проникновения вируса в подкожные капилляры.

Факт присасывания клеща отрицали $6,0 \pm 0,63\%$ больных КЭ иркутян (в данное число не вошли шесть человек, заразившихся алиментарно, и пять человек, причина заражения которых в архивных материалах не указана). Эта категория больных имеет свои особенности. Во-первых, в возрастном составе бросается в глаза доля группы «дети от 7 до 14 лет», значительно превышающая среднюю по выборке ($25,0 \pm 4,72$ против $14,3 \pm 0,93\%$, $P < 0,05$), что объяснимо недостаточным родительским контролем. Во-вторых, частота встречаемости тяжелых форм среди пациентов, отрицающих присасывание клеща, существенно превосходит среднюю по выборке ($P < 0,05$): $44,4 \pm 5,52$ против $30,5 \pm 1,24\%$ менингеальных и $13,6 \pm 3,80$ против $5,7 \pm 0,62\%$ очаговых. В-третьих, пик заболеваемости в этой группе приходится на конец июня – начало июля, с задержкой почти на неделю по сравнению с пиком по всей выборке. По нашим наблюдениям, именно в это время происходят резкий спад активности клещей в окрестностях Иркутска и снижение относительного количества самок в сборах, а вероятность подвергнуться нападению самца повышается.

Таким образом, при прочих равных условиях факторами риска заражения КЭ являются принадлежность к мужскому полу, низкий уровень жизни и безработица. Возрастной состав больных КЭ в каждом регионе имеет свою специфику и требует дифференциального подхода к профилактике. Тяжелые формы чаще имеют место в старшей возрастной группе, в случаях множественных «укусов» и у пациентов, не заметивших присасывания клеща.

Литература

1. Бондаренко А.Л., Русских Г.А., Хмелевская Н.С., Утенкова Е.О., Зыкова И.В., Ярошецкая Э.И. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту в Кировской области. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2002; 3: 42 – 45.
2. Roropnikova T.V. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. International Journal of Medical Microbiology. 2006; 296 (Suppl. 1): 59 – 62.
3. Злобин В.И., Борисов В.А., Верховина М.М., Малов И.В., Холмогорова Г.Н. Клещевой энцефалит в Восточной Сибири. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН; 2002.
4. Ruzek D., Stastna H., Kopecky J., Golovljova I., Grubhoffer L. Rapid typing of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods. 2007; 144: 133 – 137.
5. Козлова И.В., Верховина М.М., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Борисов В.А., Туваков М.К. и др. Результаты генотипирования штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2012; 87 (5). Ч. 1: 231 – 235.
6. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит: актуальные аспекты. – Москва: Издатель И.В. Балабанова; 2009.
7. Дружинина Т.А., Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Ющенко Г.В., Скородумова Л.В., Соколова И.А. и др. Клещевой энцефалит в Ярославской области: эпидемиологические аспекты, профилактика. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002; 5: 13 – 16.
8. Czupryna P., Moniuszko A., Pancewicz S.A., Grygorzuk S., Kondrusik M., Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993 – 2008 – epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients. Eur. J. Neurol. 2010; 12. Doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03278.
9. Борисов В.А., Злобин В.И., Аитов К.А., Малов И.В., Холмогорова Г.Н. Сравнительная клинко-эпидемиологическая характеристика клещевого энцефалита в разных регионах Восточной Сибири. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2002; 2 (4): 42, 43.
10. Середа Т.В., Колбаско Т.В., Щучинова Л.Д. Эпидемиологические и клинические аспекты клещевого энцефалита в Республике Алтай. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2002; 4 (2): 103 – 106.
11. Конькова-Рейдман А.Б., Тер-Багдасарян Л.В., Злобин В.И. Изучение генетической структуры природных популяций вируса и эпидемиология клинических форм клещевого энцефалита на Южном Урале. Инфекционные болезни. 2013; 11 (приложение 1): 204, 205.
12. Казановцев С.Л., Катков В.В., Сологуб Т.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого вирусного энцефалита в Республике Коми. Инфекционные болезни. 2013; 11 (приложение 1): 177.

13. Злобин В.И. Клещевой энцефалит в Российской Федерации: этиология, эпидемиология и стратегия профилактики. *Инфекционные болезни*. 2010; 2: 13 – 21.
14. Мельникова О.В., Андаев Е.И., Вершинин Е.А., Мясникова С.И., Сидорова Е.А. Заболеваемость клещевым энцефалитом в Иркутске. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013620219; 2013.
15. Кондратьев В.Г., Быкова Л.А., Полторацкая Т.Н., Истраткина С.В. Эпидемическая ситуация по клещевому энцефалиту и болезни Лайма в г. Томске. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1998; 1: 52, 53.
16. Haglund M. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 291 (Suppl. 33): 50 – 54.
17. Zoldi V., Juhasz A., Nagy C., Papp Z., Egyed L. Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary: the epidemiological situation between 1998 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13(4): 256 – 265. Doi: 10.1089/vbz.2011.0905.
18. Борисов В.А., Аитов К.А., Малов И.В., Черногор Л.И., Плотнокова Ю.К., Лемешевская М.В. и др. Клинико-эпидемиологические аспекты клещевого энцефалита в Иркутской области. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2002; 2 (4): 39 – 41.
19. Фельдблюм И.В., Девятков М.Ю., Касьяненко Е.В., Окунева И.А. Эпидемиологическая эффективность акарицидных обработок при клещевом энцефалите. Современные аспекты природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора. Омск: ИЦ «Омский научный вестник»; 2011: 63.
20. Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Корзун В.М., Сидорова Е.А., Андаев Е.И. Особенности территориального распределения заболеваемости клещевым энцефалитом среди жителей г. Иркутска. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012; 2 (84). Ч. 1: 104 – 109.
21. Козлова И.В. Научное обоснование и пути совершенствования экстренной диагностики и профилактики трансмиссивных клещевых инфекций в условиях сочетанности природных очагов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Иркутск; 2008.
22. Официальный сайт Территориального органа Федеральной службы государственной статистики по Иркутской области: <http://irkutskstat.gks.ru>
23. Травина Н.С., Пригородова Е.В., Скрынник С.М., Погодина В.В., Левина Л.С., Калясникова Н.М. Заболеваемость очаговыми формами клещевого вирусного энцефалита в Курганской области (тенденции и характеристики) 2004 – 2012 гг.). *Инфекционные болезни*. 2013; 11 (приложение 1): 500.
24. Bogovic P., Lotric-Furlan S., Strle F. What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2010; 8: 246 – 250.
25. Grgic-Vitek M., Klavs I. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – challenge for vaccination policy. *Vaccine*. 2011; 29 (32): 5178 – 5183.
26. Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis. Clin. North Am.* 2008; 22 (3): 561 – 75.
27. Kaiser R. Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wien Med. Wochenschr.* 2012; 162 (11 – 12): 239-43. Doi: 10.1007/s10354-012-0105-0.
28. Захарычева Т.А. Новые и возвращающиеся клещевые природно-очаговые инфекции в Хабаровском крае. Актуальные проблемы природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней. Омск: ИЦ «Омский научный вестник». 2009: 68, 69.
29. Bohum r K., Cestm r B., Milan D., Marek M. Incidence of tick-borne encephalitis in the Czech republic in 2001 – 2011 in different administrative regions and municipalities with extended power. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2013; 62 (1): 9 – 18.
30. Stefanoff P., Zielicka-Hardy A., Hlebowicz M., Konior R., Lipowski D., Szenborn L. et al. New endemic foci of tick-borne encephalitis (TBE) identified in districts where testing for TBE was not available before 2009 in Poland. *Parasit Vectors*. 2013; 18; 6 (1): 80.
31. Haglund M. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 291 (Suppl. 33): 50 – 54.
32. Sundin M., Hansson M.E., Engman M.L., Orvell C., Lindquist L., Wide K. et al. Pediatric tick-borne infections of the central nervous system in the endemic region of Sweden: a prospective evaluation of clinical manifestations. *Eur. J. Pediatr.* 2011; 13.
33. Paziadora P., Struncova V., Svecova M. Tick-borne encephalitis in children and adolescents in the Czech Republic between 1960 and 2007. *World J. Pediatr.* 2012; 8 (4): 363 – 366. Doi: 10.1007/s12519-012-0383-z.
34. Ржанова Т.Г., Дубинина О.А., Лютая Н.И. Эпидемиологические особенности распространения клещевого вирусного энцефалита на территории Тюменской области. Актуальные проблемы природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней. Омск: ИЦ «Омский научный вестник». 2009: 55, 56.
35. Леонова Г.Н., Майстровская О.С., Борисевич В.Б. Антигенемия у людей, инфицированных вирусом клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1996; 6: 260 – 263.
36. Kriz V., Maly M., Benes C., Daniel M. Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech Republic 1970 – 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12 (11): 994 – 999. Doi: 10.1089/vbz.2011.0900.
37. Zeman P., Paziadora P., Benes C. Spatio-temporal variation of tick-borne encephalitis (TBE) incidence in the Czech Republic: Is the current explanation of the disease's rise satisfactory? *Ticks and Tick-borne diseases*. 2010; 1: 129 – 140.
38. Борисов В.А., Аитов К.А., Муляр Н.Ф. Клиника клещевого энцефалита в г. Иркутске. *Восточно-Сибирский журнал инфекционной патологии*. 1994; 1: 25, 26.
39. Мерзлова Н.Б., Самаров М.Н. Природно-очаговые трансмиссивные клещевые инфекции у детей Пермского края (алгоритм дифференциальной диагностики). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2012; 2: 23 – 27.
40. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Юшкова О.В. Функционирование паразитарной системы «клещ – возбудитель» в условиях усиливающегося антропогенного пресса. Санкт-Петербург; 2008.
41. Blasko-Markic M., Socan M. Tick-borne encephalitis in Slovenia: Data from a questionnaire survey. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12 (6): 496 – 502.
42. Шубин Н.В. Клещевой энцефалит (биология вируса и клеща, клиника, лечение, профилактика). Томск; 1953.
43. Окулова М.М., Чунихин С.П., Вавилова В.Е., Майорова А.Д. Локализация заражающего укуса клеща и тяжесть течения клещевого энцефалита. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1989; 5: 78 – 85.
44. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Левина Л.С., Маленко Г.В., Андаев Е.И., Карань Л.С. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя. *Вопросы вирусологии*. 2007; 5: 16 – 21.
45. Леонова Г.Н. Исторические этапы изучения клещевого энцефалита на Дальнем Востоке. *ЖМЭИ*. 1997; 5: 91 – 93.
46. Болотин Е.И. Медико-географическая оценка территории Приморского края относительно клещевого энцефалита с некоторыми замечаниями о структурной организации очагов данной инфекции. *Паразитология*. 2000; 34 (6): 371 – 379.
47. Randolph S.E. The shifting landscape of tick-borne zoonoses. *Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 2001; 356: 1045 – 1056.
48. Randolph S.E. Tick-borne disease systems. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* 2008; 27 (2): 383 – 398.
49. Мерзлова Н.Б., Серова И.А., Ягодина А.Ю. Классификации инфекционных и паразитарных болезней по социологическим критериям. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2011; 2: 35 – 39.
50. Stefanoff P., Rosinska M., Samuels S., White D.J., Morse D.L., Randolph S.E. A national case-control study identifies human socio-economic status and activities as risk factors for tick-borne encephalitis in Poland. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45511. Doi: 10.1371/journal.pone.0045511.
51. Sumilo D., Asokliene L., Avsic-Zupanc T., Bormane A., Vasilenko V., Lucenko I. et al. Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: Vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia. *Vaccine*. 2008; 26: 2580 – 2588.
52. Lambin E.F., Tran A., Vanwambeke S.O., Linard C., Soti V. Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors and their animal hosts. *Int. J. Health. Geogr.* 2010; 9 (54). [Published online.]
53. Kriz V., Benes C., Danielova V., Daniel M. Socio-economic conditions and other anthropogenic factors influencing tick-borne encephalitis incidence in the Czech Republic. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 293 (Suppl. 37): 63 – 68.
54. Щучинова Л.Д. Влияние автоматизации населения на заболеваемость клещевым энцефалитом в Республике Алтай. *Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции*. Новосибирск: Издательство Ареал*. 2013: 111.
55. Мишаева Н.П., Самойлова Т.И., Верещак Н.С., Вельгин С.О. Эпидемиологическая ситуация по клещевым нейроинфекциям в Республике Беларусь в условиях глобального потепления. Актуальные проблемы природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 70-летию теории академика Е.Н. Павловского о природной очаговости болезней. Омск: ИЦ «Омский научный вестник». 2009: 52, 53.
56. Kaiser R. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease. *InU. Med. Microbiol.* 2002; 291(Suppl. 33): 58 – 61.
57. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina, Ixodidae*): морфология, систематика, экология, медицинское значение. Ленинград: Наука; 1985.

References

1. Bondarenko A.L., Russkikh G.A., Khmelevskaya N.S., Utenkova E.O., Zykova I.V., Yaroshetskaya E.I. Modern epidemiological situation for tick-borne encephalitis in the Kirov region. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 2002; 3: 42 – 45 (in Russian).
2. Poponnikova T.V. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006; 296 (S. 1): 59 – 62.

3. Zlobin V.I., Borisov V.A., Verkhovina M.M., Malov I.V., Kholmogorova G.N. Tick-borne encephalitis in Eastern Siberia. Irkutsk: RIO VSNTs SO RAMN. 2002 (in Russian).
4. Ruzek D., Stastna H., Kopecky J., Golovljova I., Grubhoffer L. Rapid typing of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*. 2007; 144: 133 – 137.
5. Kozlova I.V., Verkhovina M.M., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Borisov V.A., Tuvakov M.K. et al. Results of genotyping of strains and RNA isolates of tick-borne encephalitis virus isolated from sick people in Irkutsk region and Buryat Republic. *Byulleten VSNTs SO RAMN*. 2012; 87 (5), Ч. 1: 231-235 (in Russian).
6. Leonova G.N. Tick-borne encephalitis: the actual aspects. Moscow: Publ. I.V. Balabanov; 2009 (in Russian).
7. Druzhinina T.A., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Yushchenko G.V., Skorodumova L.V., Sokolova I.A. et al. Tick-borne encephalitis in Yaroslavl region: epidemiological aspects, prevention. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni*. 2002; 5: 13 – 16 (in Russian).
8. Czupryna P., Moniuszko A., Panciewicz S.A., Grygorzuk S., Kondrusik M., Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993 – 2008 – epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients. *Eur. J. Neurol*. 2010; 12. Doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03278.
9. Borisov V.A., Zlobin V.I., Aitov K.A., Malov I.V., Kholmogorova G.N. Comparative clinic and epidemiologic characteristics of tick-borne encephalitis in different regions of the East Siberia. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2002a; 2 (4): 42, 43 (in Russian).
10. Sereda T.V., Kolbasko T.V., Shchuchina L.D. Epidemiological and clinical aspects of tick-borne encephalitis in Republic of Altai. *Byulleten VSNTs SO RAMN*. 2002; 4 (2): 103 – 106 (in Russian).
11. Konkova-Reydmann A.B., Ter-Bagdasaryan L.V., Zlobin V.I. Study of the genetic structure of natural viral populations and epidemiology of tick-borne encephalitis clinical forms in the South Urals. *Infeksionnyye bolezni*. 2013; 11 (приложение 1): 204 – 205 (in Russian).
12. Kazakovtsev S.L., Katkov V.V., Sologub T.V. Clinic and epidemiologic characteristics of tick-borne encephalitis in the Komy Republic. *Infeksionnyye bolezni*. 2013; 11 (Suppl. 1): 177 (in Russian).
13. Zlobin V.I. Tick-borne encephalitis in Russian Federation: etiology, epidemiology and prophylaxis strategy. *Infeksionnyye bolezni*. 2010; 2: 13 – 21 (in Russian).
14. Melnikova O.V., Andayev E.I., Vershinin E.A., Myasnikova S.I., Sidorova E.A. Tick-borne encephalitis morbidity in Irkutsk. *Data base № 2013620219*; 2013 (in Russian).
15. Kondratyev V.G., Bykova L.A., Poltoratskaya T.N., Istratkina S.V. epidemic situation for tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Tomsk. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 1998; 1: 52, 53 (in Russian).
16. Haglund M. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int. J. Med. Microbiol*. 2002; 291 (Suppl. 33): 50 – 54.
17. Zldi V., Juh sz A., Nagy C., Papp Z., Egyed L. Tick-borne encephalitis and Lyme disease in Hungary: the epidemiological situation between 1998 and 2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13 (4): 256 – 265. Doi: 10.1089/vbz.2011.0905.
18. Borisov V.A., Aitov K.A., Malov I.V., Chernogor L.I., Plotnikova Yu.K., Lemeshevskaya M.V. et al. Clinic and epidemiologic aspects of tick-borne encephalitis in the Irkutsk region. *Byulleten VSNTs SO RAMN*. 2002b; 2 (4): 39 – 41 (in Russian).
19. Feldblyum I.V., Devyatkov M.Yu., Kasyanenko E.V., Okuneva I.A. epidemiological effect of acaricidal anti-tick-borne encephalitis treatments. *Sovremennyye aspekty prirodnoy ochagovosti bolezney: Materialy Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 90-letiyu FBUN «Omskiy nauchno-issledovatel'skiy institut prirodnoochagovoykh infeksiiy» Rospotrebnadzora. Omsk: ITs «Omskiy nauchnyy vestnik»*. 2011: 63 (in Russian).
20. Melnikova O.V., Andayev E.I., Ershinin E.A., Myasnikova S.I., Sidorova E.A. Peculiarities of territorial distribution of tick-borne encephalitis morbidity within Irkutsk residents. *Byulleten VSNTs SO RAMN*. 2012; 2 (84). Ч. 1: 104 – 109 (in Russian).
21. Kozlova I.V. Scientific foundation and the ways of improvement of urgent diagnosis and prophylaxis of transmissible tick-borne infections in conditions of combined natural foci: PhD of med. sci. diss. Irkutsk; 2008 (in Russian).
22. Official website of the Irkutsk region territorial organ of the Federal statistics service. Available at: <http://irkutskstat.gks.ru> (in Russian).
23. Travina N.S., Prigorodova E.V., Skrynnik S.M., Pogodina V.V., Levina L.S., Kalyasnikova N.M. Tick-borne encephalitis local forms morbidity in the Kurgan region (trends and characteristics 2004-2012). *Infeksionnyye bolezni*. 2013; 11 (suppl. 1): 500 (in Russian).
24. Bogovic P., Lotric-Furlan S., Strle F. What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2010; 8: 246 – 250.
25. Grgic-Vitek M., Klavs I. High burden of tick-borne encephalitis in Slovenia – challenge for vaccination policy. *Vaccine*. 2011; 29 (32): 5178 – 5183.
26. Kaiser R. Tick-borne encephalitis. *Infect Dis. Clin. North Am*. 2008; 22 (3): 561 – 75.
27. Kaiser R. Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wien Med. Wochenschr*. 2012; 162 (11 – 12): 239 – 243. Doi: 10.1007/s10354-012-0105-0.
28. Zakharycheva T.A. Emerging and re-emerging tick-borne natural-foci infections in Khabarovsk region. *Aktualnyye problemy prirodnoy ochagovosti bolezney: Materialy Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 70-letiyu teorii akademika Ye.N. Pavlovskogo o prirodnoy ochagovosti bolezney. Omsk: ITs «Omskiy nauchnyy vestnik»*. 2009: 68, 69 (in Russian).
29. Bohum r K., Cestm r B., Milan D., Marek M. Incidence of tick-borne encephalitis in the Czech republic in 2001-2011 in different administrative regions and municipalities with extended power. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2013; 62 (1): 9 – 18.
30. Stefanoff P., Zielicka-Hardy A., Hlebowicz M., Konior R., Lipowski D., Szenborn L., et al. New endemic foci of tick-borne encephalitis (TBE) identified in districts where testing for TBE was not available before 2009 in Poland. *Parasit Vectors*. 2013; 18; 6 (1): 80.
31. Haglund M. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int. J. Med. Microbiol*. 2002; 291 (Suppl. 33): 50 – 54.
32. Sundin M., Hansson M.E., Engman M.L., Orvell C., Lindquist L., Wide K. et al. Pediatric tick-borne infections of the central nervous system in the endemic region of Sweden: a prospective evaluation of clinical manifestations. *Eur. J. Pediatr*. 2011; 13.
33. Pazdiora P., truncov V., vecov M. Tick-borne encephalitis in children and adolescents in the Czech Republic between 1960 and 2007. *World J. Pediatr*. 2012; 8 (4): 363 – 366. Doi: 10.1007/s12519-012-0383-z.
34. Rzhanova T.G., Dubinina O.A., Lyutaya N.I. Epidemiological peculiarities of tick-borne viral encephalitis in the Tyumen region. *Aktualnyye problemy prirodnoy ochagovosti bolezney: Materialy Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem, posvyashchennoy 70-letiyu teorii akademika Ye.N. Pavlovskogo o prirodnoy ochagovosti bolezney. Omsk: ITs «Omskiy nauchnyy vestnik»*. 2009: 55 – 56 (in Russian).
35. Leonova G.N., Maistrovskaya O.S., Borisevich V.B. Antigenemy in humans infected with tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 1996; 6: 260 – 263 (in Russian).
36. Kriz B., Maly M., Benes C., Daniel M. Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech Republic 1970-2008. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12 (11): 994 – 999. Doi: 10.1089/vbz.2011.0900.
37. Zeman P., Pazdiora P., Benes C. Spatio-temporal variation of tick-borne encephalitis (TBE) incidence in the Czech Republic: Is the current explanation of the disease's rise satisfactory? *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 2010; 1: 129 – 140.
38. Borisov V.A., Aitov K.A., Mulyar N.F. The tick-borne encephalitis clinical course in Irkutsk. *Vostochno-Sibirskiy zhurnal infeksionnoy patologii*. 1994; 1: 25 – 26 (in Russian).
39. Merzlova N.B., Samarov M.N. Natural-focal transmissible tick-borne infections in children in Perm region (algorithm of differential diagnosis). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 2012; 2: 23 – 27 (in Russian).
40. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Jushkova O.V. Funktioning of the «tick-pathogens» parasitic system under the influence of increasing anthropogenic pressing. *St. Petersburg; 2008* (in Russian).
41. Blasko-Markic M., Socan M. Tick-borne encephalitis in Slovenia: data from a questionnaire survey. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012; 12 (6): 496 – 502.
42. Shubin N.V. Tick-borne encephalitis (biology of virus and tick, clinic, treatment and prophylaxis). Tomsk; 1953.
43. Okulova M.M., Chunikhin S.P., Vavilova V.E., Mayorova A.D. Localization of infectious tick bite and tick-borne encephalitis heaviness. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 2007; 5: 16 – 20 (in Russian).
44. Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Malenko G.V., Andeev E.I., Karan L.S. Tick-borne encephalitis evolution and the problem of the agent evolution. *Voprosy virusologii*. 2007; 5: 16 – 21 (in Russian).
45. Leonova G.N. Historical stages of the tick-borne encephalitis investigations in the Far East. *ZhMEI*. 1997; 5: 91 – 93 (in Russian).
46. Bolotin E.I. Medical and geographical estimation of the Primorsky Krai territory for tick-borne encephalitis and some observations for focal structure of this infection. *Parazitologiya*. 2000; 34 (6): 371 – 379 (in Russian).
47. Randolph S.E. The shifting landscape of tick-borne zoonoses. Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil. Trans. R. Soc. Lond*. 2001; 356: 1045 – 1056.
48. Randolph S.E. Tick-borne disease systems. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz*. 2008; 27 (2): 383 – 398.
49. Merzlova N.B., Serova I.A., Yagodina A.Yu. Infectious and parasitic infections classification in sociologic criteria. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni*. 2011; 2: 35 – 39 (in Russian).
50. Stefanoff P., Rosinska M., Samuels S., White D.J., Morse D.L., Randolph S.E. A national case-control study identifies human socio-economic status and activities as risk factors for tick-borne encephalitis in Poland. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45511. Doi: 10.1371/journal.pone.0045511.

51. Sumilo D., Asokliene L., Avsic-Zupanc T., Bormane A., Vasilenko V., Lucenko I., et al. Behavioural responses to perceived risk of tick-borne encephalitis: Vaccination and avoidance in the Baltics and Slovenia. *Vaccine*. 2008; 26: 2580 – 2588.
52. Lambin E.F., Tran A., Vanwambeke S.O., Linard C., Soti V. Pathogenic landscapes: interactions between land, people, disease vectors and their animal hosts. *Int. J. Health. Geogr.* 2010; 9 (54). (Published online.)
53. Kriz B., Benes C., Danielova V., Daniel M. Socio-economic conditions and other anthropogenic factors influencing tick-borne encephalitis incidence in the Czech Republic. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 293 (Suppl. 37): 63 – 68.
54. Shchuchinova L.D. Motor-cars owing and its effect on tick-borne encephalitis morbidity in Altai Republic. *Diagnostika i profilaktika infektsionnykh bolezney: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Novosibirsk: Izdatel'stvo «Areal».* 2013: 111 (in Russian).
55. Mishayeva N.P., Samoylova T.I., Vereshchako N.S., Vel'gin S.O. Epidemiological situation for tick-borne neuroinfections in Belarus' in conditions of global warming. Actual problems of the natural foci of disease: Proceedings of the All-Russian conference with international participation, marking the 70th anniversary of the natural foci of disease theory of Academician E.N. Pavlovsky. Omsk: ITs «Omskiy nauchnyy vestnik». 2009: 52, 53 (in Russian).
56. Kaiser R. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany and clinical course of the disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 2002; 291 (Suppl. 33): 58 – 61.
57. The taiga tick *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina, Ixodidae*): morphology, systematic, ecology, medical importance. Leningrad: Nauka; 1985 (in Russian).

Основные особенности эпидемиологии клещевого риккетсиоза в Забайкальском крае

А.К. Носков¹(noskov-epid@mail.ru), А.О. Туранов², Е.И. Андаев¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае» Роспотребнадзора, г. Чита

Резюме

Эпидемиологический анализ заболеваемости клещевым риккетсиозом в Забайкальском крае за десятилетний период (2003 – 2012 гг.) показал, что в регионе наблюдается четкая тенденция к ее росту. Установлено, что наибольшая заболеваемость отмечалась в районах степной зоны со второй декады апреля до конца июня, с пиком в мае, в основном среди детей до 17 лет. Сельское население болело чаще городского. При тяжелом течении инкубационный период в среднем составлял 2,7 суток. Все тяжелые формы болезни отмечались в Оловянинском районе у неработающих мужчин и были связаны с присасыванием двух и более клещей.

Ключевые слова: клещевой риккетсиоз, заболеваемость, эпидемиологическая ситуация, территориальное распространение, сезонность, Забайкальский край

Main Features of the Epidemiology of Tick-borne Rickettsiosis in the Trans-Baikal Territory

A.K. Noskov¹ (noskov-epid@mail.ru), A.O. Turanov², E.I. Andaev¹

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Research Antiplague Institute of Siberia and Far East» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Federal Budget Institution of Public Health «Center of Hygiene and Epidemiology in the Trans-Baikal Territory» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance in Trans-Baikal Territory, Chita

Abstract

Epidemiological analysis of tick-borne rickettsiosis morbidity in Trans-Baikal territory for a decade (2003 – 2012) showed its clear increase in the region. It was established that the highest incidence rate was marked in steppe areas from second decade of April till the end of June with peak in May mainly in children till 17 years of old. Villagers were ill more often than the citizens. Acute incubatory period lasted at the average 2.7 days. All severe forms of the disease were observed in Olovyanninsk area in non-working men and were associated with adherence of two and more ticks.

Key words: tick-borne rickettsiosis, morbidity, epidemiological situation, territorial distribution, seasonal prevalence, Trans-Baikal territory

Введение

Риккетсиозы – группа вызываемых риккетсиями острых трансмиссивных инфекционных заболеваний, характеризующихся лихорадкой, интоксикацией и экзантемой [1]. Основным резервуаром и переносчиком являются иксодовые клещи родов

Dermacentor (*D. nuttalli*, *D. marginatus*, *D. silvarum*) и *Haemaphysalis* (*H. concinna*), вследствие чего зооареал риккетсиозов определяется распространением клещей [2].

В России регистрируется заболеваемость риккетсиозами двух групп клещевых пятнистых лихора-

док. В первую группу входит астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ), вызываемая возбудителем, относящимся к комплексу *Rickettsia conorii*. Основными переносчиками АПЛ являются клещи *Rhipicephalus pumilio*, природные очаги распространены в Астраханской области и на сопредельных с ней территориях. Ко второй группе риккетсиозов относится клещевой риккетсиоз (КР). Возбудитель КР – *R. sibirica sensu stricto*, основные переносчики – клещи родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis concinna*. Эпидемически активные очаги КР расположены преимущественно в азиатской части России и в Казахстане.

В настоящее время природные очаги КР зафиксированы в 16 субъектах Российской Федерации, главным образом в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (СФО, ДФО). В 2003 – 2012 годах существенный рост заболеваемости отмечался в Западной Сибири (Алтайский край, Республика Алтай) и на Дальнем Востоке. Кроме того, высокие показатели заболеваемости отмечаются в Республиках Хакасия, Бурятия, Тува, в Еврейской автономной области. В двух регионах – Алтайском и Красноярском краях – в последнее время регистрируется основная заболеваемость КР [<http://www.infectology.ru/publik/stat48.aspx>; 3 – 5].

Цель работы – выявление особенностей территориального распространения и основных эпидемиологических характеристик КР в Забайкальском крае в 2003 – 2012 годах.

Материалы и методы

Ретроспективный эпидемиологический анализ ситуации по КР в 2003 – 2012 годах в Забайкальском крае проведен по материалам Центра гигиены и эпидемиологии в Забайкальском крае и Референс-центра по мониторингу за природно-очаговыми болезнями бактериальной и вирусной этиологии (Иркутский научно-исследовательский противочумный институт), включающим сведения о заболеваемости по муниципальным районам, клиническим формам болезни, возрастным группам заболевших, датам регистрации и др. На основе этих материалов нами создана база данных «ГИС. Заболеваемость клещевым риккетсиозом в Забайкальском крае», разработанная с применением стандартной программной оболочки Microsoft Office Access 2007.

В работе использованы сведения 293 карт эпидемиологического обследования больных за 2003 – 2012 годы.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica (StatSoft) [6].

Результаты и обсуждение

Одной из эндемичных по КР территорий СФО является Забайкальский край (до 2008 г. – Читинская область). Официальная регистрация КР в крае введена с 1966 года.

В 2003 – 2012 годах в Забайкальском крае сохранялась напряженная эпидемиологическая обстановка по КР, в этот период зарегистрировано 293 больных (табл. 1) – от 8 (2005 г.) до 63 (2007 г.) заболевших при интенсивном показателе 0,75 – 5,9 на 100 тыс. населения соответственно. Средний многолетний показатель (СМП) составил $2,8 \pm 0,5$ на 100 тыс. населения. По годам заболеваемость регистрировалась в четырех (2005 г.) – одиннадцати (2009 г.) муниципальных районах и в г. Чите.

Заболеваемость характеризовалась цикличностью – чередованием периодов подъема и снижения. Однако изучение тенденций динамики развития эпидемического процесса на моделях третьего порядка (рис. 1) показало, что на фоне снижения заболеваемости в РФ ($T_{\text{сн.}} = -13,3\%$) и СФО ($T_{\text{сн.}} = -3,9\%$) в Забайкальском крае наблюдается ее рост ($T_{\text{пр.}} = 112,8\%$).

В течение анализируемого периода заболеваемость распределялась неравномерно. В первый пятилетний период (2003 – 2007 гг.) зарегистрировано $40,9 \pm 2,9\%$ от всех случаев ($n = 120$, $T_{\text{пр.}} = 168,1\%$, СМП $2,3 \pm 0,5$ на 100 тыс. населения). Заболевания людей отмечались в 10 районах края и г. Чите, показатель повторяемости (ПП) варьировал от 0,2 (Сретенский и Забайкальский районы) до 0,8 (Ононский, Шилкинский, Читинский районы и г. Чита). Во второй период (2008 – 2012 гг.) в крае наблюдались рост заболеваемости и расширение ареала КР. В этот период заболело 173 человека ($59,1 \pm 2,9\%$ от всех зарегистрированных случаев КР), СМП составил $3,3 \pm 0,6$ на 100 тыс. населения, темп прироста – 91,7%. Заболевания отмечались в 16 районах и г. Чите, причем в Агинском, Могойтуйском, Дульдургинском, Оловянинском, Читинском районах и г. Чите (см. табл. 1) заболеваемость регистрировалась ежегодно (ПП = 1). По нашему мнению, стабильное увеличение количества выявляемых больных во второй пятилетний период связано с улучшением диагностики КР на основании клинических и эпидемиологических данных, а также совершенствованием лабораторных методов подтверждения диагноза.

В последнее десятилетие (2003 – 2012 гг.) заболеваемость КР регистрировалась в 17-ти из 31-го муниципального района края и в г. Чите. В десяти районах (Ононский, Борзинский, Сретенский, Александрово-Заводский, Акшинский, Нерчинский, Калганский, Бaleyский, Забайкальский, Краснокамский) отмечались спорадические случаи. В этих районах проживает 208 911 человек (19,1% от численности населения края), среди которых зарегистрировано 26 случаев заболевания ($8,9 \pm 1,7\%$ от всех зарегистрированных случаев КР), СМП составил $1,2 \pm 0,8$ на 100 тыс. населения. Показатель повторяемости колебался от 0,1 в семи районах до 0,5 в одном районе (см. табл. 1). Спорадическая заболеваемость КР в этой группе территорий не влияет на общие тенденции развития эпидемического процес-

Рисунок 1.
Динамика заболеваемости КР в Российской Федерации, Сибирском федеральном округе и Забайкальском крае в 2003 – 2012 годах

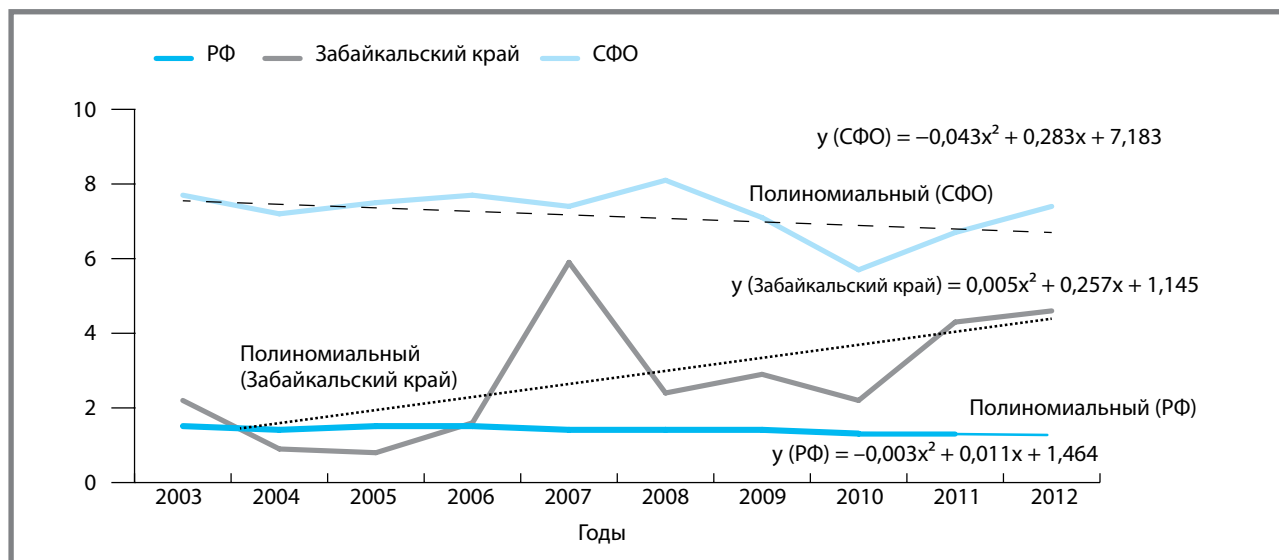


Таблица 1.
Заболеваемость населения Забайкальского края КР по муниципальным районам

№ п/п	Муниципальные районы	2003 – 2007 гг.		2008 – 2012 гг.		2003 – 2012 гг.		Показатель повторяемости (ПП)		
		всего (абс.)	СМП заболеваемости (°/10000 ± m)	всего (абс.)	СМП заболеваемости (°/10000 ± m)	всего (абс.)	СМП заболеваемости (°/10000 ± m)	2003 – 2007 гг.	2008 – 2012 гг.	2003 – 2012 гг.
1	Агинский	12	7,8 ± 5,02	50	32,4 ± 10,2	62	20,1 ± 8,1	0,6	1	0,8
2	Могойтуйский	15	10,8 ± 6,2	40	28,8 ± 10,2	55	19,8 ± 8,4	0,4	1	0,7
3	Дульдургинский	16	20,5 ± 11,5	13	16,6 ± 10,3	29	18,5 ± 10,9	0,6	1	0,8
4	Оловянинский	21	8,7 ± 4,3	31	12,9 ± 5,2	52	10,8 ± 4,7	0,6	1	0,8
5	Ононский	6	8,9 ± 8,1	1	1,5 ± 3,3	7	5,2 ± 6,2	0,8	0,2	0,5
6	Шилкинский	17	7,2 ± 3,9	7	2,9 ± 2,5	24	5,1 ± 3,3	0,8	0,6	0,7
7	Приаргунский	8	6,03 ± 4,8	4	3,02 ± 3,4	12	4,5 ± 4,1	0,6	0,2	0,4
8	Александрово-Заводский	0	0	2	3,9 ± 6,2	2	1,9 ± 4,3	0	0,2	0,1
9	Акшинский	0	0	2	3,6 ± 5,7	2	1,8 ± 4,03	0	0,2	0,1
10	Сретенский	3	2,2 ± 2,8	1	0,7 ± 1,6	4	1,5 ± 2,3	0,2	0,2	0,2
11	Борзинский	0	0	5	2,7 ± 2,7	5	1,3 ± 1,9	0	0,4	0,2
12	Калганский	0	0	1	2,1 ± 4,5	1	0,9 ± 2,9	0	0,2	0,1
13	г. Чита и Читинский район	21	1,1 ± 0,5	12	0,6 ± 0,4	33	0,9 ± 0,5	0,8	1	0,9
14	Нерчинский	0	0	2	1,4 ± 2,2	2	0,7 ± 1,5	0	0,2	0,1
15	Балейский	0	0	1	1,3 ± 2,9	1	0,7 ± 2,2	0	0,2	0,1
16	Забайкальский	1	0,9 ± 2,1	0	0	1	0,5 ± 1,5	0,2	0	0,1
17	Краснокаменский	0	0	1	0,6 ± 1,3	1	0,3 ± 0,9	0	0,2	0,1
Всего по Забайкальскому краю		120	2,3 ± 0,5	173	3,3 ± 0,6	293	2,8 ± 0,5			

са в крае и может быть объяснена, во-первых, отсутствием настороженности медицинского персонала лечебно-профилактических организаций в отношении этого заболевания, во-вторых, низкой активностью природных очагов КР. Эти предположения требуют детального изучения.

С целью определения основных закономерностей динамики течения эпидемического процесса КР в Забайкальском крае в 2003 – 2012 годах нами проведен ретроспективный анализ заболеваемости на восьми наиболее неблагополучных по КР административных территориях (рис. 2), на которых проживает 568 788 человек, из них 54,8 ± 0,07% – жители краевого центра. На этих территориях зарегистрировано 267 случаев КР (91,1 ± 1,7% от всех зарегистрированных случаев КР). СМП

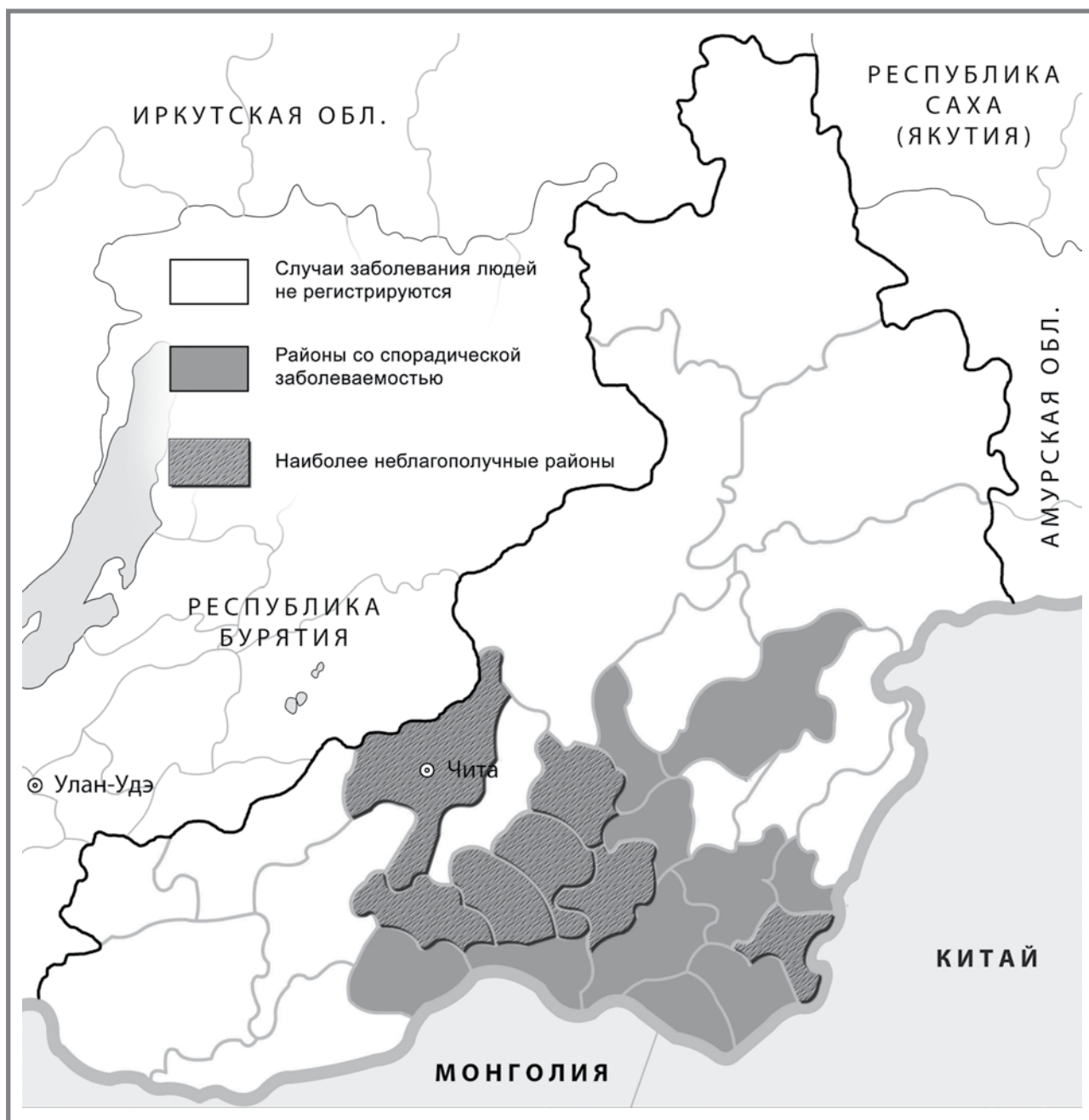
составил $4,7 \pm 0,9$ на 100 тыс. населения и превысил аналогичный показатель по краю ($2,8 \pm 0,5$ на 100 тыс. населения) в 1,7 раза.

Заболеваемость на 100 тыс. населения по ландшафтной приуроченности представлена следующим образом:

- степная зона – Агинский ($20,1 \pm 8,1$), Могойтуйский ($19,8 \pm 8,4$), Дульдургинский ($18,5 \pm 10,9$) и Оловянинский ($10,8 \pm 4,7$) районы;
- горно-лесостепная зона – Шилкинский ($5,1 \pm 3,3$) и Приаргунский ($4,5 \pm 4,1$) районы;
- лесостепная зона – г. Чита и Читинский район ($0,9 \pm 0,5$).

Установлено, что наибольшее количество заболевших ($n = 198, 74,2 \pm 2,7\%$) приходится на степ-

Рисунок 2.
Территориальное распространение КР в Забайкальском крае в 2003 – 2012 годах



ную зону, средний показатель заболеваемости в этих районах составил $16,2 \pm 3,6$ на 100 тыс. населения (см. табл. 1).

Для КР в Забайкальском крае, как и для других эндемичных регионов, характерна четкая сезонность. Выявление критических значений сезонного подъема заболеваемости КР проводили с применением процедуры построения диаграмм размаха [6]. Установлено, что выраженный сезонный подъем заболеваемости отмечался со второй декады апреля – 15-й календарной недели (к.н.) и продолжался до конца июня (26 к.н.). Средняя длительность первого сезонного подъема составляла $84 \pm 1,3$ дня. В этот период зарегистрировано $78,7 \pm 2,5\%$ от всех случаев КР в крае. Пик заболеваемости отмечался с первых чисел мая (18-я к.н.) до конца месяца (22-я к.н.) и длился $35 \pm 2,5$ дня. На эту фазу эпидемического процесса пришлось $48,3 \pm 3,1\%$ ($n = 129$) от всего количества больных, или $61,4 \pm 3,4\%$ от числа зарегистрированных случаев в период первого сезонного подъема (рис. 3). Этот сезонный подъем формировался преимущественно за счет максимального проявления инфекции в районах, входящих в степную зону (Агинский, Могойтуйский, Дульдургинский и Оловянинский районы), на которые пришлось $68,9 \pm 4,1\%$ от общего числа больных. Второй, менее выраженный, подъем заболеваемости наблюдался в июле (27 – 31-я к.н.), в течение которого регистрировалось $13,5 \pm 2,1\%$ ($n = 36$) больных.

Третий подъем менее значим и характерен для первой половины сентября (36 – 37-я к.н.), на него приходилось $2,9 \pm 1,02\%$ больных.

Несмотря на то что в анализируемой выборке районов городское население ($73,5 \pm 0,1\%$) преобладает над сельским ($26,5 \pm 0,1\%$), абсолютное количество больных среди сельских жителей ($n = 162$) в 1,5 раза больше, чем среди городских

($n = 105$). В среднем заболеваемость сельского населения ($11,3 \pm 2,8$ на 100 тыс. населения) в 4,2 раза превышает заболеваемость городского ($2,7 \pm 0,8$ на 100 тыс. населения).

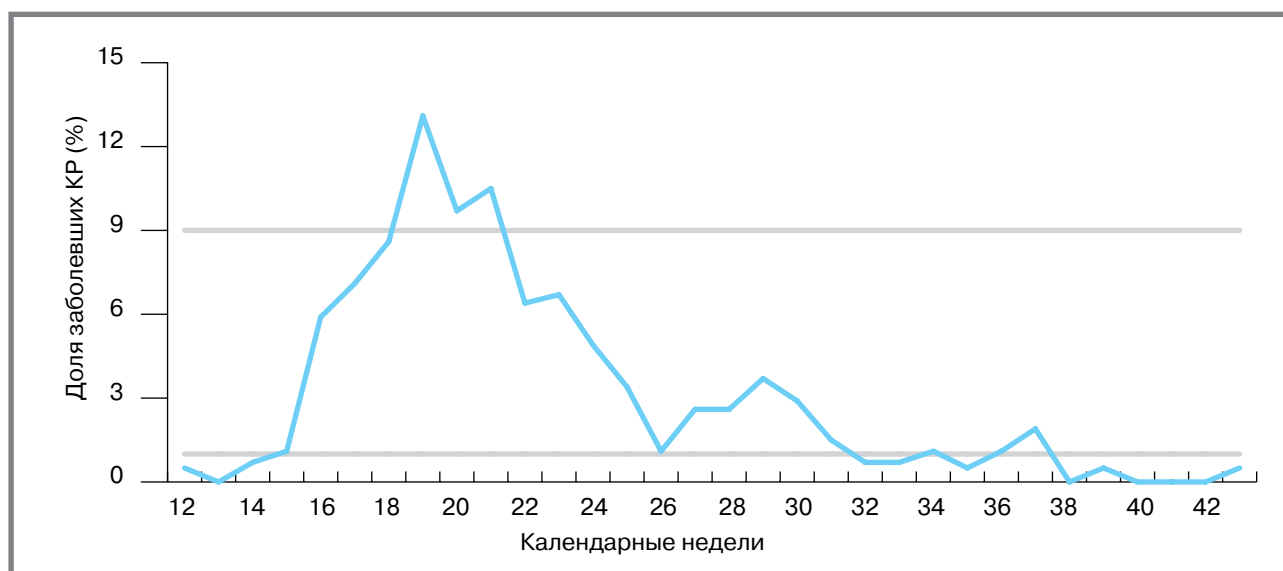
Различий между заболеваемостью мужского ($50,9 \pm 3,1\%$) и женского населения ($49,1 \pm 3,1\%$) не выявлено. Случаи КР регистрировались во всех возрастных группах, однако СМП среди детей в возрасте до 17 лет составил $5,4 \pm 1,9$ на 100 тыс. населения и был в 1,1 раза выше, чем у взрослого населения ($4,8 \pm 1,1$ на 100 тыс. населения). Среди взрослого населения основное количество больных выявлено в возрастных группах: 50 – 59 ($18,4 \pm 2,4\%$) и 30 – 39 ($15,7 \pm 2,2\%$) лет, несколько меньше среди лиц 40 – 49 ($13,9 \pm 2,1\%$) и 18 – 29 ($13,5 \pm 2,1\%$) лет. Наименьшая заболеваемость приходилась на группу лиц старше 60 лет ($9,7 \pm 1,8\%$).

В прошедшее десятилетие (2003 – 2012 гг.) КР болели люди различных профессий и социальных групп. Однако в структуре заболеваемости преобладали лица, посещавшие природные биотопы с бытовыми целями ($94,1 \pm 2,1\%$). Доля заболевших, профессиональная деятельность которых связана с работами в природных очагах КР, составила $5,9 \pm 1,4\%$. По результатам эпидемиологического расследования установлено, что «профессиональные» заражения связаны с особенностями хозяйственной деятельности населения. В муниципальных районах степной зоны болели лица ($n = 12$), постоянно проживающие на чабанских стоянках крупного и мелкого рогатого скота. В районах горно-лесостепной и лесостепной ландшафтных зон зарегистрировано четыре случая КР: у пастуха, ветеринарного врача, водителя и повара.

Среди различных социальных групп основное количество случаев КР выявлялось: у неработающего населения ($31,2 \pm 2,8\%$), у детей в возрасте до

Рисунок 3.

Внутригодовая еженедельная динамика заболеваемости КР в наиболее неблагополучных районах Забайкальского края и г. Чите в 2003 – 2012 годах



7 лет ($15,8 \pm 2,2\%$, причем из них $71,4 \pm 6,7\%$ были неорганизованные дети), у школьников – $11,2 \pm 1,9\%$, у пенсионеров – $9,7 \pm 1,8\%$, у чабанов – $8,7 \pm 1,7\%$, у лиц других специальностей, связанных с животноводством, – $5,6 \pm 1,4\%$.

Свое заболевание связывали с присасыванием клеща $91,1 \pm 1,7\%$ больных, и лишь $8,9 \pm 1,8\%$ ($n = 24$) отрицали этот факт. Показано, что в $66,7 \pm 3,02\%$ случаев присасывание клещей происходило при посещении степных и лесостепных биотопов, в $31,7 \pm 2,9\%$ – окрестностей вблизи населенных пунктов. На территориях населенных пунктов присасывание клещей отмечали только четыре человека ($1,6 \pm 0,8\%$). По локализации – большинство присасываний клещей приходилось на голову ($54,3 \pm 3,2\%$ от числа пострадавших лиц), значительно меньше – на туловище ($17,7 \pm 2,4\%$), верхние конечности ($9,1 \pm 1,8\%$), шею ($5,8 \pm 1,5\%$), нижние конечности ($3,7 \pm 1,2\%$). В $9,4 \pm 1,9\%$ случаев пострадавшие указывали на присасывание двух и более клещей.

Анализ клинико-эпидемиологических данных показал, что длительность инкубационного периода варьировала от нескольких часов до 73 суток, при тяжелых формах болезни – в среднем 2,7 суток. У большинства больных ($52,9 \pm 3,2\%$) инкубационный период длился от 0 до 6 суток; в $34,1 \pm 3,04\%$ случаев – от 7 до 13; в $2,9 \pm 1,1\%$ – от 14 до 20 и в $1,2 \pm 0,7\%$ – более 21 суток. В основном ($82,1 \pm 2,3\%$) заболевания КР были средней степени тяжести, легкое течение регистрировалось в $16,8 \pm 2,3\%$ случаев, тяжелое – в $1,1 \pm 0,6\%$. Необходимо отметить, что все тяжелые формы болезни приходились на Оловянинский район, наблюдались у неработающих мужчин в возрасте 30 – 39 ($n = 2$) и 50 – 59 ($n = 1$) лет

и были связаны с присасыванием двух и более клещей.

Выводы

1. В 2003 – 2012 годах в Забайкальском крае наблюдался рост ($T_{np} = 112,8\%$) заболеваемости КР на фоне ее снижения в РФ и СФО. К территориям повышенного риска инфицирования отнесены Агинский, Могойтуйский, Дульдургинский, Оловянинский, Шилкинский, Приаргунский, Читинский муниципальные районы и г. Чита, на которые приходилось $91,1 \pm 1,7\%$ от всех зарегистрированных случаев КР (СМП $4,7 \pm 0,9$ на 100 тыс. населения).
2. Наиболее интенсивно эпидемический процесс протекал в районах, относящихся к степной ландшафтной зоне.
3. Сезонный подъем отмечался со второй декады апреля и продолжался до конца июня, когда было выявлено $78,7 \pm 2,5\%$ больных. Пик заболеваемости отмечался в течение мая и длился $35 \pm 2,5$ дня.
4. Основное количество больных регистрировалось среди детей до 17 лет. У взрослых заболеваемость превалировала среди неработающих лиц в возрасте 50 – 59 и 30 – 39 лет и не зависела от пола. Заболеваемость сельских жителей значительно превышала заболеваемость городских.
5. В большинстве случаев инкубационный период КР длился от 0 до 6 суток, а при тяжелых формах болезни в среднем составлял 2,7 суток. Все тяжелые формы болезни отмечались в Оловянинском районе у неработающих мужчин и были связаны с присасыванием двух и более клещей.

Литература

1. Тарасевич И.В. Современные представления о риккетсиозах. Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2005; 7 (2): 119 – 129.
2. Малеев В.В. Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций. Клиническая микробиология, антимикробная химиотерапия. 2005; 7 (2): 130 – 153.
3. Аитов К.А., Борисов В.А., Малов И.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого риккетсиоза. В кн.: Актуальные вопросы инфекционной патологии. Выпуск второй. Иркутск; 1999; 83 – 85.
4. Алексеев А.Н., Буренкова Л.А., Васильева И.С. и др. Функционирование очагов смешанных клещевых инфекций на территории России. Медицинская паразитология. 1996; 4: 9 – 16.
5. Рудаков Н.В., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз. Омск; 2001.
6. Халафян А.А. Statistica 6. Математическая статистика с элементами теории вероятности. Москва: Бином; 2011.

References

1. Tarasevich I.V. Modern notions about rickettsioses. Clinical Microbiology, Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 7 (2): 119 – 129.
2. Maleev V.V. Review of the European recommendations to diagnostics of tick-borne bacterial infections. Clinical Microbiology, Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 7 (2): 130 – 153 (in Russian).
3. Aitov K.A., Borisov V.A., Malov I.V. Clinical-epidemiological characteristic of tick-borne rickettsiosis. In: Actual Problems of Infectious Pathology. Issue 2. Irkutsk; 1999; 83 – 85 (in Russian).
4. Alekseev A.N., Burenkova L.A., Vasileva I.S. et al. Functioning of mixed tick-borne infection foci in Russia. Medical Parasitology. 1996; 4: 9 – 16.
5. Rudakov N.V., Obert A.S. Tick-borne rickettsiosis. Omsk; 2001 (in Russian).
6. Halafyan A.A. Statistica 6. Mathematical statistics with the probability theory elements. Moscow: Binomial; 2011 (in Russian).

Errata

В статье «Случай развития хронического клещевого энцефалита у вакцинированного пациента», опубликованной в № 3(76), на странице 107 в правом столбце допущены неточности в ссылках: вместо [9 – 12] должно быть [9 – 11], вместо [13] и [14] – [12], вместо [15] – [13, 14] и вместо [16] – [15, 16]. Редакция приносит извинения за допущенные ошибки.

Актуальные вопросы эпиднадзора за лептоспирозами в Иркутской области

Е.Ю. Киселева¹ (adm@chumin.irkutsk.ru), Н.В. Бренева¹, М.Б. Шаракшанов¹, А.К. Носков¹, С.А. Борисов¹, М.В. Чеснокова¹, Т.П. Баландина², Л.П. Нурсаянова², М.В. Лемешевская³, С.В. Балахонов¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²Управление Роспотребнадзора по Иркутской области, Иркутск

³ГБОУ ВПО «Иркутский ГМУ» Минздрава России

Резюме

Проведено эпизоотолого-эпидемиологическое обследование территории Иркутской области, выявлены и документированы активные природные и антропогенные очаги лептоспирозов в семи муниципальных районах и в г. Иркутске. Специфические фрагменты ДНК лептоспир обнаружены в $13,7 \pm 3,1\%$ исследованных сывороток людей, процент положительно реагирующих сывороток в реакции микроагглютинации (РМА) составил $4,7 \pm 1,3\%$. При исследованиях мелких млекопитающих изолировано два штамма лептоспир от арктических бурозубок (*Sorex arcticus*), отловленных на болотно-озерном комплексе г. Иркутска. Процент положительных находок при исследовании мелких млекопитающих составил в ПЦР $20,6 \pm 2,2\%$, в РМА – $1,9 \pm 0,6\%$. Своеобразие проявлений лептоспирозной инфекции в регионе, по-видимому, связано с климатогеографическими особенностями, что требует дальнейшего наблюдения и изучения.

Ключевые слова: лептоспироз, мониторинг, Иркутская область

Actual Problems of Epidemiological Surveillance for Leptospiroses in Irkutsk Region

E.Yu. Kiseleva¹ (adm@chumin.irkutsk.ru), N.V. Breneva¹, M.B. Sharakshanov¹, A.K. Noskov¹, S.A. Borisov¹, M.V. Chesnokova¹, T.P. Balandina², L.P. Nursajanova², M.B. Lemeshevskaya³, S.V. Balakhonov¹

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Territorial Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance of Irkutsk Region, Irkutsk

³State Educational Institution of Higher Professional Training «Irkutsk State Medical University» of Ministry of Health Care of Russia, Irkutsk

Abstract

Epizootological-epidemiological inspection of the Irkutsk Region territory was performed, active natural and anthropogenic leptospirosis foci were revealed and registered in seven municipal areas and in Irkutsk city. Specific fragments of *Leptospira* DNA were found in $13.7 \pm 3.1\%$ of the human sera investigated, the rate of positive in microagglutination reaction (MAR) sera was $4.7 \pm 1.3\%$. Two *Leptospira* strains were isolated from small mammals notably Arctic shrews (*Sorex arcticus*) caught in a marsh-lake complex in Irkutsk City. The rate of positive results at the small mammal inspections was $20.6 \pm 2.2\%$ by PCR and $1.9 \pm 0.6\%$ by MAR. Apparently, the originality of *Leptospira* infection manifestations in the region was connected with climate-geographical features that require the further observation and investigation.

Key words: leptospirosis, monitoring, Irkutsk region

Введение

Лептоспирозы составляют группу природно-очаговых нетрансмиссивных зоонозных инфекций, возбудителями которых являются патогенные лептоспиры, встречающиеся на всех континентах земного шара, кроме Антарктиды [1 – 4]. Количество зарегистрированных сероваров лептоспир постоянно увеличивается, уступая в этом только энтеробактериям [5]. Возбудители лептоспирозов паразитируют в организме различных сельскохозяйственных, домашних и диких животных. Более ста видов диких млекопитающих и птиц могут быть носителями патогенных лептоспир [1, 4]. Инфицирование людей происходит контактным или водным

путем через объекты окружающей среды, контаминированные мочой зараженных животных.

Эпидемическая ситуация по лептоспирозам в Российской Федерации продолжает оставаться неблагоприятной. Средний показатель летальности от лептоспирозной инфекции в России составляет 3 – 4% от всех случаев инфицирования, однако на отдельных территориях, эндемичных по иктерогеморрагическому и каникулезному лептоспирозам, он достигает 20% и более [6].

В Сибирском федеральном округе, по данным Референс-центра по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями Иркутского научно-исследовательского противочумного института,

среднегодовалый показатель заболеваемости лептоспирозами в 2001 – 2010 годах был в восемь раз ниже среднероссийского уровня и составлял 0,084 на 100 тыс. населения [7].

В Иркутской области эпидемический процесс лептоспироза характеризуется спорадическими случаями. По данным Референс-центра, с 2001 по 2012 год официально зарегистрировано три случая лептоспироза.

Лептоспирозная инфекция на территории области недостаточно глубоко изучена, поэтому необходимо пополнить знания об инфицированности патогенными лептоспирами сельскохозяйственных, домашних и диких животных, о циркуляции возбудителей в объектах окружающей среды, а также отследить изменения этиологической структуры лептоспирозов людей и животных. Знание региональных особенностей эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозов позволит оценить территорию по ее эпидемиологической значимости и обосновать проведение определенных противоэпидемических мероприятий.

Цель работы – ретроспективный эпизоотолого-эпидемиологический анализ ситуации по лептоспирозам на территории Иркутской области и проспективное наблюдение (мониторинг) за природными и антропогенными очагами с использованием комплекса лабораторных методов диагностики.

Материалы и методы

Совместно с Управлением Роспотребнадзора по Иркутской области и учреждениями областной службы ветеринарии в 2010 – 2013 годах было проведено эпидемиологическое и эпизоотологическое обследование территорий Эхирит-Булагатского, Нижнеудинского, Иркутского, Усть-Илимского, Нукутского районов Иркутской области и г. Иркутска и исследован материал из Усольского, Боханского и Зиминского районов 600 мелких млекопитающих (27 видов) и 15 видов птиц, сыворотки крови 32 особей крупного рогатого скота (КРС) и 369 собак.

По эпидемиологическим показаниям исследовано (серологическим методом на наличие антител к лептоспирам и молекулярно-генетическим методом на обнаружение участков ДНК) 305 сывороток крови животноводов и жителей семи районов области (Эхирит-Булагатский, Нижнеудинский, Иркутский, Зиминский, Боханский, Усольский, Нукутский) и г. Иркутска.

Лабораторные исследования проводили на базе Референс-центра бактериологическим (микроскопия в темном поле и посев на жидкие питательные среды), биологическим (биопробы на морских свинках и золотистых хомячках), серологическим (реакция микроагглютинации – РМА), молекулярно-генетическим (полимеразная цепная реакция – ПЦР) методами и одним из новейших методов – масс-спектрометрии MALDI-ToF.

Пробы мочи и почек диких и подопытных животных изучали методом «темнопольной» микроскопии. Посевы крови, почек диких и подопытных животных осуществляли на жидкие питательные среды Ферворта–Вольфа и Элленгаузена–МакКаллоха в модификации Джонсона–Харриса – EMJH (Becton Dickinson). Для повышения эффективности бактериологических исследований часть диких мелких млекопитающих были отловлены и доставлены в лабораторию живыми, высеив крови и коркового вещества почек на питательные среды проводился сразу после вскрытия. Мочу параллельно сеяли на среды с добавлением 200 мкг/мл 5-фторурацила, инкубировали при 28 °С, просмотр посевов проводили на 7-е, 14-е и 21-е сутки. Биопробных животных заражали внутрибрюшинно 1,0 мл взвеси почек отловленных зверьков. Забор крови из сердца морских свинок осуществляли на следующий день, мочи – на 10-е сутки.

Для постановки РМА в качестве антигена использовали диагностический набор из 7 – 10-дневных культур эталонных штаммов лептоспир, все манипуляции выполняли в соответствии с МУ 3.1.1128-02 «Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний людей лептоспирозами». Серогрупповую принадлежность лептоспир определяли в РМА с помощью «Набора сывороток групповых агглютинирующих лептоспирозных» (ФГУП «Армавирская биофабрика»).

ПЦР-диагностику проводили согласно требованиям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности». Экстракцию суммарного препарата ДНК/РНК осуществляли с помощью сертифицированного набора «РИБО-сорб», ПЦР ставили в режиме реального времени с тест-системой «АмплиСенс® *Leptospira*-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва) на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbet Research, Австралия).

MALDI-ToF масс-спектрометрию прямого белкового профилирования, анализ спектров, построение дендрограмм, генерацию референсных библиотек и идентификацию выполняли с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Для получения референсных спектров семидневные культуры концентрировали центрифугированием и белки из осадка культуры экстрагировали по протоколу для изолированных колоний [11]. Образцы исследовались в 10 – 12 повторях на масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы Flex Control 3.3.

Проанализированы данные заболеваемости лептоспирозной инфекцией людей и животных из архивных материалов Управления Роспотребнадзора по Иркутской области. Изучены две истории болезни лиц с диагнозом «лептоспироз», находившихся в 2011 и 2012 годах на лечении в

Иркутской областной инфекционной клинической больницы, и 16 историй болезни лиц, находившихся в 2010 – 2011 годах на лечении в Тугуйской участковой больнице с заболеваниями, клинические проявления которых не исключают лептоспироз (пиелонефрит, цистит, гепатит и др.). Проведено эпидемиологическое обследование очага лептоспироза в Эхирит-Булагатском районе.

Результаты и обсуждение

Впервые в Иркутской области случаи лептоспироза наблюдали в 1951 году, когда возникли массовые заболевания военнослужащих, затем в 1953 году произошла вспышка с водным механизмом передачи среди гражданского населения в Иркутском районе. В те годы заболевания отмечались повсеместно в виде вспышек, групповых и единичных случаев. Возбудитель лептоспироза был выделен в 1966 году от больного человека (серогруппа *Tarassovi*), заражение носило профессиональный характер, источником явились больные свиньи [8].

Начиная с 1960-х годов отмечались спорадические случаи инфекции, чаще всего среди лиц, занимающихся животноводством. Целенаправленное изучение территории Иркутской области было проведено сотрудниками Иркутского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии в 1967 – 1973 годах. Обширные исследования 15 районов позволили выявить природные очаги, установить преимущественную циркуляцию патогенных лептоспир серологических групп *Pomona*, *Hebdomadis*, *Tarassovi* и реже – *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* в районах с развитым животноводством [8].

Несмотря на официальную регистрацию этой инфекции в стране с 1950 года, на территории Иркутской области официальное документирование началось лишь с 1978 года. По данным Управления Роспотребнадзора по Иркутской области, с 1978 по 1993 год было выявлено пять единичных случаев лептоспироза. Обращает на себя внимание вспышка инфекции, зарегистрированная в июле 1994 года в Нижнеудинском районе. Было выявлено 12 человек со среднетяжелым и тяжелым течением болезни. В ходе лабораторных исследований получены положительные серологические реакции (66,6%) в титрах от 1:100 до 1:1600 к лептоспирам серогруппы *Grippotyphosa*. В результате эпидемиологического обследования установлено, что с 15 июля по 10 августа 1994 года 11 из 12 заболевших находились на сельскохозяйственных работах в районе рек Муксут и Аин, употребляли сырую воду, купались в открытых водоемах. Из 12 заболевших – 10 мужчин (83,3%). Основное количество больных пришлось на молодых работоспособных лиц 30 – 39 лет (33,3%). Учреждениями государственного санитарно-эпидемиологического надзора совместно с учреждениями здравоохранения организован комплекс профилактических и противоэпидемических

мероприятий, позволивший в кратчайшие сроки купировать вспышку.

Затем был период затишья, лишь в 2006 году был снова выявлен случай лептоспироза: мужчина, вернувшись из Краснодарского края в Иркутск, внезапно почувствовал слабость и недомогание, резко повысилась температура тела, появились боли в икроножных мышцах и крупных суставах. Больному своевременно была оказана квалифицированная медицинская помощь. Случай заболевания подтвержден лабораторно в РМА с титром до 1:1600 к лептоспирам серогруппы *Icterohaemorrhagiae*.

Ежегодно в ходе плановых обследований ветеринарной службой Иркутской области выявляются положительные результаты на лептоспироз. В 2010 году при постановке РМА было выявлено 1017 положительно реагирующих сывороток крупного рогатого скота в животноводческих комплексах 16 районов области и 115 положительных проб от свиней в шести районах. Приняв во внимание полученные данные, Управление Роспотребнадзора по Иркутской области в соответствии с СП 3.1.7.2835-11 «Профилактика лептоспирозной инфекции у людей» рекомендовало обследование работников тех сельскохозяйственных предприятий, где были обнаружены положительные пробы. При обследовании профессиональных групп были выявлены лица с положительной реакцией микроагглютинации и в ПЦР, в связи с чем осенью 2011 года в пос. Тугуй Эхирит-Булагатского района было проведено эпидемиологическое обследование, которое позволило впервые документировать смешанный (природный и антропоургический) очаг. Это подтверждалось положительными находками специфических антител ($0,3 \pm 0,2\%$) и ДНК лептоспир ($27,7 \pm 4,5\%$) у отловленных диких и синантропных мелких млекопитающих, а также (по данным ветеринарной службы Иркутской области) у КРС (50%). Активно были выявлены три случая лептоспироза: у двух доярок ООО СХПП «Тугуйское» обнаружено нарастание титров антител 1:400 – 1:800 и 1:200 – 1:400 в парных сыворотках, у жительницы пос. Тугуй выявлена специфическая ДНК.

В 2012 году в Иркутске был зарегистрирован завозной случай лептоспироза из Вьетнама. Больной М. поступил в инфекционную больницу 14 августа 2012 года – на шестые сутки заболевания – с диагнозом «острый вирусный гепатит». К концу первых суток пребывания в стационаре состояние больного резко ухудшилось: усилились суставные боли, ограничивающие движения, появились резкие мышечные боли (особенно выраженные в икроножных мышцах), отечность в области икроножных мышц. Дальнейшее лечение проводилось в палате интенсивной терапии и реанимации. Из эпидемиологического анамнеза установлено, что больной с 7-го по 20 июля 2012 года находился во Вьетнаме, в провинции Кханьхоа. На отдыхе

купался в открытых водоемах с порезом на ноге, сплавлялся на лодке по реке. Симптомы заболевания появились 9 августа, болезнь протекала остро, с высокой температурой (38,5 – 39 °С), болями в пояснице, мышцах и суставах, 12 августа появилась желтуха.

На основании эпидемиологического анамнеза и характерных симптомов (лихорадка до 39,9 °С, болезненность и отечность суставов, желтуха, резкие мышечные боли в нижних конечностях) был заподозрен лептоспироз. Материал от больного (кровь, моча) 16 августа доставили в Референс-центр. При постановке РМА в сыворотке крови были обнаружены антитела к лептоспирам серогруппы *Icterohaemorrhagiae* в титре 1:1600 и выше. Поздняя госпитализация привела к развитию у пациента тяжелой формы заболевания, осложненной почечно-печеночной недостаточностью, и в последующем – к летальному исходу.

В 2012 году в Нукутском районе выявлен активный антропоургический очаг лептоспироза в двух населенных пунктах с титрами антител в сыворотках крови КРС к лептоспирам серогруппы *Sejroe* в титрах 1:100 – 1:800. Специфическая ДНК выявлена у всех обследованных КРС ($n = 12$), четырех собак и одной серой крысы.

Лептоспирозы с 1951 по 1994 год регистрировались в разных районах области в виде вспышек, групповых и единичных случаев. С 1995 года по настоящее время эпидемический процесс характеризуется редкими единичными случаями. За последние 18 лет зарегистрировано два завозных случая с тяжелой клинической картиной и активно выявлен один местный случай со стертой симптоматикой.

Результаты серологического скрининга сывороток крови групп профессионального риска и местных жителей в шести сельскохозяйственных районах области (Эхирит-Булагатский, Нижнеудинский, Нукутский, Усольский, Боханский, Зиминский), проведенного в 2010 – 2012 годах, показали наличие у местных жителей Эхирит-Булагатского и Нижнеудинского районов специфических антител к лептоспирам серологических групп *Icterohaemorrhagiae*, *Sejroe* и *Canicola* в $7,5 \pm 2,6$ и $4,8 \pm 2,4\%$ случаев соответственно. У жителей этих же районов, а также Боханского и Зиминского показатель положительных проб с ДНК патогенных лептоспир варьировал от $5,0 \pm 4,9$ до $37,1 \pm 9,3\%$ (табл. 1). В результате целенаправленного исследования сывороток крови людей, проживающих на территории активно выявленного очага, установлено, что в эпидемический процесс вовлечены в основном работники сельскохозяйственных предприятий.

Инфицированность мелких млекопитающих в пяти обследованных районах области (Эхирит-Булагатский, Нижнеудинский, Иркутский, Усть-Илимский, Нукутский) и в Иркутске, установленная методом ПЦР, составляет в среднем $20,6 \pm 2,2\%$,

с колебаниями от 8,8 до 27,7% ($n = 600$).

Циркуляция лептоспир в антропоургических очагах городского типа поддерживается прежде всего больными собаками. Процент положительно реагирующих собак составил $37,9 \pm 2,5$ ($n = 369$). По результатам серологического исследования, среди домашних собак сохраняется циркуляция патогенных лептоспир семи серогрупп (*Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomona*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Grippotyphosa*, *Tarassovi*) в титрах от 1:100 до 1:1600 с преобладанием *Icterohaemorrhagiae* (см. табл. 1).

Плановый мониторинг позволил выявить и документировать активные природные и антропоургические очаги лептоспирозов в семи муниципальных районах Иркутской области (Эхирит-Булагатском, Нижнеудинском, Иркутском, Усть-Илимском, Боханском, Зиминском, Нукутском) и Иркутске.

Подтверждением циркуляции патогенных лептоспир в антропоургическом очаге Иркутска является обнаружение у $37,9 \pm 2,5\%$ обследованных собак с подозрением на лептоспироз ($n = 359$) агглютининов к лептоспирам серогрупп *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Grippotyphosa*, *Sejroe* и *Pomona* в титрах 1:100 – 1:1600, а также выделение в городской черте двух штаммов лептоспир от бурозубок, отловленных на болотно-озерном комплексе Иркутска. Культуры идентифицированы в РМА с групповыми сыворотками и масс-спектрометрическим методом. Определена принадлежность к серогруппе *Javanica*, титр реакции – 1:8000. Поскольку в базе данных программы MALDI Biotyper 3.0 отсутствуют спектры представителей рода *Leptospira*, нами проведены исследования по дополнению базы референсными спектрами, полученными при анализе белковых экстрактов 19-ти эталонных штаммов лептоспир семи видов. В результате установлено, что выделенные штаммы относятся к виду *L. borgpetersenii*, в который входят отдельные представители серогруппы *Javanica*, что сужает диагностический поиск при определении серовара, являющегося основной таксономической единицей.

Своеобразие эпидемиологии и эпизоотологии лептоспирозной инфекции на территории Иркутской области, по-видимому, связано с климато-географическими особенностями региона. Иркутская область расположена в пределах умеренного климатического пояса, но именно на ее территории климат отличается наибольшей в стране континентальностью. Для области характерны достаточно продолжительная зима – до шести-семи месяцев, резкие перепады годовых и суточных температур. Вода в водоемах даже летом недостаточно прогревается, условия для накопления возбудителя в объектах окружающей среды отсутствуют. Циркуляция патогенных лептоспир поддерживается за счет теплокровных диких, домашних и сельскохозяйственных животных.

Таблица 1.
Результаты лабораторных исследований на лептоспироз в 2010 – 2013 годах

Территория	РМА			ПЦР		Бактер. метод/положит.
	Всего	Положит., титр антител	% положит.	Всего/положит.	% положит.	
Сыворотка крови людей						
Эхирит-Булагатский район	106	8 <i>Icterohaemorrhagiae</i> 1:100 – 1:800, <i>Pomona</i> 1:20	7,5 ± 2,6	45/5	11,1 ± 4,7	–
Нижнеудинский район	83	4 <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Sejroe</i> 1:20 – 1:200	4,8 ± 2,4	31/2	6,4 ± 4,4	–
Иркутский район	17	0	0	2/0	0	–
Боханский район	20	0	0	20/1	5,0 ± 4,9	–
Зиминский район	27	0	0	27/10	37,1 ± 9,3	–
Усольский район	6	0	0	6/0	0	–
Нукутский район	30	0	0	–	–	–
Всего	289	12	4,7 ± 1,3	131/18	13,7 ± 3,1	–
г. Иркутск (по эпидпоказаниям)	16	1 <i>Icterohaemorrhagiae</i> 1:1600	6,2 ± 6,0	4/3	75,0 ± 21,6	5/0
Полевой материал (мелкие млекопитающие)						
Эхирит-Булагатский район	101	2 <i>Pomona</i> 1:40, <i>Grippotyphosa</i> 1:20	1,9 ± 1,4	101/28	27,7 ± 4,5	29/0
Нижнеудинский район	89	0	0	89/23	25,8 ± 4,6	8/0
г. Иркутск (болотно-озерный комплекс)	28	0	0	28/6	21,4 ± 7,8	18/2
Иркутский район	301	0	0	68/6	8,8 ± 1,2	31/0
Усть-Илимский район	34	0	0	34/3	8,8 ± 4,9	–
Нукутский район (по эпидпоказаниям)	47	0	0	5/1	10 ± 13,4	30/0
Всего	600	2	0,3 ± 0,2	325/67	20,6 ± 2,2	116/2
Домашние животные						
Собаки с подозрением на лептоспироз – Иркутск, Иркутский район	359	136 <i>Icterohaemorrhagiae</i> , <i>Canicola</i> , <i>Pomona</i> , <i>Sejroe</i> , <i>Hebdomadis</i> , <i>Grippotyphosa</i> , <i>Tarassovi</i> , 1:100 – 1:1600	37,9 ± 2,6	10/0	0	–
Собаки – Нукутский район (по эпидпоказаниям)	10	0	0	10/4	40,0 ± 15,9	–
Всего	369	136	37,9 ± 2,5	20/4	31,2 ± 10,9	–
КРС – Нукутский район (по эпидпоказаниям)	12	8 <i>Sejroe</i> , <i>Hebdomadis</i> , <i>Canicola</i> , <i>Tarassovi</i> , <i>Icterohaemorrhagiae</i> 1:100 – 1:600	66,7 ± 13,6	–	–	–

Выводы

1. Выявлены и документированы активные природные и антропоургические очаги лептоспирозов в семи муниципальных районах Иркутской области и в г. Иркутске.
2. Необходимо продолжать плановые мониторинговые исследования с наиболее полным охватом территорий, благоприятных для формирования очагов лептоспирозов. Одно из основных направлений дальнейшей работы – активное выявление больных в группах риска.
3. Недостаточное внимание уделяется возможному риску заражения людей во время отдыха в «экзотических» странах, которые в последнее время пользуются особой популярностью. Необходимо включить лептоспирозы в памятки для лиц, выезжающих в эндемичные страны. Врачи лечебной и поликлинической сети должны быть информированы о клинических проявлениях и эффективном лечении нехарактерного для нашей области заболевания – лептоспироза.

Литература

1. Ананьин В.В. Лептоспирозы людей и животных. Москва: Медицина; 1971.
2. Levett P. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14 (2): 296 – 326.
3. World Health Organization. Leptospirosis: Laboratory Manual; 2007.
4. Vijayachari P., Sugunan A., Shriram A. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J. Biosci; 2008; 33 (4): 557 – 569.
5. Лебедев В.В., Авдеев М.Г., Шубич М.Г., Ананьина Ю.В., Турьянов М.Х., Лучшев В.И. Иктерогеморрагический лептоспироз. Краснодар: Советская Кубань; 2001.
6. Ананьина Ю. В. Эпидемиологические принципы профилактики лептоспирозов. Дезинфекционное дело. 2007; 3: 39 – 42.
7. Балахонov С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Бренева Н.В. Деятельность референс-центра по природно-очаговым болезням ФГУЗ «ИркутскНИПЧИ Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора по обеспечению эпидемиологического благополучия населения Сибири и Дальнего Востока. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010; 17: 160 – 166.
8. Некипелова Г.А. Лептоспирозы в Иркутской области: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Хабаровск; 1974.

References

1. Anan'in V.V. Leptospiroses in humans and animals. Moscow: Medicina, 1971 (in Russian).
2. Levett P. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14 (2): 296 – 326.
3. World Health Organization. Leptospirosis: Laboratory Manual; 2007.
4. Vijayachari P., Sugunan A., Shriram A. Leptospirosis: an emerging global public health problem. J. Biosci; 2008; 33 (4): 557 – 569.
5. Lebedev V.V., Avdeev M.G., Shubich M.G., Ananina Yu.V., Turyanov M.H., Luchshev V.I. Icterohemorrhagic leptospirosis. Krasnodar: Soviet Kuban, 2001 (in Russian).
6. Anan'ina Yu.V. Epidemiological principles of leptospiroses prevention. Disinfectionnoe Delo. 2007; 3: 39 – 42 (in Russian).
7. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Breneva N.V. Activity of the Reference-Centre against natural-focal diseases in Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and the Far East of Rospotrebnadzor to support epidemiological well-being of the population in Siberia and the Far East. Far Eastern Zhurnal infektsionnoi patologii. 2010; 17: 160 – 166 (in Russian).
8. Nekipelova G.A. Leptospiroses in Irkutsk Region. Doctorate of med. sci. diss. Khabarovsk. 1974 (in Russian).

АНОНС

На базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора 23 – 24 сентября 2014 года состоится Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы обеспечения противоэпидемических мероприятий в зоне чрезвычайных ситуаций».

Потенциальная опасность мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза

Т.В. Каримова¹ (adm@chumin.irkutsk.ru), В.Т. Климов², М.В. Чеснокова², М.Б. Черепанова²

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области»
Роспотребнадзора, г. Новосибирск

²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

Исследовано 99 смывов с тушек птицы оптово-розничных предприятий. *Y. pseudotuberculosis* и ее ДНК не обнаружены. Методом ПЦР в 59,6% случаев установлено наличие ДНК *Y. enterocolitica*, подтвержденное выделением 11 культур *Y. enterocolitica* 1А биотипа и одной культуры *Y. enterocolitica* 2-го биотипа серовара 09. Наличие у последней комплекса молекулярно-генетических (*ail*, *ystA*, *ystB*) и фенотипических (Ca^{2+} -зависимость и аутоагглютинабельность) признаков подтверждает реальную роль мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза. Результативность ПЦР превышает результативность бактериологического метода в 4,9 раза, а экспрессность метода для оценки патогенных свойств *Y. enterocolitica* позволяет оперативно проводить комплекс противозидемических мероприятий.

Ключевые слова: иерсиниозы, мясо птицы, ПЦР, патогенность, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*

Potential Danger of Fowl Meat as a Factor of Intestinal Yersiniosis Transmission

T.V. Karimova¹ (adm@chumin.irkutsk.ru), V.T. Klimov², M.V. Chesnokova², M.B. Cherepanova²

¹Federal Budget Institution of Public Health «Center of Hygiene and Epidemiology in the Novosibirsk Region» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Novosibirsk

²Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

Ninety nine washouts from poultry carcasses wholesale-retail enterprises were investigated. *Yersinia pseudotuberculosis* and its DNA failed to reveal. *Y. enterocolitica* DNA presence confirmed by isolation of 11 *Y. enterocolitica* 1A biotype cultures and one culture of *Y. enterocolitica* biotype 2 serovar 09 was detected by PCR in 59.6%. Presence in the latter a complex of molecular-genetic (*ail*, *ystA*, *ystB*) and phenotypic (Ca^{2+} -dependence and autoagglutination) properties proved a real role of fowl meat as a factor of intestinal yersiniosis transmission. PCR efficiency exceeded that of a bacteriological method in 4.9 times, and expressivity of a method for estimation of *Y. enterocolitica* pathogenic properties permit to conduct operatively a complex of anti-epidemic actions.

Key words: yersinioses, fowl meat, PCR, pathogenicity, *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*

Введение

Иерсиниозы (псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз) – острые бактериальные инфекционные болезни, вызываемые энтеропатогенными иерсиниями (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*), – относятся к алиментарным сапрозоонозам с природной очаговостью и характеризуются симптомами общей интоксикации, полиморфизмом клинических проявлений с поражением желудочно-кишечного тракта, кожи, опорно-двигательного аппарата, других органов и систем, рецидивирующим и затяжным течением. Иерсиниозы имеют повсеместное распространение среди людей и животных во всех странах мира (Япония, Скандинавия, Восточная и Центральная Европа, Бразилия, США, Канада) [1]. Особенно

высокая заболеваемость отмечается в странах с высокоразвитой пищевой индустрией, где наряду со спорадической заболеваемостью нередко отмечаются эпидемические вспышки с фекально-оральным механизмом передачи при употреблении контаминированных пищевых продуктов растительного и животного происхождения и питьевой воды.

В России проявления псевдотуберкулеза носят преимущественно эпидемический характер ($2,1 \pm 0,001$ на 100 тыс. населения), факторами передачи *Yersinia pseudotuberculosis* являются пищевые продукты, которые обычно употребляются человеком без термической обработки, – капуста, морковь, лук, творог, молоко [2]. Резервуаром и источником инфекции при псевдотуберкулезе

являются мышевидные грызуны, сельскохозяйственные животные и домашние питомцы [3 – 5].

При кишечном иерсиниозе важное значение как источнику инфекции, отводится свиньям поскольку именно от них выделяется наибольшее количество патогенных штаммов *Y. enterocolitica* сероваров O:3 и O:9 [6]. Факторы передачи инфекции при вспышках, по данным зарубежных авторов, – свиное мясо, субпродукты, соевый сыр, молоко, пахта [7]. В России установлена обсемененность *Y. enterocolitica* овощей, информации об истинной инфицированности продуктов животного происхождения недостаточно, имеются лишь единичные исследования в этом направлении [8, 9], данные же об инфицированности птицеводческой продукции в настоящее время отсутствуют. Эпидемические проявления болезни, вызванные этим возбудителем, носят спорадический характер ($1,8 \pm 0,001$ на 100 тыс. населения).

Психрофильная природа иерсиний позволяет им размножаться на продуктах питания при температуре +4 – 10 °С и накапливаться при длительном хранении [3, 10, 11], обуславливая потенциальную биологическую опасность для человека.

При осуществлении эпидемиологического надзора за иерсиниозами большое значение придается эффективным методам лабораторной диагностики, обеспечивающим оперативную и достоверную информацию об инфицированности возбудителями продуктов питания. Наиболее приемлемый метод для этой цели – полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая в данном случае является альтернативой бактериологическому исследованию, поскольку обладает рядом преимуществ по сравнению с культуральным методом – высокой скоростью получения результата (несколько часов), аналитической чувствительностью (единичные клетки), избирательностью мишени (выявление специфического участка в геноме микроба) [12, 13].

Цель работы – установление потенциальной опасности мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза, оценка эффективности ПЦР для определения энтеропатогенных иерсиний.

Материалы и методы

Для оценки роли мяса птицы как возможного фактора передачи энтеропатогенных иерсиний взяты смывы с 99 тушек кур, хранившихся в условиях холодильника торговых оптово-розничных предприятий. Исследование материала проводили методами ПЦР (электрофоретический вариант) и бактериологическим. Для ПЦР образцы смывов предварительно инкубировали в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2) при температуре +4 – 6 °С в течение 48 и 72 часов. Пробы в количестве 100 мкл центрифугировали при 5000 оборотах в минуту. Надосадочную жидкость декантировали, а осадок суспендировали в таком же объеме дистиллированной воды и прогревали при 100 °С в течение 30 минут. Затем пробы по-

вторно центрифугировали в течение 1,5 – 2 минут при 8000 тыс. об/мин и в ПЦР-смесь вносили 5 мкл надосадочной жидкости.

Для детекции *Y. pseudotuberculosis* применили ПЦР с праймерами на ген инвазивности *inv* [14]. Для амплификации ДНК *Y. enterocolitica* использовали мультиплексную ПЦР с двумя парами праймеров на гены *16S* РНК и *ail* [15]. Праймеры на *16S* РНК позволяли определять видовую принадлежность к *Y. enterocolitica*, а праймеры на фрагмент *ail*-гена – обнаружить в материале ДНК патогенных *Y. enterocolitica*. В выделенных культурах иерсиний определяли ген термостабильного токсина *ystA*, обнаруживаемый у безусловно патогенных микроорганизмов *Y. enterocolitica* биотипов 1В, 2, 3 и 4, и ген *ystB*, выявляемый у *Y. enterocolitica* биотипа 1А [16]. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществляли в ЗАО «Синтол» (Москва). Последовательность праймеров, детерминирующие фрагменты ДНК, размер ампликонов и температура отжига представлены в таблице 1.

Параллельно делали первый и второй высевы на дифференциально-диагностическую среду СБТС (ГНЦПМиБ, пос. Оболенск Московской области), посева инкубировали при температуре 28 °С в течение 48 часов. Третий высев на среду СБТС проводили на 5-е сутки со смывов, в которых был зарегистрирован положительный результат в ПЦР. Выделение и идентификацию культур, их био- и серотипирование выполняли согласно общепринятым методам [17].

Результаты и обсуждение

Возбудитель *Y. pseudotuberculosis* не обнаружен в смывах с тушек кур ни бактериологическим, ни ПЦР-методом. Мультиплексной ПЦР в 59 пробах (59,6%) выявлены специфические фрагменты ДНК *Y. enterocolitica*, в том числе в 58 пробах – с праймерами на фрагмент гена *16S* РНК и в одном случае – на оба гена: *16S* РНК и *ail*. При бактериологическом исследовании выделены 11 культур *Y. enterocolitica* 1А биотипа и одна культура *Y. enterocolitica* 2-го биотипа 09 серотипа (*Y. enterocolitica* 2/09). Результативность бактериологического метода составила 12,1% от общего числа исследованных проб и 20,7% – от числа полученных положительных результатов молекулярно-генетического исследования.

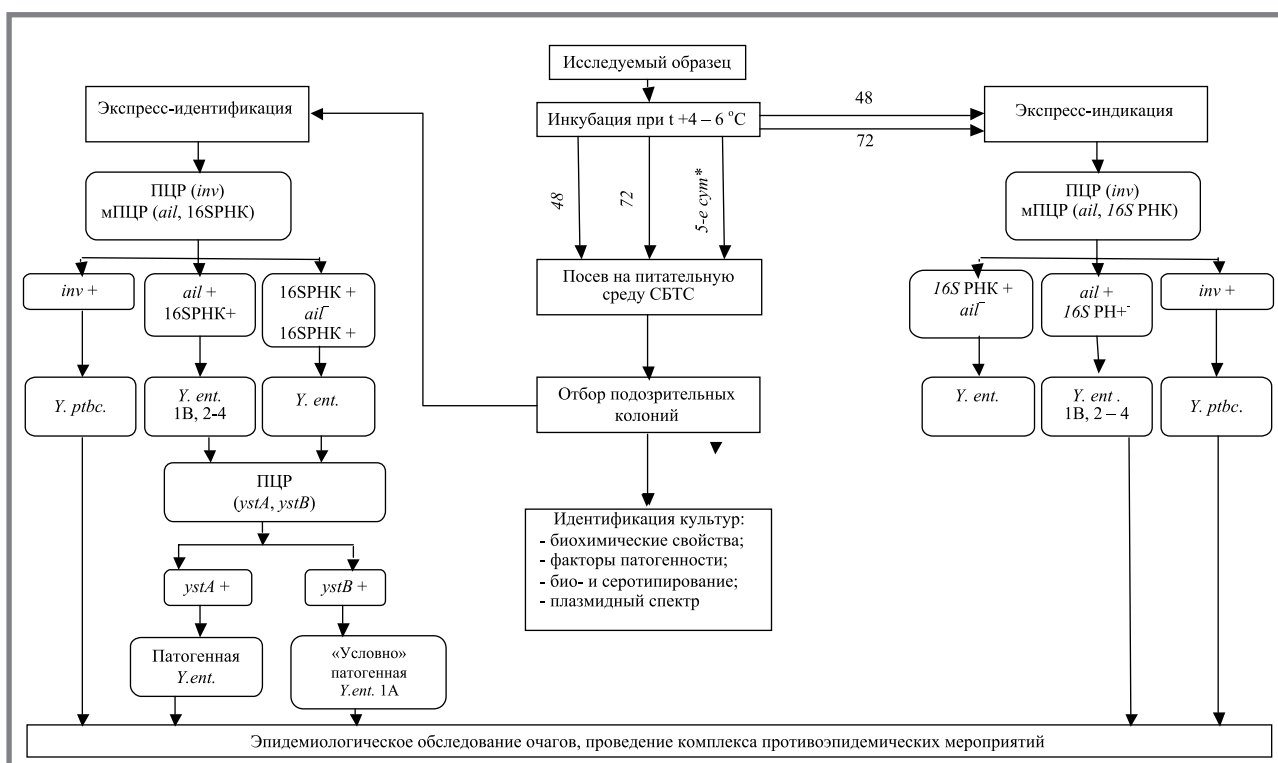
Для *Y. enterocolitica* 1А было характерно обнаружение в ПЦР гена *ystB* (у восьми штаммов – 72,7%). Фенотипические признаки, такие как Ca^{2+} -зависимость, аутоагглютинабельность при 37 °С, которые детерминируются плазмидой вирулентности *pYV*, были отрицательными.

В настоящее время вопрос об эпидемической значимости *Y. enterocolitica* 1А дискутируется. Предполагается, что они могут вызывать у человека гастроэнтерит, при котором ведущая роль принадлежит термостабильному токсину YSTb, имеющему

Таблица 1.
Праймеры, используемые для определения видовой принадлежности и патогенности иерсиний

Фрагмент гена	Структура праймеров (5` – 3`)	Размер ампликона (н.п.)	Температура отжига (°C)	Ссылка на источник
<i>inv</i>	5`-TTTGGGTA CTATCGCGGCGGA-3` 5`-CGTGAAATTAACCGTCACACT-3`	295	66	[14]
16S PHK	5`-AATACCGCATAACGTCTTCG-3` 5`-CTTCTTCTGCGAGTAACGTC-3`	330	62	[15]
<i>ail</i>	5`-TTAATGTGTACGCTGGAGTG-3` 5`-GGAGTATTCATATGAAGCGTC-3`	425	62	[15]
<i>ystA</i>	5`-ATCGACACCAATAACCGCTGAAG-3` 5`-CCAFTCACTACTGACTTCGGCT-3`	79	61	[16]
<i>ystB</i>	5`-GTACATTAGGCCAAGAGACG-3` 5`-GCAACATACCTCACACACC-3`	146	61	[16]

Рисунок 1.
Схема лабораторного исследования на энтеропатогенные иерсинии



Примечание: *Бактериологическое исследование на 5-е сутки проводится только для ПЦР-положительных образцов.

функциональное и структурное сходство с токсинотоксигенных эшерихий [16, 18]. Ранее нашими исследованиями было установлено наличие гена *ystB* при отсутствии плазмиды *pYV* и гена *ail* у штаммов *Y. enterocolitica* 1A, выделенных от больных с выраженной клинической картиной гастроэнтерита [4]. Для *Y. enterocolitica* 2/09 были обнаружены следующие факторы патогенности: гены термостабильного энтеротоксина А и В (*ystA*, *ystB*), адгезии-инвазии (*ail*), Ca^{2+} -зависимость и аутоагглютинабельность. Факт выделения этой патогенной иерсинии с тушек птиц установлен нами впервые.

Предложенный алгоритм лабораторного исследования, позволяющий уже на этапе экспресс-индикации/идентификации подозрительных коло-

ний типировать микроб по основным факторам патогенности (способность к адгезии-инвазии, наличие генов термостабильных энтеротоксинов, плазмиды вирулентности *PYV*), представлен на рисунке 1.

Значительный процент выделения кишечных иерсиний из куриного мяса (59,6%), в том числе патогенной *Y. enterocolitica* 2/09, подтверждает, что мясо птицы – фактор реализации пищевого пути передачи кишечного иерсиниоза. Это необходимо учитывать при выяснении причин и условий возникновения единичных или множественных эпидемических очагов данной нозоформы. Контаминация пищевого продукта может происходить при прямом инфицировании в результате нарушения целостно-

сти тонкого кишечника при убойе и разделке птицы, особенно в мелких фермерских хозяйствах и в домашних условиях. Не исключается, что мясо птицы может быть промежуточным фактором передачи кишечного иерсиниоза через загрязненные возбудителем оборудование пищеблока и руки персонала, что приводит к вторичному накоплению *Y. enterocolitica* в готовых блюдах при условии нарушения технологии их приготовления или хранения.

Необходимость проведения комплекса противоэпидемических мероприятий (нейтрализация факторов передачи, поиск источника инфекции и активное выявление больных) в очагах решается эпидемиологом дифференцированно, с учетом результатов экспресс-индикации/идентификации иерсиний.

Выводы

1. Впервые с мяса птицы изолирована патогенная *Y. enterocolitica* 2/09, что свидетельствует о значении этого пищевого продукта как фактора передачи кишечного иерсиниоза.
2. Показано, что ПЦР эффективнее бактериологического метода в 4,9 раза и позволяет экспрессно оценивать патогенность выделенных культур *Y. enterocolitica*.
3. Обследование эпидемических очагов кишечного иерсиниоза и принятие управленческих решений целесообразно проводить, основываясь на результатах экспресс-индикации/идентификации патогенных иерсиний.

Литература

1. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Editors Andrew Amato-Gauci and Andrew Ammon. ECDC. Swedem. 2007: 254 – 259.
2. Tseneva G.Ya., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., Burgasova O.A., Sayapina L.A. et al. Pseudotuberculosis in the Russian Federation. Adv. Exp. Med. Biol. 2012; 954: 63 – 68.
3. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. Москва: Медицина; 2001: 256.
4. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Иванова Л.К., Попов А.В. Эпидемиологические аспекты псевдотуберкулеза и иерсиниоза в России. В кн.: Иерсинии и иерсиниозы. Г.Я. Ценева, ред. Санкт-Петербург: ООО «Бастинон»; 2006: 7 – 35.
5. Backhans A., Fellström C., Lambert S.T. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. Epidemiol. Infect. 2011; 139 (8): 1230 – 1238.
6. Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food. Microbiol. 1991; 12 (1): 53 – 66.
7. Arora D., Menta N., Saini R. Epidemiological pattern and detection of *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin: a review. J. Cell Tissue Res. 2012; 12 (1): 3021 – 3028.
8. Рыбакова Н.А., Ценева Г.Я., Смирнова Е.Ю., Тебекин А.Б., Евсюкова Н.А., Литвинова Р.Г. Эпидемиологический мониторинг иерсиниозов в практике государственного санитарно-эпидемиологического надзора. Здоровье населения и среда обитания. 2004; 6 (135): 12 – 17.
9. Иерсиниозы в Российской Федерации. Информационный бюллетень (Санкт-Петербург) 2014. Вып. 1. Доступно на: <http://pasteurorg.ru/nauchnaya-produktsiya>.
10. Aulisio C.C.G., Mehlman I.J., Sanders A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. Appl. Environ. Microbiol. 1980; 39: 135 – 140.
11. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Малов И.В., Марамонович А.С. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука; 2003: 320.
12. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Марамонович А.С., Антоноук В.Я., Бренева Н.В. Оценка эффективности полимеразной цепной реакции при расследовании вспышек псевдотуберкулеза. Журн. микробиол. 2003; 3: 7 – 11.
13. Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in food. J. Pathogens. 2011. Article ID 7353308: 9.
14. Wang R.F., Cao W.W., Cerniglia C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J. Appl. Microbiol. 1997; 83: 727 – 736.
15. Wim J.B., Wannet M., Reessink H.A., Brunings H.M.E. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 2001; 39 (12): 4483 – 4486.
16. МУ 3.1.1.2438-09 «Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза. Методические рекомендации. Утв. Руководителем Роспотребнадзора Г.Г. Онищенко 22.01.2009 г. Москва; 2009: 66.
17. Thoerner P., Bin Kingombe C.L., Bogli-Stubber K., Bissing-Choisar B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and investigation of virulence gene distribution. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69 (3): 1810 – 1816.
18. Ramamurthy T., Yoshino Ki, Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T. et al. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. Microb Pathog. 1997; 23 (4): 189 – 200.

References

1. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Editors Andrew Amato-Gauci and Andrew Ammon. ECDC. Swedem. 2007: 254 – 259.
2. Tseneva G.Ya., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Voskresenskaya E.A., Burgasova O.A., Sayapina L.A. et al. Pseudotuberculosis in the Russian Federation. Adv. Exp. Med. Biol. 2012; 954: 63 – 68.
3. Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. Pseudo-tuberculosis. Moscow: Medicine; 2001: 256 (in Russian).
4. Chesnokova M.V., Klimov V.T., Ivanova L.K., Popov A.V. Epidemiological aspects of pseudotuberculosis and yersiniosis in Russia. In Book: *Yersinia and yersinioses*. Editors prof. G.Ja.Tseneva. Saint-Petersburg; 2006: 7 – 35 (in Russian).
5. Backhans A., Fellström C., Lambert S.T. Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. Epidemiol. Infect. 2011; 139 (8): 1230 – 1238.
6. Kapperud G. *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. Int. J. Food. Microbiol. 1991; 12 (1): 53 – 66.
7. Arora D., Menta N., Saini R. Epidemiological pattern and detection of *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin: a review. J. Cell Tissue Res. 2012; 12 (1): 3021 – 3028.
8. Rybakova N.A., Tseneva G.Ya., Sмирнова Е.Ю., Тебекин А.Б., Евсюкова Н.А., Литвинова Р.Г. Epidemiological monitoring of yersinioses in practice of the State sanitary and epidemiologic surveillance. Zdrorvie naseleniya i sreda obitaniya. 2004; 6 (135): 12 – 17 (in Russian).
9. Yersinioses in the Russian Federation. The newsletter. Issue.1. St. Peterburg; 2014. Available at: <http://pasteurorg.ru/nauchnaya-produktsiya> (in Russian).
10. Aulisio C.C.G., Mehlman I.J., Sanders A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* from foods. Appl. Environ. Microbiol. 1980; 39: 135 – 140.
11. Shurygina I.A., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Malov I.V., Maramovich A.S. Pseudotuberculosis. Novosibirsk: Nauka; 2003: 320 (in Russian).
12. Chesnokova M.V., Klimov V.T., Maramovich A.S., Antoniouk V.Ya., Breneva N.V. Estimation of efficiency of polymerase chain reaction in investigation of pseudotuberculosis outbreaks. Zhurn. mикробиол. 2003; 3: 7 – 11 (in Russian).
13. Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* detection in food. J. Pathogens. 2011. Article ID 7353308: 9.
14. Wang R.F., Cao W.W., Cerniglia C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J. Appl. Microbiol. 1997; 83: 727 – 736.
15. Wim J.B., Wannet M., Reessink H.A., Brunings H.M.E. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. 2001. 39 (12): 4483 – 4486.
16. Methodical Guideline 3.1.1.2438-09 «Epidemiological surveillance and prevention of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis. Methodical Recommendations. 22.01.2009. Moscow; 2009: 66 (in Russian).
17. Thoerner P., Bin Kingombe C.L., Bogli-Stubber K., Bissing-Choisar B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and investigation of virulence gene distribution. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69 (3): 1810 – 1816.
18. Ramamurthy T., Yoshino Ki, Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T. et al. The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. Microb Pathog. 1997; 23 (4): 189 – 200.

Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе

Т.Ю. Загоскина¹ (T_Y_Z@mail.ru), С.В. Балахонов¹, Е.Ю. Марков¹, В.Б. Николаев¹, Е.Н. Субычева¹, Е.А. Чапоргина¹, Е.П. Михайлов³, О.Б. Бодрых², Ю.О. Попова¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», г. Иркутск

³ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, г. Горно-Алтайск

Резюме

Сконструированы тест-системы с применением высокодисперсных золь серебра в качестве маркера специфических антител для детекции антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина методом дот-иммуноанализа. Показаны их высокая чувствительность и специфичность.

Проведена апробация тест-системы на обнаружение антигенов чумного микроба в полевом материале из Горно-Алтайского природного очага чумы.

Показана высокая эффективность использования дот-иммуноанализа для скрининга клинического материала и пищевых продуктов на ботулотоксин.

Разработанные тест-системы позволяют исследовать микрообъемы клинического материала, технически просты и не требуют использования лабораторных животных, дорогостоящего оборудования, специальной подготовки персонала, могут с успехом применяться в практическом здравоохранении – в лабораториях разного уровня оснащенности и, что особенно ценно, в полевых условиях в режиме чрезвычайных ситуаций.

Ключевые слова: коллоидное серебро, дот-иммуноанализ, возбудители чумы, бруцеллеза, туляремии; антигены, ботулотоксин

Approbation of Diagnostic Test-Systems with Use of Silver Nano-Particles as Markers of Specific Antibodies for Screening of the Investigated Material for Presence of Antigens of Plague, Brucellosis, Tularemia Causative Agents and Botulotoxin in Dot-Immunoassay

T.Yu. Zagoskina¹ (T_Y_Z@mail.ru), S.V. Balakhonov¹, E.Yu. Markov¹, V.B. Nikolaev¹, E.N. Subycheva¹, E.A. Chaporgina¹, E.P. Mikhailov³, O.B. Bodrykh², Yu.O. Popova¹

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Research Antiplague Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Federal Budget Healthcare institution «Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region», Irkutsk

³Federal State Institution of Public «Altai Antiplague Station» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Gorno-Altaiisk

Abstract

Test systems with high dispersed silver sol application as a marker of specific antibodies are developed for detection of antigens of plague, brucellosis, tularemia causative agents and botulotoxin by dot-immunoassay. Its high sensitivity and specificity is shown.

Test-system was approbated for detection of *Yersinia pestis* antigens in a field material from Altay mountain natural plague focus.

High efficiency of a dot-immunoassay for screening of a clinical material and foodstuffs for botulotoxin is shown.

The developed test-systems allow to investigate microvolumes of a clinical material. They are technically simple and do not require the use of laboratory animals, the expensive equipment, special staff training and can be applied with success in practical public health services, in laboratories of different equipment and that is especially valuable, in field conditions in a mode of emergency situations.

Key words: colloid silver, dot-immunoassay, causative agents of plague, brucellosis, tularemia; antigen, botulotoxin

Введение

В настоящее время около 70% всех регистрируемых болезней человека имеют инфекционную

этиологию. Контроль за распространением инфекций в мире затруднен ввиду современных темпов и масштабов миграции населения. Кроме того, в

последние годы реальной угрозой считается возможность преднамеренного использования патогенных биологических агентов в террористических целях.

Эффективная борьба с возбудителями инфекционных болезней требует быстрой и достоверной диагностики. Не все учреждения здравоохранения имеют базу для выполнения сложных анализов и в связи с этим нуждаются в оснащении надежными, простыми, недорогими, доступными, экспрессными диагностическими тестами. Для России с ее огромной территорией и удаленностью населенных пунктов от диагностических центров такие тесты особенно актуальны. Многие нозологические формы имеют сходную клиническую картину, и для правильной постановки диагноза необходимы лабораторные методы, среди которых важное место занимает иммунохимический анализ, в частности дот-иммуноанализ. Этот тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью и может быть использован для определения видовой принадлежности возбудителя. Актуальность дальнейших разработок и модифицирования дот-иммуноанализа обусловлена также необходимостью решения ряда практических задач: расширения круга определяемых антигенов; обеспечения возможности одновременной детекции нескольких аналитов в одном тесте; упрощения операций и сокращения времени проведения анализа; снижения стоимости тестирования; снижения или устранения риска для здоровья пользователей и окружающей среды.

В Иркутском научно-исследовательском противочумном институте предложено и экспериментально обосновано применение в качестве маркера специфических иммунных реагентов наночастиц серебра (альтернатива ферментным меткам), позволяющих создавать простые и недорогие тесты с визуальным учетом результатов, а также пригодных как для массового скрининга исследуемого материала, так и для выполнения индивидуальных анализов для обнаружения возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии, ботулинического токсина и диагностики вызываемых ими заболеваний [1–13].

Цель работы – испытание сконструированных с использованием методологии иммунокаталитического анализа тест-систем для дот-иммуноанализа (ДИА) с применением высокодисперсного золь серебра в качестве маркера ботулотоксина и специфических антител, позволяющих проводить скрининг материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза и туляремии.

Материалы и методы

При конструировании соответствующих диагностических тест-систем для дот-иммуноанализа использованы специфические антитела, источником которых служили гипериммунные сыворотки, полученные при иммунизации кроликов вакцинами штаммами возбудителей чумы и туляремии, виру-

лентными штаммами бруцелл, и коммерческие диагностические ботулинические поливалентные или моноспецифические сыворотки типов А, В и Е, традиционно применяемые в реакции биологической нейтрализации токсина. Выделение IgG осуществляли комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония. Золь серебра готовили путем восстановления из раствора азотнокислого серебра боргидридом натрия [2, 3, 9, 10]. В качестве стабилизатора биозонда использовали растворы бычьего сывороточного альбумина и полиэтиленгликоля. После коррекции pH золь серебра насыщали соответствующими антигенами.

Постановку дот-иммуноанализа осуществляли традиционным способом, предполагающим адсорбцию исследуемого материала, содержащего бактериальные антигены и ботулотоксин, на нитроцеллюлозную мембрану, блокирование свободных сайтов связывания раствором казеината натрия. Детекцию адсорбированных на твердой фазе антигенов осуществляли с помощью соответствующих антител, меченных наночастицами коллоидного металла. Визуализацию результатов реакции проводили погружением мембран в раствор проявителя, состоящего из метола, лимонной кислоты и азотнокислого серебра, с последующим промыванием их проточной водой. Общее время проведения анализа – примерно два часа. Пробы, содержащие искомые антигены, выявлялись в виде темно-серых пятен. В отрицательном контроле и при отсутствии искомых антигенов в испытуемом образце окрашивание не проявлялось [2, 3, 9–11].

Нами исследовано 22 штамма чумного микроба основного, алтайского, гиссарского, кавказского и удэгейского подвидов из природных очагов чумы, 19 штаммов бруцелл всех известных видов, пять штаммов возбудителя туляремии. В качестве антигенных фракций использованы фракция 1, Fc-антиген, основной соматический антиген, липополисахарид (ЛПС), «мышинный» токсин, клеточные оболочки (всего 32 антигенные фракции), изолированные из клеток штамма *Yersinia pestis* EV; ЛПС, белково-полисахаридный Ag, солевые, мочевиновые и цетавлоновые экстракты (всего 30 антигенных фракций), изолированные из клеток штамма *Brucella abortus* 19 BA; ЛПС и мочевиновые экстракты (всего 20 антигенных фракций) из клеток вакцинного штамма *Francisella tularensis* B-15.

Результаты и обсуждение

При исследовании полевого материала из Горно-Алтайского природного очага чумы (190 проб) методом ДИА были получены положительные результаты в 8 пробах (смывы с органов длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* – 4, даурской пищухи *Ochotona daurica* – 3, плоскочерепной полевки *Alticola strelzovi* – 1), что составило 4,2%. При параллельном исследовании образцов в РПГА зарегистрировано наличие антигенов чумного ми-

кроба в пяти пробах, что составило 2,6%. Отмечалось совпадение положительных результатов в ДИА и РПГА. Большое количество положительных находок, полученных методом ДИА, в сравнении с РПГА объясняется более высокой чувствительностью твердофазных иммунохимических методов по сравнению с агглютинационными.

Испытания тест-системы на обнаружение ботулотоксина проведены на клиническом материале (рвотные массы, промывные воды желудка, испражнения, кровь, моча) от больных с установленным клиническим диагнозом «ботулизм», госпитализированных в городскую инфекционную больницу. Положительные результаты исследования клинического материала в ДИА полностью (100%) совпадали с аналогичными результатами, полученными в рутинной реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах, что подтверждает эффективность и специфичность сконструированной тест-системы. При этом дот-иммуноанализ более экспрессивен, экономичен, производителен, технологичен, безопасен, не требует наличия лабораторных животных.

Выводы

1. В процессе работы нами установлено, что коллоидное серебро является стандартным, легко-

воспроизводимым маркером, пригодным для использования в качестве метки специфических антител. Сконструированные тест-системы позволяют быстро и качественно провести детекцию антигенов возбудителей чумы, туляремии, бруцеллеза и ботулотоксина.

2. Тест-системы для дот-иммуноанализа сочетают высокую чувствительность ($\geq 10^4$ м.к./мл корпускулярных бактериальных и ≥ 10 нг/мл растворимых антигенов указанных возбудителей), миниатюризацию (объем пробы $\sim 1 - 2$ мкл), простоту выполнения и достаточно быстрое получение результатов (около 2 ч).
3. Тест-системы с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител значительно дешевле существующих аналогов, для реализации не требуют дорогостоящего оборудования, а возможность визуального учета результатов позволяет использовать их в качестве сигнальных тестов в полевых условиях, а также в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад в режиме чрезвычайных ситуаций. Кроме того, применение разработанных тест-систем дает возможность оперативно осуществлять эпидемиологический мониторинг и проводить быструю оценку ситуации при возникновении биологических угроз.

Литература

1. Загоскина Т.Ю., Докорина А.А., Михайлов Л.М., Меринов С.П., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. Исследование сывороток крови работников мясокомбината на бруцеллез в дот-иммуноанализе и рутинных серологических реакциях. Сибирь-Восток (Иркутск). 2004. Вып. 2: 13, 14.
2. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю., Докорина А.А., Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Клин. лаб. диагностика. 2002; 6: 38, 39.
3. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркеров специфических антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 3: 65 – 69.
4. Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Субычева Е.Н., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Балахонов С.В., Голубинский Е.П. Дот-иммуноанализ с частицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителя чумы и его антигенов. Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: Тез. докл. Междунар. конф. (8 – 10 сентября 2004 г., Новосибирская обл.). Новосибирск: ЦЭРИС; 2004: 245.
5. Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Субычева Е.Н., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Белобородов Ю.В., Балахонов С.В., Белькова С.А., Попова Ю.О., Козулина К.Ю., Голубинский Е.П. Использование иммунозолей для визуальной индикации в дот-иммуноанализе возбудителя чумы и его антигенов. VI Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Генодиагностика инфекционных болезней. 2007» («Молекулярная диагностика-2007») (28 – 30 ноября 2007 г., Москва): Сб. тр. В.И. Покровский, ред. Москва; 2007; I: 386 – 388.
6. Субычева Е.Н., Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Балахонов С.В., Голубинский Е.П. Использование дот-иммуноанализа для детекции возбудителя чумы. Совр. аспекты эпидемиологич. надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на Юге России: Матер. науч.-практ. конф. (21 – 22 марта 2007 г., Ставрополь). Ставрополь; 2007; II: 123, 124.
7. Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Докорина А.А., Мирончук Ю.В. Использование специфических реагентов, меченых частицами коллоидного серебра, для обнаружения антигенов *Francisella tularensis* и антител к ним методом дот-иммуноанализа. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане: Материалы международной научно-практической конференции «Современный эпидемический потенциал природных очагов чумы», посвященной 10-летию суверенитета Республики Казахстан и 50-летию Талдыкурганской противочумной станции (Талдыкурган, 1 – 2 августа 2001 г.). Алматы; 2001; 3: 196 – 198.
8. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Балахонов С.В., Николаев В.Б., Субычева Е.Н. Использование наночастиц золота и серебра для скрининга исследуемого материала в дот-иммуноанализе на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина. Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников Содружества независимых государств: Материалы IX Межгосударственной науч.-практ. конф. государств-участников СНГ (30 сентября – 2 октября, 2008 г., Волгоград); 2008: 75 – 77.
9. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И., Бодрых О.Б., Марков Е.Ю., Вейде А.А., Долгова Т.М., Тайкова Т.С., Балахонов С.В. Конструирование тест-системы для скрининга пищевых продуктов и клинического материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе. Журнал инфекционной патологии. Иркутск. 2009; 16 (3): 20 – 23.
10. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Балахонов С.В. Современные подходы к детекции и идентификации ботулинических токсинов. Инфекционные болезни. 2012; 1: 64 – 73.
11. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Леконцева С.Е., Бодрых О.Б., Балахонов С.В. Клинико-эпидемиологические особенности и совершенствование лабораторной диагностики ботулизма в Иркутской области. Бюллетень ВЧНЦ СО РАМН. 2013; 2 (90): 1: 102 – 106.
12. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Nikolayev V.B., Balakhonov S.W., Andreevskaya N.M., Poltavchenko A.G., Dokorina A.A., Golubinsky E.P. The use of silver immunosols for detection of *Yersinia pestis* antigens in dot immunoassay. Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci. 2002; 10: 53 – 55.
13. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. One World-One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of International Conference (11 – 12 April, 2013). Ulaanbaatar; 2013: 187 – 191.

References

1. Zagoskina T.Yu., Dokorina A.A., Mikhailov L.M., Merinov S.P., Markov E.Yu., Kalinovskiy A.I., Golubinsky E.P. Testing of blood sera from workers of a meat-packing plant for brucellosis by dot-immunoassay and routine serological reactions. Sibir-Vostok. (Irkutsk). 2004; 2: 13, 14 (in Russian).

2. Zagoskina T.Yu., Kalinovsky A.I., Markov E.Yu., Dokorina A.A., Golubinsky E.P. Use of specific antibodies labeled with colloid silver particles for detection of Brucella antigens by dot-immunoassay. *Klin. lab. diagnostika*. 2002; 6: 38 – 39 (in Russian).
3. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Kalinovsky A.I., Golubinsky E.P. Detection of Brucella antigens using colloid metal particles as markers of specific antibodies. *Zhurn. mikrobiol., epidemiol. i immunobiol.* 2001; 3: 65 – 69 (in Russian).
4. Zagoskina T.Yu., Dokorina A.A., Nikolaev V.B., Markov E.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Balakhonov S.V., Golubinsky E.P. Dot-immunoassay with colloid silver particles for detection of the plague causative agent and its antigens. Development of the international cooperation in the field of the infectious disease studying: Brief outline reports of the International Conference (September 8-10, 2004, Novosibirsk region). Novosibirsk: TSERIS; 2004: 245 (in Russian).
5. Nikolaev V.B., Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Beloborodov Yu.V., Balakhonov S.V., Belkova S.A., Popova Yu.O., Kozulina K.Yu., Golubinsky E.P. Use of immunosols for visual indication in dot-immunoassay of the plague agent and its antigens. VI All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation «Genodiagnosics of Infectious Diseases. 2007» («Molecular diagnostics-2007») (November 28 – 30, 2007, Moscow): Collected Papers. (Editorship of V.I. Pokrovsky. Moscow; 2007: I: 386 – 388 (in Russian).
6. Subycheva E.N., Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Balakhonov S.V., Golubinsky E.P. Use of dot-immunoassay for detection of the plague causative agent. *Sov. aspecty epidemiol. nadzora za osobo opasnymi infect. zabolevaniyami na yuge Rossa: Mater. nauch.-praktich. conf.* (March 21 – 22, 2007, Stavropol). Stavropol, 2007; II: 123, 124 (in Russian).
7. Nikolaev V.B., Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Dokorina A.A., Mironchuk Yu.V. Use of specific reagents labeled with colloid silver particles for detection of Francisella tularensis antigens and its antibodies by dot-immunoassay. Quarantine and zoonoses infections in Kazakhstan: Materials of the International Scientific-Practical Conference «Modern epidemic potential of the natural plague foci» devoted to the 10 Anniversary of Republic Kazakhstan sovereignty and the 50 Anniversary Taldykurgan Antiplague station (Taldykurgan, August 1 – 2, 2001). *Almaty; 2001; 3: 196 – 198 (in Russian).*
8. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Balakhonov S.V., Nikolaev V.B., Subycheva E.N. Use of gold and silver nanoparticles for screening of an investigated material in dot-immunoassay for presence of antigens of plague, brucellosis, tularemia causative agents and botulotoxin. Modern technologies in realization of global strategy for control of infectious diseases at the territory of the states – participants of Unity of the independent states: Materials of IX Interstate Scientific-Practical Conf. of CIS States-Participants (September 30 – October 2, 2008, Volgograd). *Volgograd; 2008: 75 – 77 (in Russian).*
9. Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Nosyreva L.I., Bodrykh O.B., Markov E.Yu., Veide A.A., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Design of test-system for screening of foodstuffs and clinical material for botulotoxin in dot-immunoassay. *Zhurn. Infekt. Patologii.* Irkutsk; 2009; 16 (3): 20 – 23 (in Russian).
10. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Balakhonov S.V. Modern approaches to detection and identification of botulinic toxins. *Infektsionnye bolesni.* 2012; 1: 64 – 73 (in Russian).
11. Noskova O.A., Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Markov E.Yu., Lekomtseva S.E., Bodrykh O.B., Balakhonov S.V. Clinical-epidemiological peculiarities and improvement of botulism laboratory diagnostics in the Irkutsk region. *Bulletin Vostochno-Sibirskogo Nauchnogo Centra Sibirskogo Otdeleniya RAMS.* 2013; 2 (90) Part. 1: 102 – 106 (in Russian).
12. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Balakhonov S.V., Andreevskaya N.M., Poltavchenko A.G., Dokorina A.A., Golubinsky E.P. The use of silver immunosols for detection of Yersinia pestis antigens in dot-immunoassay. *Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci.* 2002; 10: 53 – 55.
13. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. *One World – One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of international Conference* (11 – 12 April, 2013). Ulaanbaatar; 2013: 187 – 191.

**Доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора Иркутского противочумного института по научной работе с 1939 по 1947 год
Николай Акимович ГАЙСКИЙ (1884 – 1947 гг.)**



Организатор производства диагностических и профилактических медицинских иммунобиологических препаратов и питательных сред в Институте. В 1943 году в условиях военного времени сконструировал и внедрил в практику высокоэффективную живую аттенуированную туляремийную вакцину.

Сравнительная оценка методов детекции ботулотоксина в клиническом материале от больных людей

Т.Ю. Загоскина¹ (T_Y_Z_@mail.ru), С.В. Балахонов¹, Е.А. Чапоргина¹,
Е.Ю. Марков¹, О.В. Гаврилова¹, О.Б. Бодрых², Т.М. Долгова¹, Т.С. Тайкова¹,
Т.А. Иванова¹, Ю.О. Попова¹, А.В. Корнева¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области» Роспотребнадзора,
г. Иркутск

Резюме

Сконструирована высокочувствительная специфичная тест-система для дот-иммуноанализа, позволяющая проводить скрининг клинического материала на ботулотоксин в течение двух часов. При этом исключается необходимость использования в работе лабораторных животных.

Ключевые слова: ботулинический токсин, биологическая проба, дот-иммуноанализ

Comparative Estimation of Methods for Botulotoxin Detection in Clinical Material from Patients

T.Yu. Zagoskina¹ (adm@chumin.irkutsk.ru), S.V. Balakhonov¹, E.A. Chaporgina¹, E.Yu. Markov¹, O.V. Gavrilova¹, O.B. Bodryh²,
T.M. Dolgova¹, T.S. Taikova¹, T.A. Ivanova¹, Yu.O. Popova¹, A.V. Korneva¹

¹Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²Federal Budget Institution of Public Health «Center of Hygiene and Epidemiology in Irkutsk Region» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Irkutsk

Abstract

High-sensitive, specific test-system for dot-immunoassay permitting to screen a clinical material for botulotoxin within two hours was designed. Necessity of laboratory animal application for the experiment is thus excluded but efficiency.

Key words: botulinic toxin, biological test, dot-immunoassay

Введение

Ботулизм – тяжелая токсикоинфекция, обусловленная преимущественным поражением ЦНС экзотоксинами спорообразующих анаэробных бактерий *Clostridium botulinum*. Ботулотоксины (БТ) – яды биологического происхождения II группы патогенности – с высокой вероятностью могут быть использованы в качестве поражающих агентов при совершении актов биологического и химического терроризма [1]. Ботулинические нейротоксины подразделяются на серотипы А, В, С, D, E, F, G и недавно обнаруженный новый серотип H [2 – 4]. Несмотря на довольно высокое сходство первичной структуры серотипов [5, 6], внутриклеточные белки-мишени разных типов токсинов, их характеристики действия и эффективность значительно различаются [7]. Все они чрезвычайно токсичны, ингибируют высвобождение ацетилхолина в нервно-мышечном соединении. Наиболее патогенны для человека токсины серотипов А, В, Е и F [5]. Все типы токсинов *C. botulinum* обуславливают одинаковую картину заболевания, но токсин каждого типа иммунохимически специфичен и нейтрализуется только соответствующим антитоксином.

За рубежом «золотым стандартом» детекции БТ в клиническом материале и пищевых продуктах является тест на летальность мышей – высокочувствительная, но дорогостоящая и требующая большого расхода времени процедура [8]. Чувствительность определения ботулинических токсинов в биопробе на мышах выражают в средней летальной дозе LD₅₀, составляющей приблизительно 10 пг/мл [9].

К сожалению, не всегда есть возможность проведения работ с лабораторными животными, а сроки получения результатов в биологической пробе (БП) и реакции биологической нейтрализации токсина (РБНТ) велики.

С целью ускорения процедуры определения и идентификации ботулотоксинов, а также с целью отказа от использования лабораторных животных для рутинного скрининга клинического материала, пищевых продуктов и объектов окружающей среды предпринимаются попытки разработки надежных высокочувствительных экспрессных и информативных методов обнаружения ботулинических токсинов *in vitro*.

Цель исследования – сравнительная оценка чувствительности различных методов детекции ботулотоксинов (БП, РБНТ на белых мышах и дот-иммуноанализа (ДИА)) и затрат времени на получение с их помощью результатов.

Материалы и методы

Детекцию БТ в лабораториях Центра гигиены и эпидемиологии проводят преимущественно постановкой биологической пробы и реакции биологической нейтрализации токсина на белых мышах обоего пола весом 20 г с использованием диагностических противоботулинических поли- и моновалентных сывороток серотипов А, В, Е и F. Ориентировочный ответ при применении методов с использованием лабораторных животных получают на 2-е сутки, окончательный – через 4 – 8 суток.

При постановке РБНТ лабораторным животным внутрибрюшинно вводят исследуемый материал в смеси с одной из моноспецифических либо с поливалентной противоботулинической сывороткой. Контрольным животным вводят испытуемый образец в чистом виде. За время исследования мыши, не защищенные тем типом антитоксина, которым вызвано заболевание у пациента, погибают. Остаются живыми лабораторные животные, которым вводили исследуемый материал в смеси с поливалентной сывороткой или с сывороткой, соответствующей типу токсина, циркулирующего в крови больного. Чувствительность РБНТ составляет 30 – 40 пг/мл ботулотоксина.

Для постановки БП экстракты из исследуемого материала делят на две части. Одну из них кипятят на водяной бане в течение 20 – 30 минут для разрушения токсина. Постановка биологической пробы является ориентировочным исследованием и сводится к тому, что каждый образец кипяченого и некипяченого материала вводят двум мышам внутрибрюшинно по 0,5 мл или подкожно по 1,0 мл. Если в материале содержится ботулинический токсин, животные, получившие некипяченый образец, погибают, а получившие кипяченый – остаются живыми. Чувствительность БП составляет также 30 – 40 пг/мл ботулотоксина [10].

Одним из перспективных методов обнаружения патогенов и диагностики вызываемых ими заболеваний является дот-иммуноанализ (ДИА). Достаточно высокие специфичность и чувствительность, простота постановки, миниатюризация (объем пробы ~ 1 мкл), экспрессность (время реакции ~ 2 ч), отсутствие потребности в дорогостоящих реактивах и оборудовании делают ДИА перспективным для индикации патогенных биологических агентов методом, особенно в условиях работы мобильных автолабораторий эпидразведки.

Результаты и обсуждение

При создании новых способов детекции ботулотоксинов исходят из того, что эффективный

метод должен превосходить по чувствительности биотест на мышах, минимально реагировать на неспецифические воздействия со стороны исследуемых биологических субстратов, иметь высокую производительность и экспрессность, давать возможность идентифицировать серотип ботулотоксинов с одновременной их количественной оценкой. И наконец, для работы в условиях чрезвычайной ситуации необходима разработка простых в постановке высокочувствительных диагностических тест-систем, не требующих громоздкого оборудования и использования лабораторных животных.

Нами сконструирована тест-система для дот-иммуноанализа, позволяющая в течение приблизительно двух часов детектировать БТ в клиническом материале от больных ботулизмом людей. С этой целью подобраны способы выделения и очистки специфических IgG из коммерческих поливалентных и моноспецифических противоботулинических сывороток, применяемых в РБНТ и обеспечивающих высокую чувствительность обнаружения токсина; оптимизированы условия связывания IgG с наночастицами коллоидного серебра размером 5 – 9 нм; подобраны временной и температурный режимы проведения всех этапов дот-иммуноанализа [11].

Испытание ДИА на клиническом материале (рвотные массы, промывные воды желудка, содержимое кишечника, клизменные воды, сыворотки крови, моча) больных людей с установленным диагнозом «ботулизм» показало его высокую эффективность (табл. 1, 2). Пробы, содержащие БТ, в виде темно-серых пятен разной интенсивности проявлялись в местах нанесения образцов на мембрану. В отрицательных контролях (промывные воды желудка больных острыми кишечными инфекциями сальмонеллезной, шигеллезной и эшерихиозной этиологии, разводящая жидкость) окрашивания не развивалось, что свидетельствовало о специфичности разработанной тест-системы.

Положительные результаты исследования клинического материала в ДИА не только полностью совпадали с аналогичными результатами, полученными в БП и РБНТ на белых мышах, но и в ряде случаев превосходили их по чувствительности. Так, от больного N. положительные результаты были получены (совпадали) в трех указанных методах при исследовании содержимого кишечника, промывных вод желудка, рвотных масс, клизменных вод, однако в ДИА у этого же больного дополнительно был выявлен ботулотоксин в крови и моче. Время проведения БП составило 38 часов, РБНТ – также 38 часов, ДИА – приблизительно 2 часа.

Положительный результат исследования крови и мочи в дот-иммуноанализе свидетельствует, на наш взгляд, не только о более высокой чувствительности метода, но и о возможности обнаруже-

Таблица 1.
Сравнительные результаты исследования клинического материала от больного с диагнозом «ботулизм» в БП, РБНТ и ДИА

Материал для исследования	Результат		
	БП	РБНТ	ДИА
Промывные воды желудка	Положит.	Положит.	Положит.
Содержимое кишечника	Положит.	Положит.	Положит.
Рвотные массы	Положит.	Положит.	Положит.
Клизменные воды	Положит.	Положит.	Положит.
Кровь	Отрицат.	Отрицат.	Положит.
Моча	Отрицат.	Отрицат.	Положит.

Таблица 2.
Сравнительная оценка чувствительности методов БП и ДИА при исследовании клинического материала от больных с диагнозом «ботулизм»

Промывные воды желудка	Результат	
	БП	ДИА
От больного X.	Ц	1:256
От больного Z.	Ц	1:128
От больного M.	1:2	1:512
От больного Y.	Ц	1:256
От больного S.	1:2	1:512

Примечание: Ц – цельный материал.

ния ботулотоксина в составе циркулирующих иммунных комплексов в биологических средах организма, что повышает диагностическую ценность ДИА.

При сравнении чувствительности БП и ДИА были параллельно исследованы различные разведения (1:2 – 1:512) нативных образцов клинического материала (промывных вод желудка) от больных X. (проба № 1), Z. (проба № 40), M. (проба № 41), Y. (проба № 44) и S. (проба № 48). Гибель белых мышей зарегистрирована через 36 часов в разведении исследуемого материала в БП (цельный материал – 1:2). В ДИА ботулотоксин в указанных образцах обнаруживался в разведениях 1:128 – 1:512. Более высокие разведения исходных образцов (1:4 – 1:512) в БП не вызвали развития заболевания или гибели лабораторных животных. В ДИА все исследуемые образцы давали положительные результаты в разведениях 1:128 – 1:512 (см. табл. 2). Сроки получения результатов в ДИА – приблизительно через 2 часа от начала исследования.

Выводы

1. Разработанная тест-система для ДИА превосходит традиционные биологические методы как по чувствительности, так и по скорости получения результата, что позволяет эффективно (с высокой чувствительностью и специфичностью) проводить скрининг клинического материала на ботулотоксин в течение двух часов.
2. При использовании ДИА для детекции ботулотоксина в клиническом материале от больных ботулизмом людей исключается необходимость использования в работе лабораторных животных.
3. Разработанная тест-система для ДИА по сравнению с БП и РБНТ более экономична.
4. Преимущество ДИА заключается также в возможности проведения анализа в лабораториях любого уровня (даже слабо оснащенных), а также в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад в режиме чрезвычайных ситуаций.

Литература

1. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S. et al. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. JAMA. 2001; 285 (8): 1059 – 1070.
2. Dover N., Barash J.R., Hill K.K., Xie G., Arnon S.S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. J. Infect. Dis. 2014; 209 (2): 192 – 202.
3. Barash J.R., Arnon S.S. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. J. Infect. Dis. 2014; 209 (2): 183 – 191.
4. Yao G., Lee K., Gu S., Lam K.H., Jin R. Botulinum neurotoxin A complex recognizes host carbohydrates through its hemagglutinin component. Toxins (Basel). 2014; 6 (2): 624 – 635.

5. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Балахонов С.В. Современные подходы к детекции и идентификации ботулинических токсинов. *Инфекционные болезни*. 2012; 1: 64 – 73.
6. Pellett S. Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 364: 257 – 285.
7. Куренков А.Л., Артеменко А.Р., Никитин С.С., Орлова О.Р. Современные представления о механизмах действия ботулинического токсина типа А. *Врач*. 2009; 7: 8 – 12.
8. Аббасова С.Г., Руденко Н.В., Гороховатский А.Ю., Капралова М.В., Виноградова И.Д., Вертиев Ю.В., Несмеянов В.А., Гришин Е.В. Моноклональные антитела к ботулиническим нейротоксинам типов А, В, Е и F. *Биоорганическая химия*. 2011; 37 (3): 344 – 353.
9. арек, P., Dickerson, T.J. Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins*. 2010; 2 (1): 24 – 53.
10. ГОСТ 10444.7-86 «Продукты пищевые. Методы выявления ботулинических токсинов и *Clostridium botulinum*». Доступен на: <http://docs.cntd.ru/document/1200021073>.
11. Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Носырева Л.И., Бодрых О.Б., Марков Е.Ю., Вейде А.А. и др. Конструирование тест-системы для скрининга пищевых продуктов и клинического материала на ботулотоксин в дот-иммуноанализе. *Журнал инфекционной патологии*. 2009; 16 (3): 20 – 23.

References

1. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S. et al. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285 (8): 1059 – 1070.
2. Dover N., Barash J.R., Hill K.K., Xie G., Arnon S.S. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (2): 192 – 202.
3. Barash J.R., Arnon S.S. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (2): 183 – 191.
4. Yao G., Lee K., Gu S., Lam K.H., Jin R. *Botulinum neurotoxin A* complex recognizes host carbohydrates through its hemagglutinin component. *Toxins (Basel)*. 2014; 6 (2): 624 – 635.
5. Zagoskina T.Yu., Markov E.Yu., Balakhonov S.V. Modern approaches to detection and identification of botulinic toxins. *Infektsionnye bolesni*. 2012; (1): 64 – 73 (in Russian).
6. Pellett S. Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 364: 257 – 285.
7. Kurenkov A.L., Artemenko A.R., Nikitin S.S., Orlova O.R. Modern representations of action mechanisms of botulinic toxin of A type. *Vrach*. 2009; 7: 8 – 12 (in Russian).
8. Abbasova S.G., Rudenko N.V., Gorokhovatsky A.Yu., Kapralova M.V., Vinogradova I.D., Vertiev Yu.V. et al. Monoclonal antibodies to botulinic neurotoxins of A, B, E and F types. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2011; 37 (3): 344 – 353 (in Russian).
9. Capek P., Dickerson T.J. Sensing the deadliest toxin: technologies for botulinum neurotoxin detection. *Toxins*. 2010; 2 (1): 24 – 53.
10. State Standard 10444.7-86 «Foodstuffs. Methods for detection of botulinic toxins and *Clostridium botulinum*». Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200021073>.
11. Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Nosyreva L.I., Bodrykh O.B., Markov E.Yu., Veide A.A. et al. Design of a test-system for screening of foodstuffs and clinical material for botulotoxin by dot-immunoassay. *Zhurnal infektsionnoy patologii*. 2009; 16 (3): 20 – 23 (in Russian).

**Директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (с 2008 г.),
доктор медицинских наук, профессор
Сергей Владимирович БАЛАХОНОВ**



Оценка морфологических изменений в органах белых мышей под действием экспериментальных препаратов *Brucella abortus*

Т.П. Старовойтова, С.А. Витязева, В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru),
Л.М. Михайлов, Н.Л. Баранникова, Л.Е. Токарева, С.В. Балахонов, Т.Т. Шкаруба

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Резюме

Дана сравнительная оценка морфологических и гистологических изменений, вызванных введением инактивированной вакцины *Brucella abortus* 19 ВА и экспериментальных препаратов, полученных из *B. abortus* И-206, в L- и S-формах – термоэкстрактов (ТЭ) и корпускулярного антигена. Показано, что трехкратное интраперитонеальное введение экспериментальных препаратов не вызывает гибели белых мышей и не ухудшает их общего состояния. Корпускулярный антиген и ТЭ, полученные из *B. abortus* И-206 в L-форме, в отличие от ТЭ из *B. abortus* И-206 в S-форме, обладают способностью стимулировать иммунологическую перестройку в иммунокомпетентных органах, не вызывая побочных эффектов.

Ключевые слова: S- и L-формы, бруцеллы, вакцина, морфология

Estimation of Morphological Alterations in White Mice Organs under the Influence of Experimental *Brucella Abortus* Preparations

T.P. Starovojtova, S.A. Vityazeva, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), L.M. Mikhailov, N.L. Barannikova, L.E. Tokareva, S.V. Balakhonov, T.T. Shkaruba

Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

Comparative evaluation of the morphological and histologic alterations caused by introduction of *Brucella abortus* 19 BA vaccine and experimental preparations from *Brucella abortus* I-206 in L- and S-forms: thermoextracts (TE) and a corpuscular antigen, is represented. It is shown that triple intraperitoneal injection of the experimental preparations neither cause death of the white mice nor worsen its general well-being. A corpuscular antigen and TE from *B. abortus* I-206 in L-form unlike that from TE *B. abortus* I-206 in S-form possess the ability to stimulate immunological reorganization in immunocompetent bodies without by-effects.

Key words: S- and L-forms, *Brucella*, vaccine, morphology

Введение

Бруцеллез – зоонозное заболевание, при котором основным источником инфекции для людей являются больные сельскохозяйственные животные [1]. Заболеваемость людей бруцеллезом, регистрируемая в России, не имеет тенденции к снижению. Болезнь, как правило, принимает тяжелое течение с поражением в первую очередь лимфоретикулярной системы с переходом в хроническую форму. Профилактика бруцеллеза главным образом заключается в выявлении и ликвидации носителей инфекции – больных животных, а также вакцинации декретированного контингента и животных [2, 3].

Иммунизация на территории Российской Федерации в течение длительного времени проводится живыми вакцинами, которые имеют ряд недостатков – сильное сенсibiliзирующее действие, реактогенность и недостаточную эффективность, – что ограничивает их широкое применение [4]. Работа по конструированию новых вакцинных препаратов,

дающих более высокую защиту и не имеющих вышеперечисленных недостатков, особенно в отношении бруцелл в L-форме, ведется как у нас в стране, так и за рубежом [5].

Цель работы – сравнительный анализ морфологических и гистологических изменений в динамике при трехкратной иммунизации белых мышей экспериментальными препаратами, полученными из *B. abortus* И-206, в L- и S-формах, и инактивированной вакциной *B. abortus* 19 ВА.

Материалы и методы

Экспериментальной моделью в опытах служили 90 беспородных, но стандартных по условиям содержания и весу (18 – 20 г) белых мышей обоих полов. В качестве объектов исследования использовали инактивированную вакцину *B. abortus* 19 ВА и три экспериментальных препарата, полученные из *B. abortus* И-206: термоэкстракт (ТЭ) в L- и S-формах и корпускулярный антиген в L-форме.

Интактные белые мыши были разделены на четыре опытных (по 21 особи) и одну контрольную (6 особей) группы. Животных опытных групп иммунизировали интраперитонеально: корпускулярные антигены в дозе 5×10^9 м.к. в объеме 0,5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), ТЭ – 0,1 мкг в 0,5 мл ЗФР трехкратно с промежутком в 7 дней. Первой (I) опытной группой белых мышей вводили ТЭ *B. abortus* И-206 в L-форме, второй (II) – ТЭ *B. abortus* И-206 в S-форме, третьей (III) – корпускулярный антиген *B. abortus* И-206 в L-форме и четвертой (IV) – инактивированную вакцину *B. abortus* 19 ВА. В пятой (V) – контрольной – группе (интактные животные) вводили ЗФР с pH 7,2 в том же объеме.

Животных гуманным способом выводили из опыта (работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» 2003 г., Приложением к Приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 775). Материал забирали через 1, 3 и 7 суток после первой иммунизации, на 3-и сутки после второй и на 1-е, 3-и и 7-е сутки – после третьей. При вскрытии проводили подробное описание макроизменений, вызванных вводимыми препаратами, в органах и тканях белых мышей. Анатомический материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине с последующей заливкой в целлоидин. Срезы толщиной не более 5 мкм красили гематоксилин-эозином, тионином и метиловым зеленым – пиронином по Браше [6].

В работе использовали методы обзорной микроскопии. При исследовании препаратов автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа Zeiss (Германия) с видеокамерой Moticam 2000 разрешением 1392×1040 пикселей, ок. 100, об. 10 и компьютерной программы Motic Images Plus (версия 2).

Результаты и обсуждение

После первой иммунизации при вскрытии у всех животных I группы выявлены изменения к 3-м суткам: селезенка слегка увеличена, полнокровна, с отчетливо выраженными фолликулами, печень дряблая. К 7-м суткам данные изменения имели место у 50% животных. При гистологическом исследовании на 3 – 7-е сутки в печени установлена умеренно выраженная зернистая дистрофия гепатоцитов, в селезенке и регионарном лимфатическом узле – небольшая гиперплазия фолликулов, инфильтрация красной пульпы, кортикальной и паракортикальной зон нейтрофилами и клетками моноцитарного ряда.

Макроскопически у белых мышей опытной группы на 1-е сутки выявлены незначительные изменения цвета и консистенции печени (дряблая с тонкими краями), у 25% животных селезенка увеличена, зернистого вида. На 3 – 7-е сутки исследования изменений в паренхиматозных органах не установлено. Во все сроки наблюдения кишеч-

ник не изменен, тем не менее к 7-м суткам пейеровы бляшки отчетливо выражены. При микроскопическом исследовании на ранних сроках (1 – 3-е сутки) в печени выявлены слабовыраженная зернистая дистрофия клеток паренхимы и небольшая гиперплазия купферовских клеток (звездчатых ретикулоэндотелиоцитов) (рис. 1). На 7-е сутки в синусах селезенки и лимфатического узла (брыжечного) отмечены увеличение содержания лейкоцитов и полиморфно-ядерных нейтрофилов, гиперплазия фолликулов с хорошо выраженными герминативными центрами.

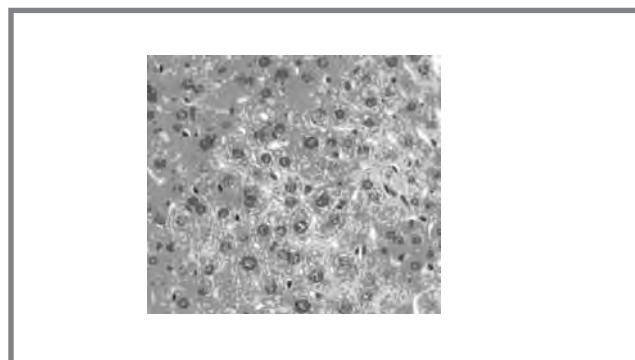
У животных I и II групп в месте введения препарата видимые изменения отсутствуют.

При введении белым мышам корпускулярного антигена, полученного из *B. abortus* И-206 в L-форме (III группа), на 1-е сутки исследования у 50% опытных животных выявлены дистрофические изменения в печени, инъекция сосудов подкожной клетчатки передней брюшной стенки в месте введения препарата, гиперплазия брыжечного лимфатического узла. К 7-м суткам данные изменения нивелируются, но заметно увеличиваются пейеровы бляшки, селезенка приобретает зернистый вид и несколько увеличена в размере. Сравнительный анализ гистологических изменений в паренхиматозных органах белых мышей II и III опытных групп после однократной иммунизации различий не выявил.

У животных IV группы во все сроки наблюдения – печень глинистого цвета, зернистая, дряблая; селезенка увеличена, зернистого вида; гистологическая картина в паренхиматозных органах соответствует выраженному вакцинальному процессу; в селезенке – миелоидная метаплазия пульпы.

После вторичного введения экспериментальных препаратов макроскопические и микроскопические изменения на 3-и сутки соответствуют таковым на 7-е сутки после первой иммунизации, в то время как у животных, иммунизированных инактивированной бруцеллезной вакциной, они имеют выраженный характер (в печени – зернистая дистрофия с мелкоочаговой пролиферацией звездчатых клеток; в селезенке – повышенное содержание эозинофилов).

Рисунок 1. Печень белой мыши на 3-и сутки после первой иммунизации ТЭ *B. abortus* И-206 в S-форме. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10×40



Установлено, что значительные изменения имеют место после третьей иммунизации. При введении инактивированной вакцины *B. abortus* 19 ВА на 1 – 7-е сутки у всех животных выявлены резкое увеличение размера селезенки – в 2 – 2,5 раза по сравнению с интактными животными (спленомегалия), инъекция сосудов подкожной клетчатки и кишечника, небольшое кровоизлияние в верхнее брыжеечное сплетение. Брыжеечный лимфатический узел не изменен. Печень глинистого цвета, дряблая, зернистая. У 30% животных на 7-е сутки в почках выявлены признаки дистрофии – дряблость, неотчетливость слоев, изменение цвета. При просмотре гистологических препаратов в печени экспериментальных животных отмечаются: зернистая дистрофия, что к 7-м суткам сочетается с умеренно выраженным полнокровием вен и синусоидов; диффузное кровоизлияние; небольшой периваскулярный отек поддольковой вены и вены триады; диапедез (рис. 2); пролиферация купферовских клеток, лейкоцитов и эозинофилов. Выявлены признаки развития специфического гранулематозного процесса, размер гранул составляет в среднем $5309,3 \pm 879,9$ мкм² (рис. 3).

В селезенке помимо гиперплазии белой пульпы имеют место полнокровие и кровоизлияние преимущественно вокруг фолликулов, инфильтрация пульпы миелоидными элементами (мегакариоци-

ты, миелоциты) и эозинофилами, а также очаговая инфильтрация бластными формами клеток (плазмобласты, лимфобласты и др.) около сосудов и трабекул. В почках – расширение сосудов, просветы канальцев сужены, цитоплазма зернистого вида, что указывает на зернистую дистрофию эпителия почечных канальцев. В регионарном лимфатическом узле на 7-е сутки выявлена инфильтрация мякотных тяжей плазмобластами и плазматическими клетками.

При трехкратном введении экспериментальным животным ТЭ *B. abortus* И-206 в S-форме (II опытная группа) наиболее выраженные патоморфологические изменения установлены только на 3-и сутки исследования. У 30% белых мышей они соответствуют макро- и микроизменениям, выявленным у особей опытной группы, за исключением патологических особенностей в почках, а также выраженной плазмоцитарной реакции в иммунокомпетентных органах и эозинофилии.

У белых мышей I и III групп во все сроки наблюдения установлено: селезенка обычного размера, слегка зернистого вида, печень глинистого цвета с тонкими краями. При исследовании гистологических срезов на 1 – 3-и сутки у 20% животных, иммунизированных ТЭ *B. abortus* И-206 в L-форме, и у 60% особей, получивших корпускулярный антиген *B. abortus* И-206 в L-форме, имела место зернистая дистрофия печени. В селезенке иммунизированных животных обеих групп выявлено увеличение доли белой пульпы (за счет пролиферации молодых форм клеток в реактивном центре фолликулов), что может быть расценено как иммунная перестройка макроорганизма (рис. 4, 5). На 7-е сутки изменений в органах не выявлено.

Таким образом, показано, что трехкратное интраперитонеальное введение экспериментальных препаратов не вызывает гибели белых мышей и не ухудшает их общего состояния.

При сравнительном анализе полученных результатов установлено, что введение корпускулярного антигена и ТЭ, полученных из *B. abortus* И-206 в L-форме, необратимых изменений в организме экспериментальных животных не вызывает, все

Рисунок 2.

Печень белой мыши на 7-е сутки после третьей иммунизации вакциной *B. abortus* 19 ВА. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10 x 40

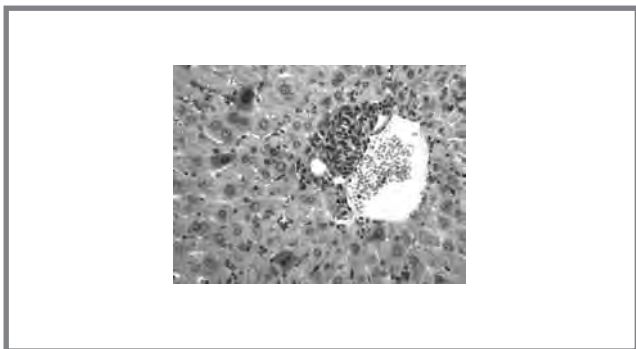


Рисунок 3.

Печень белой мыши на 7-е сутки после третьей иммунизации вакциной *B. abortus* 19 ВА. Признаки развития специфического гранулематозного процесса. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10 x 40

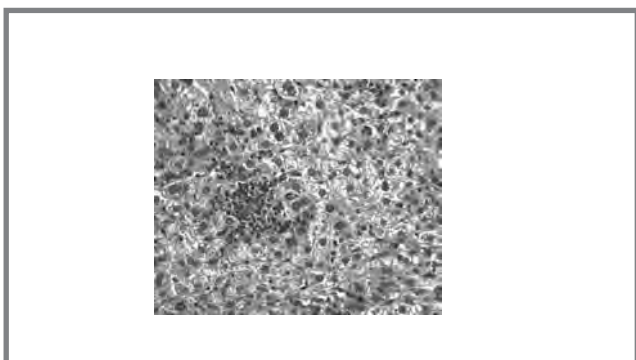


Рисунок 4.

Селезенка белой мыши, привитой ТЭ *B. abortus* И-206 в L-форме, на 3-и сутки после третьей иммунизации. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10 x 10

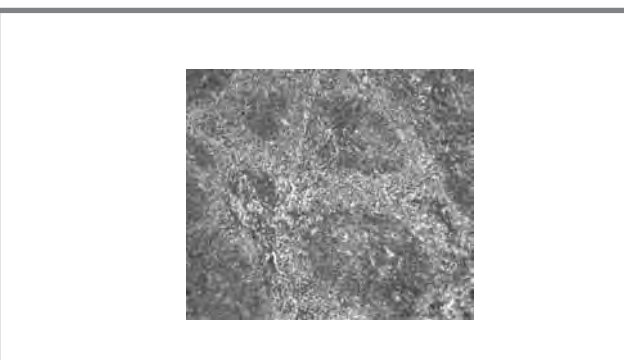
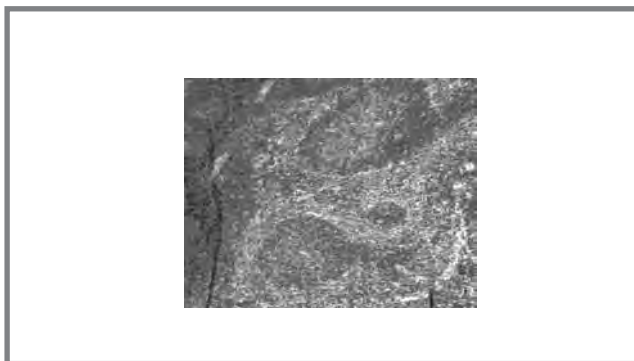


Рисунок 5.
Селезенка белой мыши, привитой *B. abortus* И-206
в L-форме, на 3-и сутки после третьей иммунизации.
Окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10 x 10



выявленные особенности носят продуктивный характер. У особей, получивших ТЭ *B. abortus* И-206 в S-форме, установленные на 3-и сутки после трехкратной иммунизации дистрофические изменения в печени и увеличение селезенки нивелируются

к 7-м суткам. В отличие от белых мышей, получивших экспериментальные препараты, у животных, вакцинированных инактивированной *B. abortus* 19 ВА, выявленные патоморфологические изменения (спленомегалия, дистрофические изменения в печени и почках, воспалительные поражения сосудов (васкулит) и формирование гранулем в печени), возможно, связаны с реактогенностью вакцины.

Выводы

1. Корпускулярный антиген и ТЭ, полученные из *B. abortus* И-206, в L-форме обладают способностью активизировать иммунологическую перестройку в иммунокомпетентных органах, не вызывая побочных эффектов, в отличие от ТЭ *B. abortus* И-206 в S-форме.
2. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения и накопления новых данных о воздействии этих препаратов на организм экспериментальных животных.

Литература

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. 2-е изд. Москва: Шико; 2013.
2. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Лекции по инфекционным болезням. 3-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина; 2007.
3. Братцев А.Ю., Гордиенко Л.Н. Степень патогенности бруцелл в зависимости от их происхождения и форм существования. Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Сб. науч. тр. Омск; 2005: 68 – 71.
4. Козловский В.Н. Живые туляремиальная и бруцеллезная вакцины как индукторы иммунологических реакций: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. Ростов-на-Дону; 1997.
5. Булдыгин Д.В., Гордиенко Л.Н., Шестаков В.А., Братцев А.Ю. Степень выраженности реакции организма лабораторных животных в зависимости от введенной дозы L-культуры бруцелл. Материалы Всероссийской научной конференции по проблемам хронических инфекций (бруцеллез, туберкулез): Сб. науч. тр. Омск; 2001: 86 – 89.
6. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Ленинград: Медицина; 1969.

References

1. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Prakt. rukovodstvo. 2 edition. Moscow: Shiko; 2013 (in Russian).
2. Yushchuk N.D., Vengerov Yu.Ya. Lectures on Infectious Diseases. Moscow: Medicina; 2007 (in Russian).
3. Bratsev A.Yu., Gordienko L.N. Degree of *Brucella* pathogenicity depending on its origin and existence forms. Aktualnye problemy veterinarnoi mediciny: Collected scientific papers, Omsk; 2005: 68 – 71 (in Russian).
4. Kozlovsky V.N. Live tularemia and brucellosis vaccines as inducers of immunological reactions: Doctor of med. sci. diss. Rostov-on-Don; 1997 (in Russian).
5. Buldygin D.V., Gordienko L.N., Shestakov V.A., Bratsev A.Yu. Expressiveness degree of the laboratory animal reactions depending on the dose of *Brucella* L-culture. Materials of the All-Russia Scientific Conference on Problems of Chronic infections (brucellosis, tuberculosis): Collected scientific papers, Omsk; 2001: 86 – 89 (in Russian).
6. Merkulov G.A. A course of pathohistological technology. Leningrad: Medicine; 1969 (in Russian).

Специалисты СПЭБ-2 Иркутского противочумного института – участники санитарно-противоэпидемических (профилактических) работ в зоне чрезвычайной ситуации, связанной с подтоплением в Хабаровском крае и Еврейской автономной области (2013 г.)



Результаты изучения иммуногенной активности клеточных оболочек *Francisella tularensis* разных подвигов (сообщение 1)

А.В. Корнева (adm@chumin.irkutsk.ru), В.Б. Николаев, К.Ю. Ястремская, Е.Ю. Марков, В.В. Войткова, С.Ю. Соловьев, Ю.О. Попова, А.В. Мазепа, В.С. Половинкина

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Резюме

Изучено влияние препаратов клеточных оболочек *Francisella tularensis* четырех подвигов, полученных из мочевиновых лизатов туляремийного микроба, на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных. Показано стимулирующее влияние препаратов клеточных оболочек *F. tularensis* на синтез цитокинов. Результаты исследований позволяют рассматривать препараты клеточных оболочек *F. tularensis* в качестве компонентов при создании вакцин.

Ключевые слова: туляремия, *Francisella tularensis*, клеточные оболочки, цитокины, иммунокомпетентные клетки, вакцины

Results of the Study of the Immunogenic Activity of Cellular Membranes *Francisella tularensis* Different Subspecies (1. report)

A.V. Korneva (adm@chumin.irkutsk.ru), V.B. Nikolaev, K.Yu. Yastremskaya, E.Yu. Markov, V.V. Voytkova, S.Yu. Solovyov, Yu.O. Popova, A.V. Mazepa, V.S. Polovinkina

Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

The effect of cell membrane preparations of four subspecies of *Francisella tularensis*, derived from urea lysates tularemia microbe on cytokine production by immunocompetent cells of experimental animals have been studied. Stimulating influence cell membrane preparations of *F. tularensis* on cytokine synthesis was shown. The results allow to consider cell membrane preparations *F. tularensis* as constituent elements in the development of vaccines.

Key words: tularemia, *Francisella tularensis*, cell membranes, cytokines, immune cells, vaccines

Введение

Francisella tularensis – возбудитель зоонозной инфекции туляремии, природные очаги которой широко распространены во всем Северном полушарии в пределах умеренного климатического пояса, в том числе на территории Российской Федерации, и приурочены к различным климатическим зонам с разнообразными ландшафтами. Природным резервуаром данного возбудителя являются главным образом грызуны и зайцеобразные. Заражение происходит контактным, трансмиссивным, алиментарным и аспирационным путями.

В связи с рядом особенностей, таких как высокая вирулентность, возможность заражения аспирационным путем, устойчивость к воздействию факторов внешней среды и способность долго сохраняться в ней (от 5 суток до 10 месяцев), Центр по контролю и профилактике заболеваний США (Center for Disease Control and Prevention, CDC) включил *F. tularensis* в список потенциально опасных агентов биотерроризма с высшей категорией опасности «А» [1], что, несомненно, говорит об актуальности широкого исследования механизмов ви-

рулентности возбудителя туляремии и поиска путей создания эффективной вакцины против нее.

Известно, что туляремийный микроб, являясь внутриклеточным паразитом, обладает способностью противостоять бактерицидным механизмам фагоцитов и размножаться в них [2 – 5]. В то же время фагоциты под действием туляремийного микроба усиливают синтез ряда провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-1 и ФНО- α , которые определяют течение инфекции в организме хозяина.

Локализация некоторых антигенных детерминант на поверхности клеток туляремийного микроба, данные о высокой протективной активности субклеточных фракций, а также входящих в их состав липополисахаридов и белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий обуславливают возможность использования поверхностных структур в качестве компонентов безопасных и эффективных профилактических и диагностических препаратов [6 – 8].

Одним из важнейших аспектов в изучении комплексных антигенных препаратов туляремийного микроба является оценка иммунного статуса экс-

периментальных животных, в частности продукции цитокинов клетками иммунофагоцитарной системы.

Цель исследования – изучение влияния препаратов клеточных оболочек *F. tularensis* разных подвидов, полученных из мочевиновых лизатов туляремийного микроба, на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных.

Материалы и методы

В работе были использованы шесть штаммов живых культур *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (авирулентны для белых мышей в дозах 10 – 100 м.к.), *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 (ЛД₅₀ для белых мышей – 1 м.к.), *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 21/400, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (вакцинный, ЛД₅₀ для белых мышей – 2 × 10⁶ м.к.) из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Обеззараженные препараты клеточных оболочек получали лизисом живых клеток *F. tularensis* раствором мочевины. К суспензии микробных клеток в 0,9% растворе NaCl в равном объеме (1:1) добавляли 9 М раствор мочевины до достижения конечной концентрации 4,5 М, инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С. Лизат микробных клеток, прошедший контроль специфической стерильности, подвергали центрифугированию при 10 тыс. g в течение 30 минут для освобождения от крупных фрагментов разрушенных клеток. Фракции клеточных оболочек получали центрифугированием осветленного лизата при 40 тыс. g в течение 60 минут.

Содержание белка определяли по методу О.Н. Lowry с соавт. [9] или в его модификациях [10, 11], углеводов – в реакции с фенолом [12] после гидролиза препаратов в 2 н. H₂SO₄ в течение 2 часов при 95 °С. Содержание белка в препаратах варьировалось от 43 до 78% сухой массы, углеводов – от 20 до 38%.

В опыте были использованы 40 самцов сертифицированных белых беспородных мышей (НПО «Вектор», г. Новосибирск) массой 18 – 20 г (по пяти особей в группе). Животных выводили из эксперимента в соответствии с утвержденными правилами лабораторной практики (Приказ Минздрава России от 19.06.2003 г. № 267).

Подопытных животных распределили на семь групп. Белым мышам шести опытных групп вводили подкожно в объеме 0,2 мл забуференный физиологический раствор (ЗФР) pH 7,2 и в дозе 19 мкг – следующие препараты клеточных оболочек: *F. tularensis* Utah 112; *F. tularensis* A-61; *F. tularensis* B-399 A-Cole; *F. tularensis* 21/400; *F. tularensis* 306; *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Контролем служили мыши, получившие подкожно по 0,2 мл ЗФР. Кровь у подопытных животных заби-

рали из хвостовой вены. Для получения плазмы в качестве антикоагулянта использовали 129 мМ цитратный буфер pH 7,4. Плазму крови получали центрифугированием (10 тыс. g при 4 °С в течение 15 минут).

Содержание цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-2 и ФНО-α в плазме крови оценивали в динамике на 3-и, 7-е и 21-е сутки после инокуляции животным исследуемых препаратов методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, США). В работе использовали коммерческие тест-системы Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Standard Group I 23-Plex (Bio-Rad, США). Обработку данных осуществляли с помощью программы Bio-Plex Manager 5.0 Properties.

Содержание цитокинов в плазме крови анализировали в трех повторах. Количественные показатели содержания цитокинов в стандартных калибровочных разведениях, в контрольных и тестируемых образцах были воспроизводимы. Концентрацию цитокинов в плазме крови выражали в пкг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6 (©StatSoft, Inc. 19842001, ИПЧИ 31415926535897), с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $P \leq 0,05$ и $P \leq 0,01$; $n = 15$.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что уровень цитокинов в плазме крови у животных контрольной группы в среднем не превышал 1 пкг/мл.

На 3-и сутки после инокуляции препаратов экспериментальным животным было показано значительное увеличение синтеза ИЛ-1β ($P \leq 0,01$) в ответ на иммунизацию препаратами *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 306, *F. tularensis* subsp. *holarctica* 21/400 и *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. На 7-е сутки после иммунизации препаратами *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* A-61 и *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 отмечено увеличение синтеза ИЛ-1β ($P \leq 0,05$) (рис. 1).

Все препараты клеточных оболочек *F. tularensis* проявили стимулирующее влияние на синтез ФНО-α на 7-е сутки после иммунизации, но достоверное увеличение ($P \leq 0,05$) было зафиксировано в ответ на введение препарата *F. tularensis* subsp. *tularensis* B-399 A-Cole. На 21-е сутки в плазме крови экспериментальных животных, иммунизированных клеточными оболочками, отмечали присутствие ФНО-α, но полученные значения выходили за пределы статистической значимости (рис. 2).

Усиление синтеза лимфокина ИЛ-2 на 7-е сутки после иммунизации наблюдали у экспериментальных животных в ответ на введение всех препаратов. К 21-м суткам содержание ИЛ-2 снизилось

Рисунок 1.
Синтез ИЛ-1 в ответ на иммунизацию препаратами клеточных оболочек *F. tularensis*

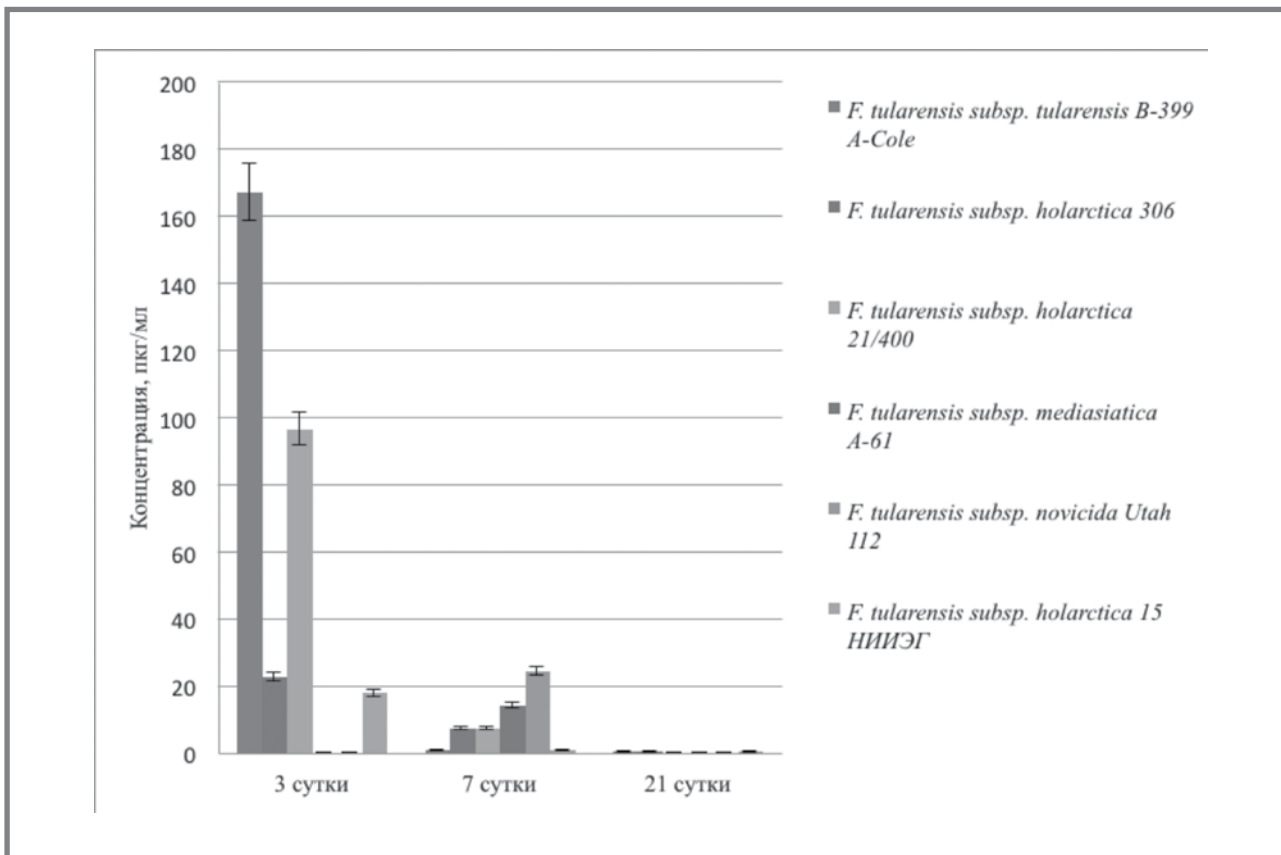
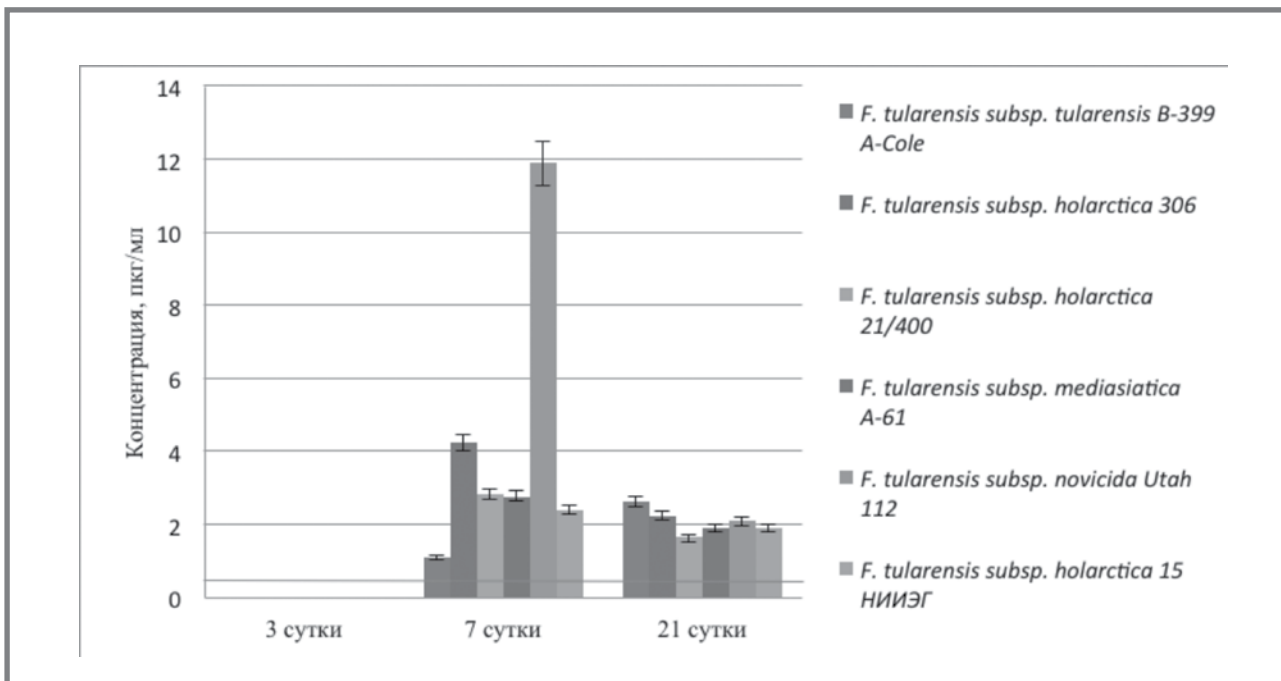


Рисунок 2.
Синтез ФНО- в ответ на иммунизацию препаратами клеточных оболочек *F. tularensis*



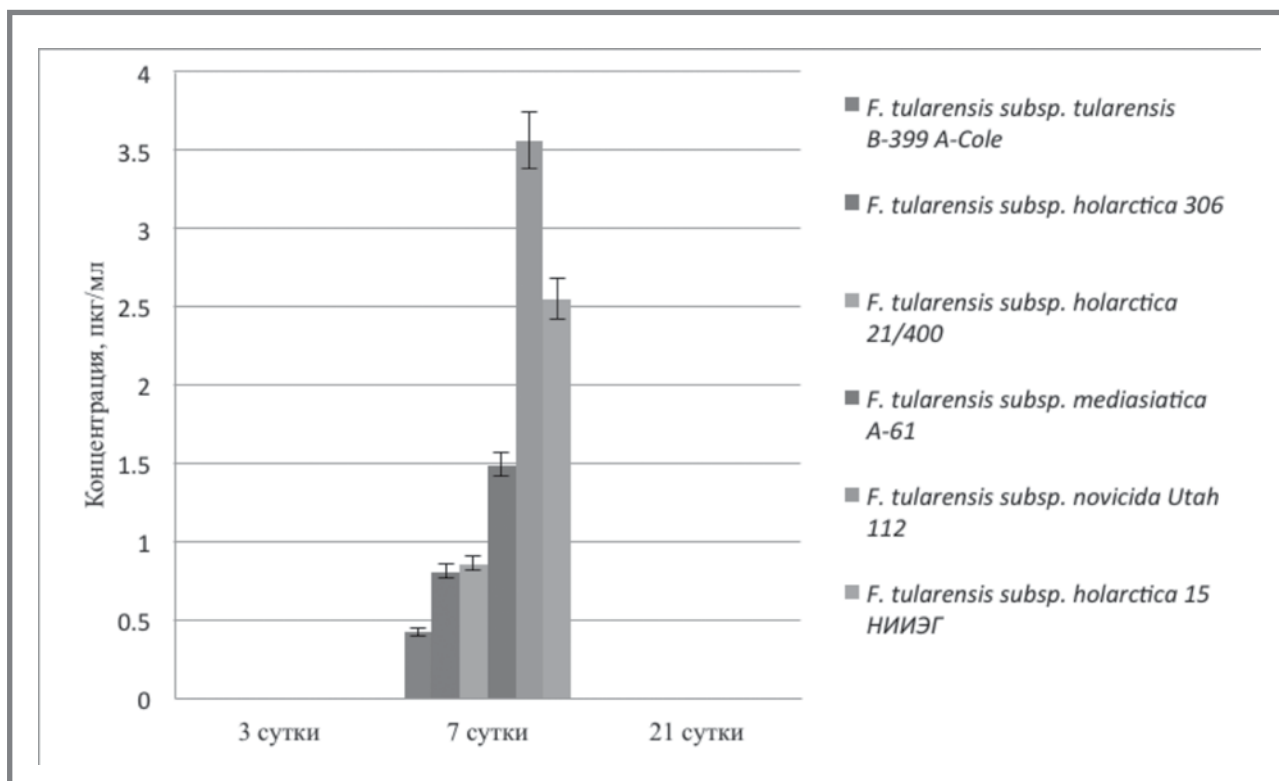
до значений ниже тех, что определялись в данном эксперименте (рис. 3).

Стоит отметить, что клеточные оболочки *F. tularensis* независимо от видовой принадлеж-

ности штаммов *F. tularensis*, из которых они получены, стимулировали продукцию ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-2 иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных. Тем не менее эффект стиму-

Рисунок 3.

Синтез ИЛ-2 в ответ на иммунизацию препаратами клеточных оболочек *F. tularensis*



ляции синтеза цитокинов был наиболее выражен в случае иммунизации белых мышей препаратами *F. tularensis subsp. novicida* Utah 112, *F. tularensis subsp. holarctica* 15 НИИЭГ и *F. tularensis subsp. holarctica* 306.

Повышенный уровень провоспалительного цитокина ИЛ-1 β на 3-и и 7-е сутки после инокуляции препаратов, а затем и синтез ФНО- α (на 7-е и 21-е сутки), высокие концентрации которого вызывают развитие системной воспалительной реакции, свидетельствуют о запуске цепи реакций, формирующих иммунный ответ макроорганизма.

Известно, что ИЛ-1 β и ФНО- α являются короткоживущими цитокинами и не депонируются в клетках, а синтезируются импульсно через транскрипцию мРНК соответствующего гена. Однако описаны случаи депонирования ФНО- α в тучных клетках [13], что, возможно, объясняет присутствие ФНО- α в плазме крови экспериментальных животных в высоких концентрациях на 21-е сутки.

В пользу активного формирования иммунитета у экспериментальных животных на введенные препараты клеточных оболочек *F. tularensis* говорит появление в плазме крови медиатора иммунного ответа ИЛ-2, стимулирующего антителообразование к Т-зависимым антигенам и усиливающего пролиферацию Т-клеток. Данное обстоятельство может говорить о накоплении и активации эффекторных клеток и, как следствие, о формировании иммунологической памяти [14].

Перспективность использования нативных поверхностных структур (полых везикул из наружных

мембран или клеточных оболочек – «теней» – рекомбинантных бактериальных клеток) возбудителей бактериальных инфекций в качестве основы для конструирования химических бесклеточных вакцин подтверждают также результаты работ иностранных исследователей [15, 16].

Таким образом, полученные нами препараты клеточных оболочек туляремийного микроба обладают стимулирующим действием на продукцию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками экспериментальных животных. Уровни цитокинов в плазме крови иммунизированных животных отражают, на наш взгляд, состояние работы иммунной системы в ответ на введение экспериментальных препаратов и характеризуют иммуногенную активность.

Выводы

1. Экспериментальные препараты клеточных оболочек туляремийного микроба, полученные из мочевиновых лизатов живых клеток *F. tularensis*, обладают иммуногенной активностью.
2. Результаты исследования показали, что препараты клеточных оболочек *F. tularensis* разных подвидов оказывают стимулирующее действие на продукцию цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ФНО- α у экспериментальных животных.
3. Количественные показатели содержания цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-2 и ФНО- α в плазме крови экспериментальных животных и динамика их синтеза зависят от подвидовой принадлежности *F. tularensis*.

Полученные данные указывают на необходимость комплексного исследования иммуногенных свойств клеточных оболочек *F. tularensis*, выделенных из мочевиновых лизатов живых микробных кле-

ток, и позволяют рассматривать их использование в качестве перспективных антигенных компонентов при создании эффективных и безопасных вакцинных препаратов.

Литература

1. Hepburn M.J., Friedlander A. M., Dembek Z.F., ed. Chapter 8: Tularemia. In: Textbooks of military medicine: medical aspects of biological warfare. Washington: Borden Institute. 2007; 167 – 184.
2. Fortier A.H., Green S.J., Polsinelli T., Jones T.R., Crawford R.M., Leiby D.A. et al. Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. Immunol. Ser. 1994; 60: 349 – 361.
3. Mohapatra N.P., Soni S., Rajaram M. V. S., Dang P. M. C., Reilly T. J., El-Benna J. Francisella acid phosphatases inactivate NADPH oxidase complex components in human phagocytes by. J. Immun. 2010; 184 (9): 5141.
4. Oyston P.C.F. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. J. Med. Microbiol. 2008; 57 (8): 921 – 930.
5. Дубровина В.И. Функциональные особенности фагоцитов при инфекционном и вакцинальном процессе, вызываемом *Francisella tularensis*. Иркутск: Вост-Сиб. издательская компания; 2002.
6. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю., Половинкина В.С., Иванова Т.А., Саппо С.Г. и др. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. Бюл. ВЦНЦ СО РАМН. 2004; 64 (3): 123 – 127.
7. Huntley J.F., Conley P.G., Rasko D.A., Hagman K.E., Apicella M.A., Norgard M.V. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2008; 76: 3664 – 3671.
8. Войткова В.В. Формирование иммунного ответа макроорганизма на введение белково-полисахаридного комплекса *Francisella tularensis* разных подвидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск; 2012.
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193 (1): 265 – 275.
10. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 1977; 83 (2): 346 – 356.
11. Zaman Z., Verwilghem R.L. Quantitation of proteins solubilized in sodium dodecyl sulfate-mercaptoethanol-tris electrophoresis buffer. Anal. Biochem. 1979; 100 (1): 64 – 69.
12. Хансон Р., Филлипс Дж. Химический состав бактериальной клетки. Методы общей бактериологии. Москва: Мир; 1984. 2: 283 – 373.
13. Хайтов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология: Учебник. 3-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицина; 2010.
14. Медуницын Н.В. Вакцинология. Москва: Триада-Х; 2004.
15. Collins B.S. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. Discov. Med. 2011; 62 (12): 7 – 15.
16. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. J. Proteome Res. 2011; 10: 954 – 967.

References

1. Hepburn M.J., Friedlander A.M., Dembek Z.F., ed. Chapter 8: Tularemia. In: Textbooks of military medicine: medical aspects of biological warfare. Washington: Borden Institute. 2007; 167 – 184.
2. Fortier A.H., Green S.J., Polsinelli T., Jones T.R., Crawford R.M., Leiby D.A. et al. Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. Immunol. Ser. 1994; 60: 349 – 361.
3. Mohapatra N.P., Soni S., Rajaram M.V., Dang P.M., Reilly T.J., El-Benna J. Francisella acid phosphatases inactivate NADPH oxidase complex components in human phagocytes by. J. Immun. 2010; 184 (9): 5141.
4. Oyston P.C. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. J. Med. Microbiol. 2008; 57 (8): 921 – 930.
5. Dubrovina V.I. Функциональные особенности фагоцитов при инфекционном и вакцинальном процессе, вызываемом *Francisella tularensis*. Irkutsk: East-Siberian; 2002 (in Russian).
6. Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Zagoskina T.Yu., Polovinkina V.S., Ivanova T.A., Sappo S.G. et al. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. Bulletin of the East-Siberian Centre of Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Med. Sciences. 2004; 3 (64): 123 – 127 (in Russian).
7. Huntley J.F., Conley P.G., Rasko D.A., Hagman K.E., Apicella M.A., Norgard M.V. Native outer membrane proteins protect mice against pulmonary challenge with virulent type A *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2008; 76: 3664 – 3671.
8. Voytkova V.V. Formation of host immune response to the injection of complex proteinopolysaccharide of *Francisella tularensis* subspecies different: PhD of biol. sci. diss. Irkutsk; 2012 (in Russian).
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193(1): 265 – 275.
10. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem. 1977; 83 (2): 346 – 356.
11. Zaman Z., Verwilghem R.L. Quantitation of proteins solubilized in sodium dodecyl sulfate-mercaptoethanol-tris electrophoresis buffer. Anal. Biochem. 1979; 100 (1): 64 – 69.
12. Hanson R., Phillips G. The chemical composition of the bacterial cells. Manual of methods for general bacteriology. Moscow: Mir; 1984. 2: 283 – 373 (in Russian).
13. Khaitov R.M., Ignatieva G. A., Sydorovych I. G. Immunology. Norm and pathology: Textbook. 3-rd, edit. rev. and enl. Moscow: Medicine; 2010 (in Russian).
14. Medunitsyn N. V. Vaccinology. Moscow: Triada-X; 2004 (in Russian).
15. Collins B. S. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. Discov. Med. 2011; 62 (12): 7 – 15.
16. Pierson T., Matrakas D., Taylor Y.U. Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. J. Proteome Res. 2011; 10: 954 – 967.

АНОНС



Вышла в свет монография «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения при ликвидации последствий наводнения на Дальнем Востоке» под редакцией академика РАН, доктора мед. наук, профессора Г.Г. Онищенко и доктора мед. наук профессора С.В. Балахонова. Новосибирск: Наука-Центр; 2014: 648. ISBN 978-5-9554-0031-0

Результаты исследования действия антигенного препарата *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne в сочетании с кобальт-арабиногалактаном на активацию и апоптоз клеток крови *in vitro*

В.И. Дубровина¹ (dubrovina-valya@mail.ru), В.В. Войткова¹, С.В. Лукьянова¹, О.В. Юрьева¹, В.Б. Николаев¹, Г.П. Александрова²

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

²Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН

Резюме

В работе представлены материалы исследования антигенного препарата штамма *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne и его сочетанного применения с наноструктурированным кобальт-арабиногалактаном. Показана их способность повышать пролиферативную и функциональную активность лимфоцитов крови экспериментальных животных. Получены новые данные о возможности применения антигенного препарата сибиреязвенного микроба для повышения резистентности организма экспериментальных животных к *B. anthracis*.

Ключевые слова: сибирская язва, антигены, наноконпозиты, иммунитет, апоптоз

Influence of *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne Antigen Preparations in Combination with Cobaltarabinogalactan on the apoptosis blood cells *in vitro*

V.I. Dubrovina¹ (dubrovina-valya@mail.ru), V.V. Voytkova¹, S.V. Lukyanova¹, O.V. Yuryeva¹, V.B. Nikolaev¹, G.P. Aleksandrova²

¹Irkutsk Antiplague Research Institute Research Institute of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

²A.E. Favorsky named Irkutsk Institute of Chemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences

Abstract

In our work materials of research of an antigenic preparation of a strain of *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne and its combined application with nanostructured cobalt-arabinogalactan are presented. Their ability to increase proliferative and functional activity of lymphocytes of blood of experimental animals is shown. New data indicating the possibility of *B. anthracis* antigen extract applications as the preparations that raise resistance of the experimental animals against *B. anthracis* infection are obtained.

Key words: anthrax, antigenes, nanocomposite, immunity, apoptosis

Введение

Основной принцип совершенствования химических вакцин заключается во введении в препарат дополнительных антигенов, выбор которых осуществляется исходя из особенностей патогенеза и иммуногенеза инфекционных заболеваний. В качестве компонентов, повышающих иммуногенность сибиреязвенных химических вакцин, предлагаются споровые и капсульные антигены, белки S-слоя, детоксицированные отечный и летальный факторы [1, 2].

По мнению I.J. Glomski с соавт., в состав прототипов сибиреязвенных вакцин наряду с протективным антигеном должны входить компоненты спор или клеток *B. anthracis*, усиливающие клеточный иммунитет [3]. Перспективным направлением считают разработку иммуноактиваторов, модулирующих формирование адаптивного иммунитета [4].

Известно, что наиболее выраженный иммунный ответ формируется на конъюгат антиге-

на с иммуностимулятором (адьювантом). Поиск и создание иммуномодуляторов, нацеленных на активацию эффекторов врожденного иммунитета, крайне важны [5].

Установлено, что полисахарид растительного происхождения – арабиногалактан (АГ) – является одним из перспективных кандидатов на роль стабилизирующей матрицы для синтеза наноструктурированных металлосодержащих композитов.

Ранее нами было показано, что антигенный препарат из вакцинного штамма *B. anthracis* 34F₂ Sterne (S-2) в сочетании с Co-АГ обладает способностью повышать неспецифические факторы иммунитета [6 – 9]. Однако действие препарата S-2 на активацию и апоптоз клеток крови не изучено, в связи с чем исследование особенностей реагирования макроорганизма на этот антигенный препарат с помощью современных методов клеточной биологии представляется актуальным [10, 11].

Цель работы – изучить влияние S-2 *B. anthracis* в сочетании с Co-АГ на активацию и апоптоз клеток крови в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В работе были использованы 72 особи беспородных белых мышей обоего пола, сертифицированных (НПО «Вектор», г. Новосибирск), стандартных по условиям содержания и весу (массой 15 – 20 г). Животных выводили из эксперимента в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755 и Приложением к Приказу МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Объектом исследования служил антигенный препарат, полученный из вакцинного штамма *B. anthracis* 34F₂ Sterne. В качестве адъюванта использовали Co-АГ (содержание металла 1%) [12].

Материалом для исследования служили лейкоциты, выделенные из гепаринизированной крови мышей. Кровь отстаивали с 3%-ным желатином, приготовленным на фосфатно-солевом буфере, в соотношении 1:1 до четкого разделения эритроцитов и плазмы в течение 40 – 60 мин при комнатной температуре. Отбирали плазму и верхний слой эритроцитов, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 5 мл лизирующего буфера Lysing Buffer (BD Biosciences, Oxford, Великобритания), инкубировали 5 мин на льду, отмывали при 200 g в течение 2 мин и доводили до концентрации 2×10^7 кл/мл фосфатно-солевым буфером. Клетки в концентрации 10^6 (50 мкл) инкубировали в течение 30 мин с препаратами: S-2 (20 мкг по белку); Co-АГ (10 мкг); Co-АГ + S-2. В качестве контроля использовали клетки интактных животных. Фенотип лимфоцитов определяли с использованием моноклональных антител компании Becton Dickinson (США) в следующей панели: CD45-APC/CD3-FITC/CD4-Alexa-700/CD8-APC-Cy7/CD25-PE-Cy7/Annexin-PE/7-AAD [13]. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II в программе BD Diva 6.0.

Для изучения клеточного звена иммунной системы определяли следующие субпопуляции Т-лимфоцитов: общее содержание активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺), общее содержание активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25⁺), популяции активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD25^{низкий} и CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий}), активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁺), нативные Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD25⁻), нативные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD25⁻). Жизнеспособность клеток оценивали на двухпараметрических графиках AnV⁺/7-AAD и подсчитывали процент живых клеток (AnV⁺/7-AAD⁺), клеток на стадии раннего (AnV⁺/7-AAD⁺) и позднего (AnV⁺/7-AAD⁺) апоптоза.

Статистическая обработка данных производилась при помощи стандартного пакета приклад-

ных программ Statistica, версия 6.1 (©StatSoft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897). Статистический анализ данных осуществляли с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни, корреляционный – методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного (25-й и 75-й процентиля) размаха (Me (Q1–Q3)) из $n = 7$. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что антигенный препарат S-2 оказывает стимулирующее влияние на экспрессию CD25 Т-лимфоцитами (табл. 1). Так, S-2 и S-2 + Co-АГ способствуют увеличению общей популяции активированных Т-клеток (CD3⁺CD25⁺) в среднем в 4,2 и 3,7 раза соответственно по сравнению с контролем ($P < 0,01$). Следует отметить, что соотношение активированных и неактивированных Т-клеток (CD3⁺CD25⁺/CD3⁺CD25⁻) в контроле составляет 1:3, при воздействии S-2 количество CD3⁺CD25⁺ клеток возрастает до 41:1, а при воздействии S-2 + Co-АГ – до 8:1.

Установлено, что препараты S-2 и S-2 + Co-АГ приводят к достоверному увеличению концентрации Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD25 (см. табл. 1). У Т-хелперов отмечены существенные различия в степени экспрессии CD25 (CD3⁺CD4⁺CD25^{низкий} и CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий}). Так, под действием S-2 наблюдалось увеличение общего содержания активированных Т-лимфоцитов за счет повышения CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий}. Примирование клеток комплексным препаратом (S-2 + Co-АГ) приводит к повышению как CD3⁺CD4⁺CD25^{низкий}, так и CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий} клеток (рис. 1). Следует отметить, что S-2 стимулирует экспрессию CD25 Т-лимфоцитами (CD3⁺CD25⁺) и их субпопуляциями (CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий}) в большей степени ($P < 0,01$), чем S-2 + Co-АГ. При сравнительном анализе действия Co-АГ статистически достоверных изменений концентрации активированных Т-лимфоцитов не выявлено; тем не менее зарегистрировано снижение уровня активированных CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов (см. табл. 1).

Анализ жизнеспособности клеток крови, примированных препаратами, показал, что S-2 и S-2 + Co-АГ способствуют повышению содержания AnV⁺/7-AAD⁺ и одновременному снижению AnV⁺/7-AAD⁻ и AnV⁺/7-AAD⁻ общей популяции лимфоцитов, Т-лимфоцитов и их субпопуляций (табл. 2). Так, отмечена корреляционная связь между клетками AnV⁺/7-AAD⁺ и AnV⁺/7-AAD⁻ ($r_s = -0,86$, $P < 0,01$). У клеток, примированных S-2, в отличие от Co-АГ, выявлена взаимосвязь AnV⁺/7-AAD⁺ и AnV⁺/7-AAD⁻ ($r_s = -0,90$, $P < 0,01$).

Анализ экспрессии CD25 Т-лимфоцитами на разных стадиях апоптоза показал, что антигенные препараты S-2 и S-2 + Co-АГ способствуют снижению AnV⁺/7-AAD⁺ и AnV⁺/7-AAD⁻ нативных и жизне-

Таблица 1.
Характеристика экспрессии маркера активации CD25 T-лимфоцитами крови (Ме (Q1-Q3))

Препарат	Показатель, %					
	CD3 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD25 ⁻	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁻
S-2 (n = 7)	99,6 (94,9 – 99,6)**	2,4 (0,2 – 5,0)**	76,3 (71,3 – 79,9)**	1,85 (0,1 – 4,0)**	18,4 (17,4 – 21,4)**	0,4 (0 – 0,6)**
Co-АГ (n = 7)	22,1 (21,7 – 25,9)	77,9 (74,1 – 78,3)	17,7 (16,5 – 20,6)	60,6 (56,1 – 61,4)	4,5 (4,5 – 4,8)*	14,3 (14,0 – 15,7)
S-2 + Co-АГ (n = 7)	88,5 (85,4 – 96,6)**	11,5 (3,4 – 14,5)**	69,3 (51,4 – 72,9)**	10,6 (4,5 – 15,3)**	16,8 (15,4 – 19,3)**	1,1 (0,4 – 2,1)**
Контроль (n = 7)	23,6 (22,2 – 32,1)	76,4 (67,9 – 77,8)	18,2 (16,1 – 24,1)	60,8 (53,5 – 61,8)	5,4 (4,7 – 6,9)	13,9 (13,2 – 14,7)

Примечание: *P < 0,05; **P < 0,01 по сравнению с контролем.

Рисунок 1.
Уровень экспрессии раннего маркера активации (CD25) T-хелперами (Ме, %)

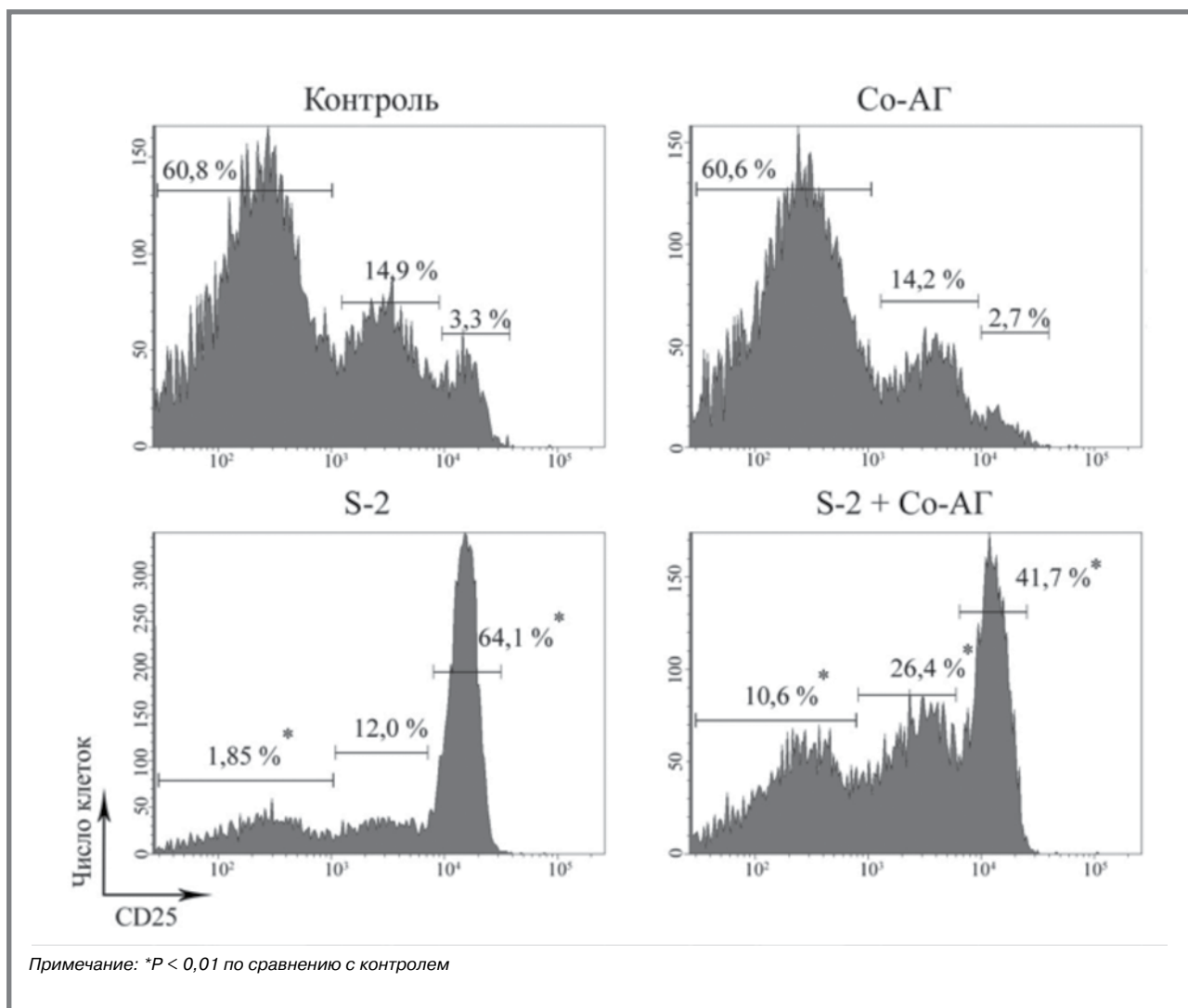


Таблица 2.

Характеристика жизнеспособности клеток крови, примированных антигенными препаратами (Ме (Q1 – Q3))

Препарат	Показатель, %		
	AnV ⁺ 7-AAD ⁺	AnV ⁻ 7-AAD ⁻	AnV ⁻ 7-AAD ⁺
S-2	97,7 (95,2 – 99,2)*	2,2 (0,4 – 2,7)*	0,5 (0,2 – 1,1)*
Со-АГ	22,0 (20,0 – 25,7)	65,9 (63,7 – 67,3)	9,3 (8,4 – 11,7)
S-2 + Со-АГ	89,8 (87,4 – 96,3)*	5,1 (2,0 – 8,1)*	0,7 (0,6 – 0,8)*
Контроль	23,2 (21,5 – 32,1)	65,1 (58,2 – 66,3)	10,4 (9,4 – 12,4)

Примечание: *P < 0,01 по сравнению с контролем.

способных CD25⁺ Т-лимфоцитов и их субпопуляций (P < 0,01). Вместе с тем установлено повышение содержания клеток CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD8⁺CD25⁺ и CD3⁺CD4⁺CD25^{высокий} на стадии позднего апоптоза в 4, 3 и 20 раз соответственно по сравнению с контролем (20,6 (18,4 – 28,9); 4,5 (4,2 – 6,1); 3,2 (2,1 – 4,3); P < 0,01). Результаты исследования показали, что препараты S-2 и S-2 + Со-АГ не влияют на содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{низкий} AnV⁺7-AAD⁺. Установлено, что Со-АГ не оказывает действие на процесс апоптоза клеток крови экспериментальных животных.

Корреляционный анализ показал наличие общих связей CD3⁺CD25⁺, примированных S-2 и S-2 + Со-АГ, с CD3⁺AnV⁺7-AAD⁻ (rs = -0,89, P < 0,01), с CD3⁺CD4⁺AnV⁻7-AAD⁻ (rs = -0,94, P < 0,01), с CD3⁺CD4⁺ AnV⁺7-AAD⁻ (rs = -0,77, P < 0,05), а также индивидуальных корреляций при взаимодействии S-2 с CD3⁺CD8⁺ AnV⁻7-AAD⁻ (rs = -0,84, P < 0,05) и при S2 + Со-АГ – с CD3⁺CD4⁺AnV⁺7-AAD⁺ (rs = 0,96, P < 0,01), CD3⁺CD8⁺AnV⁺7-AAD⁻ (rs = -0,78, P < 0,01), CD3⁺AnV⁺7-AAD⁺ (rs = 0,96, P < 0,01), CD3⁺AnV⁻7-AAD⁻ (rs = 0,96, P < 0,01). У клеток крови, примированных Со-АГ, отмечены две корреляции: CD3⁺CD25⁺ с CD3⁺AnV⁺7-AAD⁺ и с CD3⁺CD4⁺AnV⁺7-AAD⁺ (rs = 0,96, P < 0,01).

Известно, что суть иммунной реакции на антиген заключается в пролиферации и дифференцировке эффекторных лимфоцитов. Кроме того, не вызывает сомнения тот факт, что при иммунном ответе макроорганизма процессы пролиферации и апоптоза клеток тесно взаимосвязаны. Апоптозу эффекторных клеток, в частности

Т-лимфоцитов, отводится особая роль в механизмах сохранения клеточного баланса и иммунорегуляции посредством снижения числа реактивных клеток [14, 15].

Таким образом, изучение нарушения асимметрии мембранных фосфолипидов клеток крови и экспрессии маркеров активации под действием антигенных препаратов S-2 и S-2 + Со-АГ с помощью цитофлуориметрического теста позволяет оценить взаимосвязь между процессами пролиферации и активации апоптоза клеток.

Выводы

1. Показано, что в условиях *in vitro* экспериментальные препараты S-2 и S-2 + Со-АГ повышают пролиферативную и функциональную активность лимфоцитов, что подтверждается повышением экспрессии CD25⁺ на иммунокомпетентных клетках крови экспериментальных животных.
2. Со-АГ оказывает влияние на иммунологическую эффективность антигенного препарата S-2, что может указывать на перспективность использования его в качестве адъюванта при конструировании химических вакцин.

Настоящая работа является одним из этапов комплексного исследования иммуногенных свойств антигенного препарата S-2 вакцинного штамма *B. anthracis* 34F₂ Sterne и его сочетания с Со-АГ, которые могут рассматриваться в качестве перспективных компонентов химических сибиреязвенных вакцин.

Литература

1. Микшис Н.И., Попов Ю.А., Кутырев В.В. Современные представления о факторах патогенности и иммуногенности возбудителя сибирской язвы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 3: 96 – 101.
2. Микшис Н.И. Прототипы сибиреязвенных вакцин на основе генно-инженерных бациллярных штаммов и синтезируемых ими антигенов : автореф. дис. ... докт. мед. наук. Саратов; 2009: 47.
3. Glomski I.J., Corre J.P., Mock M., Goolssens P.L. Cutting Edge: IFN-gamma-producing CD4 T-lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *B. anthracis*. J. Immunol. 2007; 178: 2646 – 2650.
4. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хаитов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. Иммунология. 2009; 6: 324 – 335.
5. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения. Иммунология. 2000; 5: 4 – 7.
6. Дубровина В.И., Витязева С.А., Коновалова Ж.А., Старовойтова Т.П., Мухтургин Г.Б., Сухов Б.Г. и др. Сравнительная характеристика действия наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-триазола, аргентогалактоманна и кобальтарабиногалактана на иммунную реакцию экспериментальных животных. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012; 3 (12): 31 – 38.

7. Коновалова Ж.А., Дубровина В.И., Витязева С.А., Лукьянова С.В., Войткова В.В., Александрова Г.П. и др. Влияние наноструктурированных аргенто-1-винил-1,2,4-триазола, кобальтарабиногалактана и аргентогалактоманна на антимикробные факторы иммунитета. Фундаментальные и прикладные аспекты анализа риска здоровью населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцева, ред. Пермь: Книжный формат, 2012; 1: 305 – 308.
8. Коновалова Ж.А., Витязева С.А., Кравец Е.В., Лукьянова С.В., Ястремская К.Ю., Дубровина В.И. Иммуногенные свойства экспериментальных антигенных препаратов *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne. Актуальные проблемы профилактической медицины, среды обитания и здоровья населения: Матер. Всеросс. научн.-практ. конф. молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора, Уфа, 25 – 27 сентября 2013 г. Уфа, 2013; 2: 304 – 307.
9. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И. Сравнительная характеристика иммунного ответа макроорганизма при пероральном и парентеральном введении металлосодержащего нанобиокомпозиата. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012; 2 (84): 114 – 117.
10. Войткова В.В. Изучение апоптоза клеток макроорганизма методом проточной цитофлуориметрии. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2010; 6 (1): 220 – 226.
11. Gerke V., Moss S. E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 331 – 371.
12. Александрова Г.П., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. Способ получения наноразмерных металлических и металлоксидных частиц. Патент РФ, № 2260500; 2005.
13. Войткова В.В., Дубровина В.И., Колесникова О.Б., Коновалова Ж.А., Лукьянова С.В., Бельков А.И. Выявление фосфатидилсерина на лимфоцитах крови мышей с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto™ II. Метод. рекомендации. Иркутский НИ противочум. ин-т Сибири и ДВ. Иркутск, 2010: 16.
14. Grunov K., Spletstoesser W. Apoptosis versus necrosis of host cells after infection with *Francisella tularensis*. The 3rd Intern. conf. on tularemia. Ume. . 2000: 53.
15. Budd R.C. Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13 (3): 356 – 362.

References

1. Mikshis N.I., Popov Yu.A., Kutryev V.V. Modern conceptions about pathogenicity and immunogenicity factors of the anthrax causative agent. *Zhurn. mikrobiol., epidemiol. and immunobiol.* 2010; 3: 96 – 101 (in Russian).
2. Mikshis N.I. Prototypes of anthrax vaccines on the basis of genetic-engineering bacillary strains and the synthesized antigens: abstract of a thesis ... Doctor of Med. sciences. Saratov, 2009: 47 (in Russian).
3. Glomski I.J., Corre J.P., Mock M., Goolssens P.L. Cutting Edge: IFN-gamma-producing CD4 T-lymphocytes mediate spore-induced immunity to capsulated *B. anthracis*. *J. Immunol.* 2007; 178: 2646 – 2650.
4. Semenov B.F., Zverev V.V., Haitov R.M. Forecast of vaccinal prevention development in the first decades of the XXI century. *Immunologia.* 2009; 6: 324 – 35 (in Russian).
5. Haitov R.M., Pinegin B.V. Current immunomodulators: main principles of its application. *Immunologia.* 2000; 5: 4 – 7 (in Russian).
6. Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., Konovalova Zh.A., Starovoitova T.P., Mukhturgin G.B., Suhov B.G. et al. Comparative characteristic of nanostructured argento-1-vinyl-1,2,4-triazol, argentogalactomannan and cobaltarabinogalactane action to immune reaction of experimental animals. *Nanotekhnologii i okhrana zdoroviya.* 2012; 3(12): 31 – 38 (in Russian).
7. Konovalova Zh.A., Dubrovina V.I., Vityazeva S.A., Lukyanova S.V., Voitkova V.V., Aleksandrova G.P. et al. Influence of nanostructured argento-1-vinyl-1,2,4-triazol, cobaltarabinogalactane and argentogalactomannan on antimicrobial factors of immunity. *Fundamental and Applied Aspects of the Risk Analysis to population health: Materials of the All-Russian Scientific-Practical Conference of Young Scientists and Experts of of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance: in 2 Volumes.* Ed: G.G. Onishchenko, N.V. Zaitseva. Perm: Book format, 2012; 1: 305 – 308 (in Russian).
8. Konovalova Zh.A., Vityazeva S.A., Kravets E.V., Lukyanova S.V., Yastremskaya K.Yu., Dubrovina V.I. Immunogenic properties of experimental antigen preparations of *Bacillus anthracis* 34F₂ Sterne. *Actual Problems of Preventive Medicine, Inhabitancy and Population Health: Materials of All-Russian Scientific-Practical Conference of Young Scientists and Experts of the Research Institutions of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, Ufa, September 25 – 27, 2013.* Ufa. 2013; 2: 304 – 307 (in Russian).
9. Vityazeva S.A., Starovoitova T.P., Dubrovina V.I. Comparative characteristic of a macroorganism immune response at oral and parenteral injection of metal-containing nanobiocomposite. *Bulletin of the East-Siberian Centre of Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Med. Sciences.* 2012; 2 (84): 114 – 117 (in Russian).
10. Voitkova V.V. Studying of macroorganism cell apoptosis by flow cytometric method. *Bulletin of the East-Siberian Centre of Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Med. Sciences.* 2010; 6 (1): 220 – 226 (in Russian).
11. Gerke V., Moss S.E. Annexins: from structure to function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 331 – 371.
12. Aleksandrova G.P., Medvedeva S.A., Grishchenko L.A., Suhov B.G., Trofimov B.A. A method of preparation of nanodimensional metal and metaloxide particles. Patent of the Russian Federation. № 2260500; 2005 (in Russian).
13. Voitkova V.V., Dubrovina V.I., Kolesnikova O.B., Konovalova Zh.A., Lukyanova S.V., Belkov A.I. Detection of phosphatidyl serine on mice blood lymphocytes by flow cytofluorimeter BD FACSCanto™ II: methodical recommendations. *Irkutsk Antiplague Institute of Siberia and Far East.* Irkutsk, 2010: 16 (in Russian).
14. Grunov K., Spletstoesser W. Apoptosis versus necrosis of host cells after infection with *Francisella tularensis*. The 3rd intern. conf. on tularemia. Ume, 2000: 53.
15. Budd R.C. Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13 (3): 356 – 362.

ПОЗДРАВЛЯЕМ
с награждением дипломом Национальной премии
лучшим врачам России «ПРИЗВАНИЕ»
в номинации «Специальная премия врачам,
оказывающим помощь пострадавшим во время войн,
террористических актов и стихийных бедствий»
сотрудников Иркутского противочумного института:
зав. отделом эпидемиологии к.м.н. С.А. КОСИЛКО,
зав. отделом зоонозных инфекций к.м.н. Л.М. МИХАЙЛОВА,
ведущих научных сотрудников отдела эпидемиологии
к.м.н. А.К. НОСКОВА и к.б.н. М.В. АФАНАСЬЕВА

Оценка иммуномодулирующих свойств субклеточных фракций чумного микроба в сочетании с адъювантами

В.В. Войткова, В.И. Дубровина (dubrovina-valya@mail.ru), С.А. Витязева, В.С. Половинкина, Е.Ю. Марков, С.В. Балахонов

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Резюме

В работе представлены данные о действии субклеточных фракций чумного микроба, а также их сочетания с тотальной ДНК *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и мурамилдипептидом на гематологические показатели экспериментальных животных. Показано способность экспериментальных препаратов активировать врожденный иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма, что указывает на перспективность их использования при создании безопасной и эффективной вакцины против чумы.

Ключевые слова: субпопуляционный состав, *Yersinia pestis*, F1-антиген, мурамил-дипептид, ДНК

Assessment of Immunomodulating Properties of *Yersinia Pestis* Subcellular Fractions In Combination with Adjuvants

V.V. Voytkova, V.I. Dubrovina (dubrovina-valya@mail.ru), S.A. Vityazeva, V.S. Polovinkina, E.Yu. Markov, S.V. Balakhonov
Federal State Institution of Public Health «Irkutsk Antiplague Research Institute» of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance

Abstract

Data on the effect of subcellular fractions of the plague microbe and its combined application with total DNA of *Yersinia pestis* EV НИИЭГ and muramyl dipeptide to hematologic parameters of the experimental animals are represented. It is shown that experimental preparations activate the innate immunity and stimulate the formation of adaptive immune response of the organism. These data indicate the perspectives of its application as a candidate for development of a safe and effective vaccine against plague.

Key words: subpopulation structure, *Yersinia pestis*, F1-antigen, muramyl dipeptide, DNA

Введение

Несмотря на большие достижения в борьбе с чумой, проблема специфической профилактики этой инфекции по-прежнему актуальна и требует всестороннего изучения механизмов взаимодействия как самого патогена, так и его антигенов с макроорганизмом [1 – 3].

В настоящее время особое внимание уделяется разработке и внедрению в практику химической вакцины, которая бы характеризовалась иммунологической и эпидемиологической эффективностью не только после ревакцинации, но и после первичной иммунизации. Перспективными в этом плане считаются обладающие иммуногенностью поверхностные антигены *Yersinia pestis*: фракция 1 (F1-антиген), липополисахарид, пептидогликан и др. [2 – 5].

Известно, что бактериальная ДНК и мурамилдипептид (МДП) входят в число патоген-ассоциированных молекулярных структур, способных активировать механизмы иммунологической защиты организма, в связи с чем изучение антигенов *Y. pestis* в сочетании с адъювантами является актуальным направлением в разработке препаратов специфической защиты [3, 6].

Цель исследования – изучить влияние субклеточных фракций чумного микроба и адъювантов на функциональное состояние и субпопуляционный состав клеток крови белых мышей.

Материалы и методы

В работе использовали 150 сертифицированных (НПО «Вектор», г. Новосибирск) беспородных белых мышей, стандартных по условиям содержания и массе (15 – 20 г).

Объектом исследования служили F1-антиген и клеточные оболочки (КО) *Y. pestis* EV НИИЭГ (Музей живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института). Антигенный комплекс (F1 + КО) получали по ранее описанным методикам [7]. В качестве адъювантов использовали синтетический мурамилдипептид (МДП, Calbiochem, США) и тотальную ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ (тДНК), полученную по методу В.И. Нактиниса и соавт. [8].

Подопытным животным подкожно вводили следующие препараты: в группе 1 – F1 + КО (12,5 мкг/0,2 мл забуференного физиологического раствора – ЗФР), в группе 2 – F1 + КО + тДНК *Y. pestis*

(по 12,5 мкг + 10 мкг/0,2 мл ЗФР) и в группе 3 – F1 + КО + МДП (по 12,5 мкг + 10 мкг/0,2 мл ЗФР).

Контрольную группу составляли белые мыши, получившие ЗФР в объеме 0,2 мл (группа 4).

Учет результатов проводили на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки. Животных выводили из эксперимента в соответствии с требованиями Приказа МЗ СССР от 12 августа 1977 года № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

Субпопуляционный состав клеток крови мышей определяли методом шестипараметрического фенотипирования с использованием реагентов фирмы Becton Dickinson (США): CD45-PE-Cy5, CD3-FITC, CD4-Alexa-700, CD8-APC-Cy7 и CD25-PE-Cy7. Анализ окрашенных образцов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) в программе BD Diva 6.0. В каждой пробе анализировалось 10 000 учтенных CD45⁺-клеток, которые выделяли на графике SSC/CD45. Оценивали содержание – абсолютное ($\times 10^9$ /л) и относительное (%) – лейкоцитов основных популяций: эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. В лимфоцитарном гейте определяли содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺). Кроме показателей, перечисленных выше, оценивали процент клеток, экспрессирующих ранний маркер активации CD25⁺ (CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺, CD3⁺CD8⁺CD25⁺, а также моноцитов, экспрессирующих CD25).

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартного пакета прикладных программ Statistica, версия 6.1 (© StatSoft, Inc. 19842001, ИПЧИ 31415926535897). При анализе данных с помощью критерия Колмогорова–Смирнова установлено распределение, отличное от нормального ($P > 0,05$). Статистический анализ данных осуществляли с использованием непараметриче-

ского U-критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s). Данные представлены в виде медианы, верхнего (75%-го) и нижнего (75%-го) квартилей (Me (Q1 – Q3)) из $n = 7$. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что показатели абсолютного содержания лейкоцитов у экспериментальных животных, иммунизированных F1 + КО, F1 + КО + тДНК и F1 + КО + МДП, находились в пределах допустимых значений физиологической нормы (от 5,1 до $11,6 \times 10^9$ кл./л), кроме группы мышей, получивших F1 + КО, у которых на 3-и сутки отмечалась лейкопения (табл. 1), обусловленная снижением абсолютного содержания эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов и их субпопуляций, что может быть связано с интенсивной миграцией этих клеток в очаг воспаления (табл. 2). На фоне перераспределения лейкоцитов у мышей группы 1 наблюдалось увеличение процентного содержания общей популяции гранулоцитов за счет нейтрофилов. Восстановление пула циркулирующих лейкоцитов и их популяций к 7-м суткам свидетельствует о мобилизации клеток костномозгового резерва, тем не менее выявлены снижение концентрации CD3⁺-клеток и увеличение концентрации нейтрофилов.

Установлено, что изменение состава клеток крови экспериментальных животных зависит от введенного препарата и сроков наблюдения (см. табл. 2, 3). Так, при анализе лейкоцитограммы у мышей 2-й группы на 3-и сутки наблюдения выявлена абсолютная моноцитопения, что обусловлено миграцией этих клеток в очаг воспаления. Достоверное увеличение абсолютного и относительного содержания циркулирующих моноцитов отмечено на 14-е и 21-е сутки у мышей групп 1 и 2, а у мышей группы 3 – на 7-е и 14-е сутки.

Таблица 1.
Показатели содержания лейкоцитов в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, Me (Q1 – Q3)

Срок наблюдения, сутки	Препарат			Контроль
	F1 + КО	F1 + КО + тДНК	F1 + КО + МДП	
3	3,0 (2,8 – 4,4)*	5,1 (4,5 – 5,7)	5,4 (4,2 – 7,8)	5,5 (4,8 – 6,7)
	7	6,4 (5,7 – 7,4)	5,4 (4,9 – 5,5)	
14		5,0 (4,8 – 5,3)	5,4 (4,7 – 7,9)	
	21	5,7 (5,3 – 5,7)	6,4 (6,3 – 7,3)	

Примечание: * $P < 0,01$ по сравнению с контролем

Таблица 2.
Показатели содержания популяций лейкоцитов в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, Ме (Q1-Q3)

Иммунизирующий препарат	Срок наблюдения, сутки	Ед. измер.	Показатель			
			моноциты	общее содержание гранулоцитов	нейтрофильные гранулоциты	лимфоциты
F1 + КО (n = 7)	3	%	3,0 (1,9 – 3,5)	33,3 (27,2 – 34,2)***	31,3 (25,1 – 33,2)***	58,1 (56,2 – 61,1)**
		10 ⁹ /л	0,08 (0,07 – 0,93)**	1,03 (0,94 – 1,42)	0,99 (0,88 – 1,31)	1,64 (1,53 – 2,26)**
	7	%	4,2 (3,8 – 4,9)	23,0 (18,8 – 23,9)	18,3 (17,1 – 20,8)	68,8 (66,6 – 72,8)
		10 ⁹ /л	0,27 (0,24 – 0,39)*	1,39 (1,19 – 1,88)*	1,31 (1,06 – 1,49)*	4,93 (4,17 – 5,28)*
	14	%	7,3 (5,6 – 7,8)***	25,3 (23,5 – 30,5)*	21,7 (20,7 – 23,9)*	61,9 (57,12 – 66,0)*
		10 ⁹ /л	0,31 (0,28 – 0,37)**	1,24 (1,12 – 1,46)	1,12 (0,85 – 1,21)*	2,81 (2,60 – 3,32)**
21	%	5,1 (4,5 – 6,2)**	26,6 (21,9 – 28,7)*	21,1 (18,7 – 27,4)*	66,3 (63,2 – 72,1)	
	10 ⁹ /л	0,33 (0,13 – 0,36)**	1,40 (1,12 – 1,83)*	1,30 (0,95 – 1,69)**	3,45 (3,42 – 3,90)	
F1 + КО + тДНК (n = 7)	3	%	1,3 (1,2 – 1,4)**	18,3 (13,9 – 19,9)	14,4 (11,3 – 17,9)	77,7 (75,1 – 80,7)
		10 ⁹ /л	0,07 (0,05 – 0,13)**	1,25 (0,71 – 1,27)	1,06 (0,64 – 1,13)	3,71 (3,11 – 4,65)
	7	%	3,1 (2,9 – 3,4)	26,7 (19,3 – 30,5)**	21,9 (14,8 – 27,9)*	69,5 (59,6 – 75,2)
		10 ⁹ /л	0,30 (0,16 – 0,34)	1,57 (1,34 – 1,81)*	1,46 (1,11 – 1,77)**	4,02 (2,94 – 4,67)
	14	%	5,1 (3,6 – 7,1)**	24,2 (21,5 – 30,7)*	19,6 (16,1 – 29,3)	64,6 (63,5 – 67,1)
		10 ⁹ /л	0,31 (0,27 – 0,62)*	1,44 (1,06 – 1,71)*	1,21 (0,8 – 1,4)	3,32 (2,68 – 4,46)
21	%	6,5 (5,7 – 6,7)***	23,1 (18,6 – 23,7)	20,6 (17,0 – 21,5)	69,2 (68,7 – 69,9)	
	10 ⁹ /л	0,25 (0,15 – 0,43)**	1,20 (1,02 – 1,31)	1,06 (0,99 – 1,09)	3,96 (2,80 – 4,36)	
F1 + КО + МДП (n = 7)	3	%	2,6 (2,5 – 2,9)	24,1 (21,8 – 26,3)*	20,9 (18,3 – 23,6)	69,5 (67,7 – 72,4)
		10 ⁹ /л	0,18 (0,14 – 0,25)	1,48 (1,01 – 1,95)*	1,29 (0,87 – 1,70)*	3,80 (2,77 – 4,70)
	7	%	5,2 (4,2 – 5,8)*	20,3 (16,8 – 22,7)	17,9 (14,6 – 20,7)	71,9 (70,9 – 75,9)
		10 ⁹ /л	0,24 (0,17 – 0,29)*	0,83 (0,65 – 1,22)	0,73 (0,57 – 1,12)	3,17 (2,98 – 3,95)
	14	%	4,6 (4,3 – 5,0)*	21,9 (19,5 – 23,7)	19,8 (17,1 – 22,1)	69,1 (66,2 – 71,4)
		10 ⁹ /л	0,53 (0,44 – 0,74)**	1,70 (0,73 – 2,01)*	1,69 (1,10 – 2,52)**	4,32 (3,49 – 5,81)
21	%	3,0 (2,6 – 5,5)	22,7 (15,9 – 24,2)	17,3 (14,6 – 22,9)	66,6 (60,9 – 75,0)	
	10 ⁹ /л	0,18 (0,12 – 0,25)	0,82 (0,73 – 1,54)	0,69 (0,67 – 1,47)	3,45 (2,53 – 3,53)	
Контроль (n = 12)	%	3,8 (2,4 – 5,0)	18,9 (15,7 – 25,7)	15,8 (14,5 – 21,2)	73,6 (66,5 – 76,9)	
	10 ⁹ /л	0,16 (0,11 – 0,29)	0,99 (0,84 – 1,31)	0,83 (0,73 – 1,09)	4,14 (3,35 – 4,58)	

Примечание: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 по сравнению с контролем.

Следует отметить, что у животных, иммунизированных F1 + КО, на 14-е сутки выявлены умеренный абсолютный нейтрофилез и лимфопения. Установлено достоверное повышение как абсолютного, так и относительного содержания нейтрофильных гранулоцитов у экспериментальных животных групп 1 и 2: у мышей, получивших препарат F1 + КО + МДП, выявлено увеличение числа циркулирующих нейтрофилов на 3-и и 14-е сутки (см. табл. 2). Следует отметить, что наиболее выраженные изменения содержания этих клеток имели место у мышей, иммунизированных F1 + КО.

При анализе динамики субпопуляционного состава лимфоцитов крови мышей, иммунизированных F1 + КО + тДНК и F1 + КО + МДП, на 3-и, 7-е и 21-е сутки зарегистрировано увеличение относительного числа Т-лимфоцитов (табл. 3). Установлено, что сочетанное применение препарата F1 + КО с тДНК или МДП приводит к существенному перераспределению Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (см. табл. 3). Тем не менее в случае применения тДНК отмечается рост относительно содержания CD8⁺-лимфоцитов во все сроки наблюдения, в то время как у мышей группы 3 –

Таблица 3.

Показатели содержания Т-лимфоцитов и их субпопуляций в крови мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, Ме (Q1 – Q3)

Иммунизирующий препарат	Срок наблюдения, сутки	Ед. измер.	Показатель		
			Т-лимфоциты (CD3 ⁺)	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺)
F1 + КО (n = 7)	3	%	66,4 (62,9 – 72,5)**	55,0 (50,5 – 59,9)*	11,4 (10,5 – 13,8)
		10 ⁹ /л	1,11 (0,99 – 1,49)**	0,90 (0,78 – 1,11)**	0,20 (0,16 – 0,31)**
	7	%	55,6 (42,6 – 57,1)*	39,79 (30,2 – 42,0)	11,7 (9,2 – 13,8)
		10 ⁹ /л	2,25 (1,92 – 2,91)	1,62 (1,52 – 2,19)	0,50 (0,35 – 0,61)
	14	%	56,7 (55,8 – 64,2)	42,2 (38,7 – 50,7)	10,9 (9,4 – 11,3)
		10 ⁹ /л	1,74 (1,58 – 1,84)**	1,33 (1,20 – 1,45)*	0,30 (0,24 – 0,31)*
21	%	59,3 (52,1 – 65,8)	44,9 (42,2 – 48,2)	10,9 (8,9 – 16,4)	
	10 ⁹ /л	2,09 (2,03 – 2,90)	1,65 (1,52 – 2,00)	0,41 (0,34 – 0,46)	
F1 + КО + тДНК (n = 7)	3	%	74,6 (73,0 – 75,9)**	56,3 (52,3 – 58,5)**	15,6 (14,9 – 18,0)**
		10 ⁹ /л	3,07 (2,36 – 3,44)*	1,99 (1,64 – 2,59)	0,61 (0,60 – 0,70)*
	7	%	67,2 (62,3 – 76,2)**	53,3 (46,9 – 59,9)*	14,3 (14,0 – 16,4)**
		10 ⁹ /л	2,67 (2,03 – 3,49)	2,13 (1,49 – 2,69)*	0,67 (0,47 – 0,72)*
	14	%	64,8 (58,1 – 71,2)	48,8 (43,9 – 58,9)	13,4 (10,5 – 16,0)*
		10 ⁹ /л	2,50 (1,84 – 3,48)	1,95 (1,33 – 2,57)	0,46 (0,42 – 0,63)*
21	%	73,4 (68,1 – 78,4)**	56,8 (49,1 – 57,6)*	15,0 (13,7 – 15,0)**	
	10 ⁹ /л	2,35 (2,20 – 2,70)	1,76 (1,65 – 1,82)	0,44 (0,42 – 0,60)	
F1 + КО + МДП (n = 7)	3	%	67,5 (66,2 – 69,1)**	50,4 (49,6 – 51,9)	13,6 (13,1 – 14,7)**
		10 ⁹ /л	2,63 (2,01 – 3,89)	1,95 (1,51 – 2,93)	0,57 (0,40 – 0,82)*
	7	%	81,2 (75,2 – 81,3)**	60,1 (55,7 – 67,2)**	16,3 (12,9 – 20,9)**
		10 ⁹ /л	2,25 (1,84 – 3,13)	1,89 (1,42 – 2,46)	0,36 (0,29 – 0,55)
	14	%	63,7 (56,9 – 69,9)	47,8 (39,8 – 53,1)	13,1 (11,6 – 14,3)*
		10 ⁹ /л	5,07 (3,13 – 5,86)**	2,61 (2,31 – 2,98)**	0,67 (0,65 – 0,83)**
21	%	71,2 (63,1 – 72,4)**	55,6 (49,7 – 59,6)*	11,0 (9,5 – 14,6)	
	10 ⁹ /л	1,81 (1,10 – 2,18)	1,71 (1,51 – 2,05)	0,24 (0,22 – 0,38)**	
Контроль (n = 12)		%	58,7 (48,1 – 64,1)	47,0 (36,8 – 50,6)	10,1 (8,4 – 11,7)
		10 ⁹ /л	2,22 (1,9 – 2,7)	1,76 (1,52 – 2,36)	0,41 (0,32 – 0,49)

Примечание: *P < 0,05, **P < 0,01 по сравнению с контролем.

на 3-и и 7-е сутки. тДНК или МДП также способствуют увеличению относительного содержания Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) на 7-е и 21-е сутки. Обращает на себя внимание тот факт, что у мышей группы 3 на 14-е сутки наблюдалось значительное увеличение абсолютного числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций (P < 0,01) без изменения процента их содержания.

Установлено увеличение относительного количественного числа клеток-предшественников кортикальных тимоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁺)

во всех экспериментальных группах на 3-и, 7-е и 14-е сутки наблюдения, а в группах 2 и 3 – на 21-е сутки в среднем в два раза по сравнению с контролем (0,26 (0,16 – 0,33), P < 0,05). Показано достоверное (P < 0,01) увеличение содержания CD3⁺CD4⁺CD8⁺-клеток на 3-и и 14-е сутки в случае сочетанного применения F1 + КО с МДП или тДНК.

Для оценки степени активации Т-лимфоцитов и моноцитов нами был проведен анализ экспрессии высокоаффинного рецептора IL-2 (CD25), кото-

рый отражает способность клеток к пролиферации и дифференцировке [9, 10]. Увеличение численности активированных Т-лимфоцитов, в частности Т-хелперов, имело место на 3-и, 14-е и 21-е сутки у мышей всех экспериментальных групп. Следует отметить, что препарат F1 + КО как *per se*, так и в сочетании с тДНК активирует CD3⁺-клетки в большей степени ($P < 0,05$), чем F1 + КО + МДП. Существенное возрастание числа активированных CD3⁺CD8⁺-клеток у мышей, получивших F1 + КО и F1 + КО + тДНК, выявлено на 21-е сутки, в то время как F1 + КО + МДП не оказывает влияния на экспрессию CD25 цитотоксическими Т-лимфоцитами.

При анализе уровня экспрессии CD25 моноцитами/макрофагами крови установлено, что сочетанное применение препарата F1 + КО с тДНК или МДП приводит к снижению их содержания в ранние сроки наблюдения (3-и сутки) по сравнению с контролем ($P < 0,01$).

Корреляционный анализ показал взаимосвязь количества лейкоцитов с моноцитами ($r_s = 0,61$, $P = 0,003$), нейтрофилами ($r_s = 0,64$, $P = 0,001$), эозинофилами ($r_s = 0,56$, $P = 0,01$) и лимфоцитами ($r_s = 0,98$, $P = 0,0001$), а также Т-лимфоцитами ($r_s = 0,87$, $P = 0,0001$), Т-хелперами ($r_s = 0,88$, $P = 0,0001$), CD3⁺CD4⁺CD8⁺ ($r_s = 0,50$, $P = 0,02$) и CD3⁺CD4⁺CD8⁻ ($r_s = 0,65$, $P = 0,0008$) у экспериментальных животных, получивших F1 + КО. Следует отметить, что у мышей группы 2 количественный показатель лейкоцитов крови коррелирует только с содержанием лимфоцитов ($r_s = 0,51$, $P = 0,02$), а у мышей группы 3 – с содержанием нейтрофилов ($r_s = 0,67$, $P = 0,008$), лимфоцитов ($r_s = 0,75$, $P = 0,003$), Т-лимфоцитов ($r_s = 0,61$, $P = 0,02$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($r_s = 0,61$, $P = 0,001$) и CD3⁺CD4⁺CD8⁻ ($r_s = 0,56$, $P = 0,001$). При анализе взаимосвязей между субпопуляциями лимфоцитов установлены прямые корреляционные связи относительных количественных показателей Т-лимфоцитов с CD3⁺CD4⁺ ($r_s = 0,94$; 0,90 и 0,91, $P = 0,0001$) и CD3⁺CD8⁺-клетками ($r_s = 0,51$; 0,45 и 0,56, $P < 0,05$) у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, а также абсолютных значений CD3⁺ – CD3⁺CD4⁺ ($r_s = 0,96$; 0,89 и 0,96, $P = 0,0001$) и CD3⁺ – CD3⁺CD8⁺-клетками ($r_s = 0,90$; 0,67 и 0,81, $P < 0,001$) и CD3⁺CD4⁺ – CD3⁺CD8⁺ ($r_s = 0,82$; 0,79 и 0,74, $P < 0,001$).

У мышей, иммунизированных F1 + КО в сочетании с тДНК, зарегистрирована также корреляция содержания моноцитов, экспрессирующих CD25, с нейтрофилами ($r_s = 0,52$, $P = 0,01$ и $r_s = 0,56$, $P = 0,008$ соответственно).

Интересен факт, что у мышей группы 2 выявлена корреляционная связь нейтрофилов с CD3⁺CD4⁺CD25⁺ ($r_s = -0,45$, $P = 0,04$) и CD3⁺CD25⁺ ($r_s = -0,52$, $P = 0,01$), а группы 3 – с CD3⁺CD8⁺CD25⁺ ($r_s = -0,62$, $P = 0,02$), в то время как у мышей, получивших F1 + КО, подобная корреляция отсутствует.

Нами было показано наличие корреляционной связи незрелых популяций Т-лимфоцитов

(CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁺) с активированными клетками у мышей, иммунизированных F1 + КО в сочетании с МДП или тДНК. Так, содержание CD3⁺CD4⁺CD8⁻-клеток коррелирует с количеством CD3⁺CD4⁺CD25⁺-клеток (F1 + КО + тДНК: $r_s = 0,46$, $P = 0,04$ и F1 + КО + МДП: $r_s = 0,59$, $P = 0,02$), а у мышей, иммунизированных F1 + КО, содержание CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺CD8⁻ – с числом активированных моноцитов ($r_s = 0,45$, $P = 0,04$ и $r_s = 0,61$, $P = 0,01$). Показана корреляционная взаимосвязь абсолютного содержания CD3⁺CD4⁺CD8⁻-клеток с CD3⁺CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-клетками (F1 + КО – $r_s = 0,52$, $P = 0,01$ и $r_s = 0,60$, $P = 0,003$; F1 + КО + тДНК: $r_s = 0,46$, $P = 0,04$ и $r_s = 0,58$, $P = 0,01$; F1 + КО + МДП: $r_s = 0,82$, $P = 0,0001$ и $r_s = 0,72$, $P = 0,003$).

Множественные корреляционные связи между популяциями лейкоцитов у мышей, иммунизированных экспериментальными препаратами, указывают на повышение сопряженности между клетками иммунной системы и свидетельствуют об интенсивной иммунной реакции.

Таким образом, комплексный препарат на основе F1-антигена и КО, а также его сочетанное применение с тДНК или МДП способствуют пролиферации предшественников тканевых макрофагов и гранулоцитов, что согласуется с ранее полученными нами данными о стимулирующем влиянии этих компонентов на продукцию цитокинов и гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [11].

Увеличение содержания Т-хелперов, экспрессирующих CD25, при иммунизации мышей экспериментальными препаратами также указывает на повышение пролиферативной активности этих клеток. Данное обстоятельство, на наш взгляд, является важным, поскольку возбудитель чумы блокирует ключевые барьерные механизмы системы врожденного иммунитета и препятствует формированию макроорганизмом полноценного адаптивного иммунитета. При этом комплексный препарат на основе F1-антигена и клеточных оболочек в сочетании с адьювантами (тДНК чумного микроба, МДП), обладающий способностью стимулировать TLR2-, NLR2-, TLR9- и TLR4-рецепторы [11, 12] и повышать резистентность макроорганизма [13], обеспечивает целенаправленное действие на иммунную систему макроорганизма и может использоваться для создания эффективной вакцины, способной активировать врожденный иммунитет и стимулировать формирование адаптивного иммунного ответа организма.

Выводы

1. Повышение содержания незрелых популяций Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁺), а также наличие корреляционной связи этих клеток с активированными Т-лимфоцитами и моноцитами указывает на их участие в реакциях адаптивного иммунитета к экспериментальным препаратам.

2. МДП и тДНК возбудителя чумы увеличивают иммунологическую эффективность субклеточных фракций чумного микроба, что говорит о

перспективности использования этих иммуномодуляторов в качестве адъювантов при конструировании химических вакцин против чумы.

Литература

1. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование): Дис. ... д-ра. биол. наук. Иркутск; 2004: 261.
2. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Современное состояние проблемы совершенствования средств вакцинопрофилактики чумы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 2: 97 – 104.
3. Витязева С.А., Балахонов С.В., Дубровина В.И., Марков Е.Ю., Половинкина В.С. Актуальные вопросы совершенствования специфической профилактики чумы и сибирской язвы. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2013; 4: 63 – 66.
4. Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Щуковская Т.Н., Кутырев В.В. Исторические и современные представления о проблеме специфической профилактики чумы. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 3: 63 – 69.
5. Бывалов А.А., Кутырев В.В. Опыт использования антигенов *Yersinia pestis* для разработки чумной химической вакцины. Probl. osobo opasn. inf. 2010; 4: 47 – 50.
6. Марков Е. Ю., Половинкина В.С. Структура и иммуноадъювантные свойства CpG-ДНК. Медицинская иммунология. 2010; 12 (6): 469 – 476.
7. Николаев В.Б., Иванова Т.А., Половинкина В.С., Саппо С.Г., Попова Ю.О., Марков Е.Ю. и др. Способ получения иммуногенного препарата из *Yersinia pestis* EV. Патент РФ № 2248217; 2003.
8. Нактинис В.И., Малеева Н.Е., Санько Д.Ф. Два простых метода выделения ДНК из различных источников с применением цетавлона. Биохимия. 1977; 42 (10): 1783 – 1789.
9. Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. Immunobiology. 2003; 207 (2): 85 – 93.
10. Lin J., Weiss A. T cell receptor signaling. J. Cell Sei. 2001; 114: 243, 244.
11. Половинкина В.С., Корнева А.В., Козулина К.Ю., Коновалова Ж.А., Дубровина В.И. и др. Влияние субклеточных фракций чумного микроба на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками белых мышей. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2011; 3: 217 – 221.
12. Konovalova Z.A., Dubrovina V.I., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Voitkova V.V., Ivanova T.A. et al. Influence of *Yersinia pestis* subcellular fractions on functional state of bactericidal system of phagocytes *in vitro*. The International Conference "Current issues on zoonotic diseases". Ulaanbaatar, 2010: 236 – 241.
13. Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Ivanova T.A., Golubinsky E.P., Innokenteva T.I., Dubrovina V.I. et al. Protective activity of *Yersinia pestis* EV antigenic complex with the immunostimulators and combined use of doxycycline. Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci. Ulaanbaatar, 2005: 176 – 184.

References

1. Dubrovina V.I. Phagocytosis mechanisms and its role in resistance formation to *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Francisella tularensis* (experimental studying) PhD of biol. sci. diss. Irkutsk, 2004: 261 (in Russian).
2. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. Current state of problem of improving tools for plague vaccine prophylaxis. Zh. Mikrobiol., Epidemiol. and Immunobiol. 2011; 2: 97 – 104 (in Russian).
3. Vityazeva S.A., Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Markov E.Yu., Polovinkina V.S. Actual problems of plague and anthrax prevention improvement. Epidemiology & Vaccinal Prevention. 2013; 4: 63 – 66 (in Russian).
4. Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Shchukovskaya T.N., Kutyrev V.V. Historical and modern views on the problem of specific plague prophylaxis. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2013; 3: 63 – 69 (in Russian).
5. Byvalov A.A., Kutyrev V.V. The experience of application of *Yersinia pestis* antigens for plague chemical vaccine development. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 4: 47 – 50 (in Russian).
6. Markov E.Yu., Polovinkina V.S. Structure and immunoadjuvant properties of CpG-DNA. Meditsinskaya immunologia. 2010; 12 (6): 469-476 (in Russian).
7. Nikolaev V.B., Ivanova T.A., Polovinkina V.S., Sappo S.G., Popova Ju.O., Markov E.Ju. et al. Method for preparing immunogenic preparation from *Yersinia pestis* EV. Patent RF, N 2248217; 2003 (in Russian).
8. Naktinis V.I., Maleeva N.E., San'ko D.F. Two simple methods for DNA extraction from various sources using cetavone. Biokhimiya. 1977; 42 (10): 1783 – 1789 (in Russian).
9. Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. Immunobiology. 2003; 207 (2): 85 – 93.
10. Lin J., Weiss A. T cell receptor signaling. J. Cell Sei. 2001; 114: 243 – 244.
11. Polovinkina V.S., Korneva A.V., Kozulina K.Yu., Konovalova Z.A., Dubrovina V.I., Markov E.Yu. et al. Influence of *Yersinia pestis* subcellular fractions on cytokines production in immune cells of murine. Bulletin of the East-Siberian scientific center. 2011; 3: 217 – 221 (in Russian).
12. Konovalova Z.A., Dubrovina V.I., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Voitkova V.V., Ivanova T.A. et al. Influence of *Yersinia pestis* subcellular fractions on functional state of bactericidal system of phagocytes *in vitro*. The International Conference "Current issues on zoonotic diseases". Ulaanbaatar, 2010: 236 – 241.
13. Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Ivanova T.A., Golubinsky E.P., Innokenteva T.I., Dubrovina V.I. et al. Protective activity of *Yersinia pestis* EV antigenic complex with the immunostimulators and combined use of doxycycline. Scientific Journal of Center for Infectious Diseases with Natural Foci. Ulaanbaatar, 2005: 176 – 184.

ПОЗДРАВЛЯЕМ членов редсовета журнала Николая Ивановича БРИКО и Олега Ивановича КИСЕЛЕВА с присвоением им почетного звания «Заслуженный деятель науки Российской Федерации»!

УКАЗ ПРЕЗИДЕНТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ «О награждении государственными наградами Российской Федерации»

< ... > Присвоить почетные звания:

< ... > «ЗАСЛУЖЕННЫЙ ДЕЯТЕЛЬ НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

< ... > БРИКО Николаю Ивановичу – доктору медицинских наук, профессору, заведующему кафедрой государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова»

< ... > КИСЕЛЕВУ Олегу Ивановичу – доктору биологических наук, профессору, директору федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа», город Санкт-Петербург

Президент Российской Федерации В.Путин
Москва, Кремль, Указ от 2 мая 2014 года № 290

Рекомендации по вакцинации детей с хроническими заболеваниями почек¹

М.П. Костинов (vaccinums@gmail.com), А.А. Тарасова

ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАН, Москва

Резюме

Освещены особенности вакцинации детей с хронической патологией почек. Показано, каким образом схема иммунизации может быть изменена в зависимости от патологии и возраста ребенка.

Ключевые слова: иммунизация, дети с хронической патологией почек

Vaccination of Children with Chronic Kidney Diseases

M.P. Kostinov (vaccinums@gmail.com), A.A. Tarasova

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera of Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract

Recommendations highlighted features vaccination of children with chronic kidney disease. It is shown how the immunization scheme may be changed according to the pathology and the age of the child.

Key words: immunization, children with chronic kidney disease

Вакцинация против коклюша

Вакцинацию против коклюша проводят цельноклеточными и ацеллюлярными коклюшными вакцинами по истечении не менее одного месяца клинико-лабораторной ремиссии. Вторую ревакцинацию целесообразно проводить в возрасте 4 – 5 лет.

Вакцинация против дифтерии и столбняка

Вакцинацию против дифтерии и столбняка проводят аналогично иммунизации здоровых детей, по истечении не менее одного месяца клинико-лабораторной ремиссии (уровень доказательности В и С) [5]. При этом среди привитых с хронической почечной недостаточностью (ХПН) (на фоне заместительной терапии или без нее), а также реципиентов трансплантатов должен вестись мониторинг уровня антител к дифтерии и столбняку.

В случае иммунизации детей из эпидочагов дифтерии или при экстренной профилактике столбняка сроки вакцинации могут быть сокращены независимо от длительности ремиссии. В каждом конкретном случае вопрос о сроках вакцинации решают индивидуально.

После введения АДС-М-анатоксина поствакцинальный период у детей с пиелонефритом и гломерулонефритом протекал без развития серьезных осложнений [17]. Клинико-лабораторное наблюдение за привитыми показало, что введение АДС-М-анатоксина не приводило к обострению пиелонефрита или гломерулонефрита. При контрольном обследовании через 7 – 14 дней после вакцинации в 9% случаев была выявлена следовая протеинурия и в 14% – незначительная лейкоцитурия. Все изменения носили транзиторный характер и проходили без меди-

каментозной терапии. При последующем обследовании все анализы мочи были нормальными [17].

У пациентов с почечными трансплантатами после введения АДС-М-анатоксина отсутствуют неблагоприятные реакции в поствакцинальном периоде. Отрицательного влияния вакцинации на функции почек и почечного аллотрансплантата не выявлено [18].

Вакцинация против полиомиелита

Пациентам с врожденными пороками мочевыводящих путей вакцинацию проводят по истечении не менее одного месяца клинико-лабораторной ремиссии Пациентов с гломерулонефритом, хронической почечной недостаточностью, почечным трансплантатом целесообразно вакцинировать инактивированной полиомиелитной вакциной (ИПВ).

Независимо от числа прививок против полиомиелита пациентам с терминальной стадией ХПН и реципиентам почечных трансплантатов требуется ежегодный серологический мониторинг.

Вакцинировать против полиомиелита серонегативных пациентов перед пересадкой почки рекомендуется ИПВ.

Иммунизацию лиц из домашнего окружения пациентов с терминальной стадией ХПН, а также детей, получающих иммуносупрессивную терапию, также проводят ИПВ.

В работах по применению ИПВ у детей с заболеваниями почек (в том числе с гломерулонефритом) показано, что в поствакцинальном периоде не наблюдается ухудшения течения основного заболевания. Необычные реакции встречаются даже реже, чем в группе здоровых детей. Снижения функции почек не отмечается [20].

¹Продолжение. Начало мсм. № 2 (75) и 3 (76).

В тех случаях, когда иммунодепрессанты еще не назначены либо после окончания их приема прошло больше 3-х лет, можно вакцинировать и живой полиомиелитной вакциной. В таких ситуациях ее применение практически безопасно [12, 20].

Вакцинация против гемофильной инфекции типа b

Иммунизация рекомендуется всем независимо от проведения заместительной терапии, а также пациентам с трансплантацией почки. Схемы введения вакцины аналогичны применяющимся у здоровых детей. Через месяц после законченной вакцинации рекомендуется определить уровень защитных антител.

По данным зарубежных авторов, иммунизация против гемофильной инфекции типа b безопасна для пациентов, находящихся на перитонеальном диализе, с трансплантированной почкой и получающих иммуносупрессивную терапию [22].

Несмотря на проведенную вакцинацию и наличие антител в защитном титре, у детей на перитонеальном диализе, получающих заместительную терапию, может развиваться перитонит, вызванный *H. influenzae* (заболел 1 ребенок из 42 привитых) [23].

Эффективность вакцинации против гемофильной инфекции типа b требует дальнейшего изучения.

Вакцинация против гриппа

Всех пациентов с хронической патологией почек обязательно нужно ежегодно прививать против гриппа только расщепленными или субъединичными вакцинами в тех же дозах и по тем же схемам, что и здоровых лиц (уровень доказательности B) [5]. Вакцинация особенно показана следующим категориям пациентов:

- больные, имеющие различные формы ХПН, включая хронический гломерулонефрит, при клинико-лабораторной ремиссии не менее месяца (без увеличения дозы вакцины);
- пациенты с различными стадиями хронической почечной недостаточности;
- больные, получающие перитонеальный и программный гемодиализ;
- пациенты перед трансплантацией почки или с трансплантированной почкой.

В случае проведения иммуносупрессивной терапии вакцинацию проводят через 3 месяца после ее окончания.

Вакцинацию проводят осенью, а если это невозможно – в течение всего сезона гриппа, так как пик заболеваемости может приходиться на март.

Детям, находящимся на гемодиализе, требуется дополнительная защита противовирусными препаратами и ингибиторами нейроминидазы.

Лица, контактирующие с пациентами, имеющими патологию почек, также должны быть привиты против гриппа. Если пациенты получают иммуносупрессивную терапию, контактирующих с ними лиц рекомендуется прививать инактивированными вакцинами.

Пациенты с иммуносупрессией должны избегать контактов с лицами, привитыми живыми противогриппозными вакцинами, в течение 7 дней.

По данным зарубежных авторов, иммунизация против гриппа с использованием инактивированных субъединичных и расщепленных вакцин не изменяет течения основного заболевания [24 – 27].

С 1989 года авторы подавляющего большинства зарубежных рекомендаций по вакцинопрофилактике детей с хроническими заболеваниями почек, как и всех иммунокомпрометированным пациентам наряду с профилактикой пневмококковой инфекции и гепатита В настоятельно советуют проводить вакцинацию против гриппа [21, 27, 33 – 38] и сочетать ее с прививкой против пневмококковой инфекции.

Вакцинация против кори, эпидемического паротита и краснухи

Вакцинацию проводят спустя месяц клинико-лабораторной ремиссии.

Проведение гемодиализной терапии не является противопоказанием для введения живых вакцин [39]. У пациентов с хронической почечной недостаточностью после иммунизации рекомендуется проводить серологический мониторинг.

Детям с нефротической формой хронического гломерулонефрита через 4 года после второй вакцинации при длительности заболевания более 68 месяцев целесообразно проводить серологическое обследование с дополнительной вакцинацией – с учетом эпидемиологической обстановки [12].

В случае проведения трансплантации почки при титрах антител ниже защитных вакцинация рекомендуется до оперативного вмешательства.

Лица из домашнего окружения пациентов с хроническими заболеваниями почек должны быть вакцинированы против кори, эпидемического паротита и краснухи.

Корь, эпидемический паротит и краснуха являются причиной обострений почечной патологии в 4,3% случаев [40 – 43].

Вакцинация против пневмококковой инфекции

Опасность пневмококковых инфекций для пациентов с заболеваниями почек, выявлена более 20 лет назад, когда впервые была предложена их иммунизация [44]. С тех пор вопросам защиты таких пациентов от пневмококковой инфекции уделяется большое внимание [36, 45 – 52].

Пациенты с нефротическим синдромом и лица, находящиеся на гемодиализе, быстро утрачивают антитела, поэтому прививку целесообразно повторить [53]. Описаны случаи инвазивной инфекции после вакцинации пациентов со спленэктомией в анамнезе [53] и развития перитонита, вызванного серотипами пневмококка, не входящими в 14-валентную вакцину против пневмококковой инфекции [54]. С учетом этих фактов целесообразна вакцинация препаратами, включающими большее число серотипов пневмококка.

В период повышенной заболеваемости ОРВИ и гриппом, а также в условиях стационара вакцинацию против пневмококковой инфекции рекомендуется проводить под защитой иммунорегуляторного спрея [12].

Повторную вакцинацию против пневмококковой инфекции полисахаридной вакциной проводят через 3 – 5 лет после введения первой дозы [55].

Иммунизацию против пневмококковой инфекции детей с заболеваниями почек проводят давно, и неблагоприятные реакции на нее отмечаются редко.

При ревакцинации число поствакцинальных реакций может быть несколько больше, особенно при коротком интервале между прививками. Показано также, что ревакцинация не оказывает отрицательного влияния на течение основного заболевания, в том числе у реципиентов почки [58].

Несмотря на небольшое число исследований и отсутствие данных о темпах снижения поствакцинальных пневмококковых антител, ввиду особой тяжести течения пневмококковой инфекции у пациентов с заболеваниями почек им настоятельно рекомендуется проводить вакцинопрофилактику пневмококковой инфекции. В первую очередь вакцинация показана детям с нефротическим синдромом и ХПН, имеющим сопутствующую патологию – спленэктомию и бронхиальную астму [57].

Вакцинация против ветряной оспы

Вакцинация рекомендуется всем детям с хроническими заболеваниями почек, ранее не болевшим ветряной оспой, поскольку вирус ветряной оспы может вызывать поражения гломерулярного аппарата почек [40]. Введение специфического иммуноглобулина и парентеральное – ацикловира не может защитить пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию после трансплантации почки [61]. Кроме того, высокие дозы противовирусных препаратов могут нарушить функцию трансплантата.

Применение живой аттенуированной вакцины против ветряной оспы у детей с патологией почек позволяет снизить риск заболевания этой инфекцией [63, 64]. Особенно показана иммунизация детям с ХПН в терминальной стадии, если планируется трансплантация почки (уровень доказательности В) [5].

Лица из домашнего окружения пациентов с почечными трансплантатами также должны быть привиты против ветряной оспы.

Дозы и кратность введения вакцины подбирают в зависимости от уровня иммуносупрессии у пациента и в соответствии с инструкцией.

Вакцинация против ветряной оспы может быть проведена детям с хроническими заболеваниями почек и с целью постэкспозиционной профилактики [65].

Заболевают только те дети, которые после вакцинации остались серонегативными или утратили защиту. В каждом случае функция трансплантата у привитых детей не нарушалась. Умерли только непривитые против ветряной оспы дети [23, 63].

Европейское бюро ВОЗ рекомендует внедрять вакцинацию против ветряной оспы восприимчивых групп пациентов с иммунодефицитами, в том числе обусловленными иммуносупрессивной терапией, и лиц, ожидающих трансплантации.

Вакцинация против гепатита А

Вакцинация против гепатита А рекомендуется пациентам при ХПН, а также перед трансплантацией почки (уровень доказательности - С) [5]. Это связано с тем, что пациенты, получающие заместительную терапию – гемодиализ, зачастую имеют хронический гепатит В и (или) С, вследствие чего у них высок риск развития фульминантного гепатита А.

Иммунизацию пациентов с другой хронической почечной патологией при отсутствии рутинной вакцинации против гепатита А проводят по методике введения убитых вакцин при контакте с больным гепатитом А и в условиях вспышек заболевания, а также при выезде в местности с повышенной заболеваемостью гепатитом А.

Поствакцинальный период у детей и взрослых с ХПН, получающих гемодиализ, протекает аналогично таковому у здоровых [70]. Иммунизация приводит к сероконверсии практически у всех привитых с достижением защитной концентрации антител против гепатита А [114, 116]. Уровень сероконверсии и среднее геометрическое титров антител находятся в обратной пропорциональной зависимости от количества получаемых пациентом иммунодепрессантов [23, 115, 116]. Таких пациентов рекомендуется вакцинировать против вирусного гепатита А, однако полный курс вакцинации двумя дозами вакцины следует проводить до назначения иммунодепрессантов [23, 115].

Клиническая эффективность вакцинации в группе больных с патологией почек изучена недостаточно.

Вакцинация против менингококковой инфекции

Данные о безопасности вакцинации против менингококковой инфекции единичны и кардинально различаются. Так, в Великобритании анализ данных об обострениях нефротического синдрома у детей после введения конъюгированной менингококковой вакцины показал, что они случаются чаще, чем у непривитых детей ($P = 0,009$) [71]. В то же время в других работах показано, что после введения конъюгированной менингококковой вакцины в течение 6-месячного поствакцинального периода отмечено некоторое снижение относительного риска обострений нефротического синдрома (0,95) по сравнению с общей популяцией (1,05) [72].

В следующих номерах журнала будут даны рекомендации по вакцинации детей, страдающих сахарным диабетом.

(Список литературы можно получить в редакции).

1. Требования к оформлению статьи

- Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проводились исследования, заверенным подписью научного руководителя и круглой печатью учреждения.
- В начале первой страницы идут заголовки статьи, инициалы и фамилия автора, полное название учреждения, которое представляет автор, город.
- В конце статьи указываются имя и отчество автора, ученая степень, место работы, занимаемая должность, телефоны, адрес электронной почты для контактов.
- Оригинальные исследования должны иметь следующие разделы: введение (суть рассматриваемой проблемы, актуальность и цель исследования), материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы.
- Сокращения слов и аббревиатуры допускаются, только если первоначально приведено полное название.
- К статье прилагается краткое резюме и приводятся ключевые слова для индексации темы. Предоставление автором перевода резюме на английский язык обязательно.

2. Иллюстративный материал

- Таблицы и рисунки должны иметь номер (ссылка в тексте) и заголовок. Таблицы необходимо формировать, используя опцию Word «таблица» без абзаца в графе; графики представлять в программе Microsoft Excel с цифровыми данными, каждый график – в отдельном файле.
- Фотографии должны быть размером не менее 9 x 12 в формате tiff или jpeg, каждая в отдельном файле. Если есть обозначения, то их следует сделать на втором экземпляре фотографии.

3. Список литературы

- Составляется с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). В оригинальных статьях допускается цитировать не более 30 источников, в обзорах литературы – не более 60, в лекциях и других материалах – до 15. Список должен содержать, помимо основополагающих работ, публикации за последние 5 лет. Учитывая требования систем цитирования Web of Science и Scopus, необходимо после списка литературы давать References, повторив в нем все источники литературы, причем русскоязычные на латинском алфавите: автор(ы) (транслитерация), перевод названия книги или статьи на английский язык, название источника (транслитерация), выходные данные в цифровом формате, указание на язык статьи в скобках (in Russian).
- Номер ссылки идет в порядке цитирования и в квадратных скобках.
- Библиографические описания:
 - книги: авторы, город (где издана); после двоеточия название издательства; после точки с запятой год издания;
 - главы книги: авторы; название главы; после точки ставится «В кн.» или «In» и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные. Например: Мельник Г.В., Намитани Х.А., ред. Столбняк: Учебно-методическое пособие. Краснодар: Издательство КГМА; 2002. Takayama N., Minamitani M., Kondo S., Kameyama S., Nagaoka F. Tetanus antibody levels in various age groups. In: Eighth International Conference on Tetanus (Eds., G. Nistico, B. Bazzini, B. Bytchenko and R. Triaú). Rome–Milan: Pythagora Press; 1989: 361 – 364;
 - статьи из журнала: автор(ы); название статьи; название журнала; год; том, в скобках номер журнала, после двоеточия цифры первой и последней страниц. Например: Коренберг Э.И. Эрлихиозы – новая для России проблема инфекционной патологии. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1999; 4: 10 – 16. Korenberg E.I. Ehrlichiosis – a new problem for Russia infectious diseases. Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 1999; 4: 10 – 16 (in Russian);
 - материалов конференции: Коренберг Э.И. Эрлихиозы: состояние проблемы, первые итоги и перспективы изучения в России. Материалы VIII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва; 2002: 341 – 342. Korenberg E.I. Ehrlichiosis: state of the problem, the first results and prospects of studying in Russia. Proceedings of the VIII Congress of the All-Russian Society epidemiologists, microbiologists and parasitologists. Москва; 2002: 341 – 342 (in Russian);
 - автореферата диссертации: Довгалев А.С. Система мероприятий по профилактике биогельминтозов в России в современных условиях: Автореф. дис. ... д-ра (канд.) мед. наук. Москва; 1998. Dovgalev A.S. System of measures on the prophylaxis of biohelminthosis in Russia in modern terms: PhD of med. sci. diss. Moscow; 1998 (in Russian). Если кандидат, то Doctorate of med. sci. diss.
 - электронного источника: Приказ Минздрава СССР от 09.11.1981 № 1152 «О мерах по совершенствованию профилактики столбняка». Available at: <http://zakon.law7.ru/base89/part8/d89ru8939.htm>;
 - описание ГОСТа: State Standard 8.586.5–2005. Method of measurement. Measurement of flow rate and volume of liquids and gases by means of orifice devices. Moscow: Standartinform Publ., 2007;
 - описание патента: Palkin M.V. et al. The way to orient on the roll of aircraft with optical homing head. Patent RF, N 2280590; 2006 (in Russian);
 - при авторском коллективе до 6 человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах 6 первых авторов «и др.», в иностранных «et al.»; если в качестве авторов книг выступают редакторы, после фамилии следует ставить «ред.», в иностранных «ed.»

4. Ответственность автора и редакции

- Автор несет ответственность за достоверность и точность предоставленной информации, цитируемых литературных источников.
- Подпись автора под статьей, переданной в редакцию, подразумевает, что он передает журналу право на издание, гарантирует ее оригинальность, подтверждает, что она не была опубликована ранее и не передана одновременно в другое издание.
- Редакция оставляет за собой право сокращать статьи, вносить редакторскую и корректорскую правку, но публиковать обязана только после согласования с автором.
- Плата с аспирантов за публикацию рукописей не взимается.
- Редакция не отвечает за содержание рекламных материалов.

5. Технические условия оформления статей

- Статьи принимаются в электронном виде по электронной почте. Тип файла: документ Word.
- Шрифт «Times New Roman», размер – 14, интервал – 1,5, красная строка – 1,25.
- Обязательно представление сопроводительного письма и экземпляра статьи с подписью автора в виде скана.
- Почтовый адрес редакции: Москва, 115162, а/я 49, электронный – epidemvac@pochta.ru, epidemvac@yandex.ru