

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФБУН «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
РОСПОТРЕБНАДЗОРА
УПРАВЛЕНИЕ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

**МАТЕРИАЛЫ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ**

*Новосибирск, Россия
26-27 сентября 2016 г.*

УДК 619:616.9-036.22(063)

ББК 48.2+48.731я431

Д 44

***Конференция организована ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора и Управлением Роспотребнадзора по
Новосибирской области при поддержке:***

ЗАО «Вектор-Бест», ЗАО «Вектор-БиАльгам», ООО «ВекторПРО»,
ООО «Диаэм», ООО «Дюпон Наука и Технологии»,
ООО «ИКС-ЦЕНТР», ООО «Компания Хеликон», ООО «ОПТЭК»,
ООО «Сарториус Стедим РУС», ООО НПФ «МедБиоСфера».

Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе: Материалы научно-практической конференции (26–27 сентября 2016 г., Новосибирск). – Новосибирск: Издательство «АРЕАЛ», 2016. – 260 с.

Сборник материалов научно-практической конференции содержит тезисы и резюме докладов, постерных сообщений, в которых представлены актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных болезней, современные подходы к созданию инновационных средств диагностики и профилактики инфекционных болезней.

Издание адресовано эпидемиологам, инфекционистам, студентам, ученым и врачам, работающим над проблемами борьбы с инфекционными болезнями.

Материалы конференции воспроизведены в авторской редакции.

ISBN 978-5-906587-27-5

© Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека, 2016
© ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 2016
© Издательство «АРЕАЛ», 2016

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ 1. АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ 13

Актуальные направления научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

Акимкин В.Г. 13

Эпидемиологические проявления ГЛПС в Еврейской автономной области в допаvoudковый и послепаvoudковый период 2014 года и уточнение видового разнообразия циркулирующих хантавирусов

Андаев Е.И., Севостьянова А.В., Носков А.К., Адельшин Р.В., Копылов П.В., Безногов Ю.Г., Снеткова И.П., Авдошина Л.Н., Бренева Н.В. 18

Эпидемиологическая ситуация в Горно-Алтайском природном очаге чумы: новые угрозы и меры по их минимизации

Балахонов С.В., Щучинов Л.В. Михайлов Е.П., Корзун В.М., Косилко С.А., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Денисов А.В., Базарова Г.Х., Ярыгина М.Б. 20

Особенности процесса размножения блох в гнездах горного суслика в связи с сезонной сменой нор зверьками на своих индивидуальных участках

Белявцева Л.И., Цапко Н.В., Давыдова Н.А. 23

Выявление хеликобактерной инфекции как «маркера» иммунодефицита

Веркина Л.М., Березняк Е.А., Симонова И.Р., Тришина А.В., Егиазарян Л.А. 25

Использование детекции ISE элемента *Vibrio cholerae* при проведении эпидемиологического надзора за холерой

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Титова С.В. 26

Энтеровирусы в Российской Федерации в 2007-2015 гг.

Голицына Л.Н., Зверев В.В., Новикова Н.А. 27

Эпидемиологическая обстановка по туберкулезу на территории Красноярского края

Дмитриева Г.М., Орешкина Н.Д., Метелёв А.А. 31

Комплексный подход к оптимизации эпидемиологического надзора за дальневосточными трематодозами

Драгомерецкая А.Г., Троценко О.Е. 32

Этиологическая расшифровка острых кишечных инфекций у взрослых: выявление смены доминирующих генотипов вирусных возбудителей

Жираковская Е.В., Соколов С.Н., Капустин Д.В., Фаст Е.В., Шеронова О.Б., Краснова Е.И., Тикунова Н.В. 34

Феномен формирования длительного вирусоносительства, рецидивирующего характера течения заболевания и поздней (отсроченной) гибели у больных БВВЭ по данным эпидемии 2014–2015 года и полученным экспериментальным данным

Зубавичене Н.М., Пьянков О.В., Бочаров Е.Ф. 37

Анализ заболеваемости ГЛПС в Российской Федерации	
<i>Иванова А.В. Попов Н.В.</i>	39
Анализ эпидемической ситуации по гриппу в 2014–2016 гг.	
<i>Ильичева Т.Н., Дурыманов А.Г., Сулопаров И.М., Колосова Н.П., Святченко С.В., Гончарова Н.И., Петрова О.В., Шиповалов А.В., Михеев В.Н., Рыжиков А.Б.</i>	41
Анализ эпидемии гриппа 2016 года по материалам двух Национальных центров ВОЗ в Российской Федерации	
<i>Карпова Л.С., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Столяров К.А., Соминина А.А., Бурцева Е.И.</i>	43
Характеристика гидролазной активности иммуногенных препаратов наружной мембраны <i>Vibrio cholerae</i> O1 и O139 серогрупп разного происхождения	
<i>Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Николаев В.Б.</i>	49
Ситуация по природно-очаговым инфекционным болезням в Сибири и на Дальнем Востоке в 2015 г., прогноз на 2016 г.	
<i>Косилко С.А., Балахонов С.В., Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Бренева Н.В., Сидорова Е.А., Севостьянова А.В., Якович Н.В., Мазеп А.В.</i>	51
Ранжированный анализ постгеномной оценки антагонистического статуса микробиоценозов городской популяции индивидуумов, риска патогенности групп микроорганизмов, при конструировании микробиоценозных консорциумов	
<i>Лахтин В.М., Лахтин М.В., Байракова А.Л., Афанасьев С.С., Алешкин В.А.</i>	53
О корреляции выделения штаммов холерных вибрионов с разной генетической характеристикой из поверхностных водоемов на территории Российской Федерации	
<i>Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В.</i>	55
Особенности проявления некоторых природно-очаговых болезней на стыке северной тайги и лесотундры в западной части Западной Сибири	
<i>Леонтьева С.А., Брагина Е.А., Катин А.А., Степанова Т.Ф., Нечипуренко Л.А., Харьков В.В.</i>	57
Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям вирусной этиологии на территории Северо-Кавказского федерального округа в 2015 году	
<i>Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А.</i>	59
Слепни как возможный фактор передачи возбудителя клещевого боррелиоза	
<i>Савченко А.П., Пичурина Н.Л., Забашта М.В., Романова Л.В., Дворцова И.В.</i>	61
Особо опасные инфекции и задачи стационара ООИ	
<i>Селюнина Д.В.</i>	62
Эффективность бактерицидного действия коммерческих антисептиков на госпитальные штаммы грамотрицательных бактерий	
<i>Слукин П.В., Ершова О.Н., Фурсова Н.К.</i>	63
Влияние температуры на сроки персистенции и состояние <i>ctx</i>- гена холерных вибрионов <i>E1 Tor</i> различной токсигенности	
<i>Титова С.В., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Лысова Л.К., Архангельская И.В., Миронова А.В.</i>	65

Тематика научно-исследовательских работ, выполняемых в 2016 году в рамках проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы»	
<i>Титова С.В., Щипелева И.А., Марковская Е.И.</i>	66
Определение восприимчивости наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов к CD95-опосредованному апоптозу при мониторинге острого инфекционного мононуклеоза у детей	
<i>Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д., Кулова Е.А., Уткин О.В.</i>	69
РАЗДЕЛ 2. НОВЫЕ И ВНОВЬ ВОЗНИКАЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ	72
О расширении ареала <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> Skuse, 1895 на Черноморском побережье России	
<i>Забашта М.В.</i>	72
Векторный компонент природных очагов трансмиссивных инфекций на островах дельты Дона	
<i>Забашта М.В., Пичурина Н.Л., Савченко А.П., Романова Л.В., Забашта А.В.</i>	74
Возможные причины появления новых микозов	
<i>Теплякова Т.В.</i>	76
Микромицеты в аэрозолях воздуха юга Западной Сибири – потенциальные возбудители заболеваний человека	
<i>Теплякова Т.В., Воробьева И.Г., Андреева И.С., Сафатов А.С.</i>	78
Хантавирусы на территории Республики Алтай	
<i>Яшина Л.Н., Щучинова Л.Д., Рукавишников М.Ю., Кондрушина М.П., Михеев В.Н.</i>	81
РАЗДЕЛ 3. ФЛАВИВИРУСЫ И ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗИКА	82
Сравнительный анализ штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в 60-е годы прошлого века и в современный период на территории Прибайкалья	
<i>Адельшин Р.В., Мельникова О.В., Борисова Т.И., Сидорова Е.А., Яковчиц Н.В., Андаев Е.И.</i>	82
Флавивирусы, генетическое разнообразие и их распространение в современном мире	
<i>Локтев В.Б.</i>	84
Анализ штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных на территории Республики Тыва	
<i>Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Савинова Ю.С., Андаев Е.И.</i>	87
Циркуляция возбудителя клещевого вирусного энцефалита на юге России	
<i>Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Ефременко Д.В.</i>	89
Клещевой вирусный энцефалит в Забайкальском крае. Применение современных молекулярно-генетических методов для характеристики штаммов вируса клещевого энцефалита	
<i>Сидорова Е.А., Борисова Т.И., Адельшин Р.В., Трухина А.Г., Андаев Е.И.</i>	90
Анализ генетического разнообразия сибирского генотипа вируса клещевого энцефалита на территории Евразии	
<i>Ткачев С.Е., Бахвалова В.Н., Козлова И.В., Чичерина Г.С., Демина Т.В., Верхозина М.М., Джиоев Ю.П., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В., Злобин В.И.</i>	93

Молекулярно-генетическая и биологическая характеристика штаммов вируса клещевого энцефалита европейского генотипа, выявленных на территории Западной и Восточной Сибири <i>Ткачев С.Е., Демина Т.В., Козлова И.В., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Сунцова О.В., Верхозина М.М., Джисоев Ю.П., Парамонов А.И., Тикунов А.Ю., Савинова Ю.С., Тикунова Н.В., Злобин В.И., Ружек Д.</i>	95
РАЗДЕЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГОВОБО ОПАСНЫХ И СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	98
Анализ молекулярно-эпидемической ситуации по распространению ВИЧ-инфекции в Тюменской области <i>Астахова Е.М., Тотменин А.В., Гашикова М.П., Петрова С.В., Пунько О.А., Попков А.В., Гашикова Н.М.</i>	98
Сравнительный анализ полногеномных последовательностей сибирских изолятов парвовируса человека <i>Бабкин И.В., Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В.</i>	100
CRF63_02A1определяет развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в Алтайском крае <i>Власов Е.В., Муранкина В.Р., Ивлев В.В., Тотменин А.В., Гашикова М.П., Султанов Л.В., Гашикова Н.М.</i>	102
Эпидемия ВИЧ-инфекции в Узбекистане – распространение генетических вариантов и резистентных ВИЧ-1 <i>Гашикова Н.М., Тотменин А.В., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Гашикова М.П., Хегай Т.Р., Шаймкулов Ф.У., Байжанов А.К., Арипова Т.У.</i>	103
Генетическое разнообразие ВИЧ-1, распространяющихся в Кемеровской области <i>Зырянова Д.П., Тотменин А.В., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Гашикова М.П., Поздняков П.И., Москалева Н.В., Айкин С.С., Булатова Т.Н., Гашикова Н.М.</i>	105
Субтип-специфический полиморфизм области гена <i>pol</i>, кодирующей интегразу ВИЧ-1 <i>Ивлев В.В., Астахова Е.М., Зырянова Д.П., Власов Е.В., Муранкина В.Р., Гашикова М.П., Тотменин А.В., Гашикова Н.М.</i>	107
Молекулярно-генетический анализ риккетсий, переносимых иксодовыми клещами на территории Дальнего Востока <i>Иголкина Я.П., Рар В.А., Епихина Т.И., Тикунов А.Ю., Бондаренко Е.И., Высочина Н.П., Пуховская Н.М., Иванов Л.И., Тикунова Н.В.</i>	109
Генетическое разнообразие возбудителя бруцеллеза, циркулирующего на территории Северо-Кавказского федерального округа <i>Ковалев Д.А., Кузнецова И.В., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Куличенко А.Н.</i>	112
Комплексная характеристика уникального сочетанного очага трансмиссивных клещевых инфекций на территории Иркутской области <i>Козлова И.В., Лисак О.В., Дорощенко Е.К., Сунцова О.В., Верхозина М.М., Демина Т.В., Рар В.А., Ткачев С.Е., Джисоев Ю.П., Федулina О.О., Парамонов А.И., Савинова Ю.С., Злобин В.И.</i>	114

Молекулярная диагностика гриппа на территории Томской области в эпидсезон 2015 – 2016 гг. <i>Кондратьев М.В., Шихин А.В., Кондратьева Л.М.</i>	116
Текущая ситуация по ВИЧ-инфекции в Новосибирской области <i>Муранкина В.Р., Власов Е.В., Ивлев В.В., Тотменин А.В., Гашикова М.П., Соколов Ю.В., Казаева Е.В., Гашикова Н.М.</i>	117
Полногеномный SNP анализ бруцелл. Филогеография <i>Brucella melitensis</i> <i>Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Волынкина А.С., Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Куличенко А.Н.</i>	119
Мультилокусное типирование штаммов боррелий комплекса <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>, изолированных в Томской области <i>Сабитова Ю.В., Фоменко Н.В., Тикунов А.Ю., Стронин О.В., Гольцова Н.А., Тикунова Н.В.</i>	121
Использование метода контрольных карт в процессе молекулярно-генетического мониторинга контаминации производственной среды <i>Степанова Т.Ф., Ребещенко А.П., Мазуркевич В.В., Бахитановская И.В., Зматракова Е.А., Ожирельева И.В.</i>	123
Иммуноферментный анализ с использованием конъюгатов на основе поли- и моноклональных мелиоидозных антител в серологическом мониторинге мелиоидоза как особо опасной инфекции <i>Татаренко Ю.С., Новицкая И.В., Савина Е.В.</i>	126
Генотипирование ВИЧ-1 в условиях увеличения генетической гетерогенности циркулирующих вариантов вируса <i>Тотменин А.В., Астахова Е.М., Ивлев В.В., Зырянова Д.П., Гашикова М.П., Власов Е.В., Муранкина В.Р., Гашикова Н.М.</i>	128
Коллекция российских инфекционных изолятов ВИЧ-1, включающая современные циркулирующие генетические варианты вируса <i>Унагаева Н.В., Бледных Н.А., Ачигечева П.Ю., Бочаров Е.Ф., Тотменин А.В., Гашикова Н.М.</i>	129
Результаты мониторинга циркуляции неполиомиелитных энтеровирусов на территории мегаполиса <i>Устюжанин А.В., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г.</i>	131
Трансляционная персонифицированная медицина: ex vivo культуры альвеолярных макрофагов из операционного материала больных туберкулезом легких для оценки зараженности <i>Mycobacterium tuberculosis</i> клеток-хозяев и определения вирулентности патогена <i>Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Скорняков С.Н.</i>	133
Эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг энтеропатогенных иерсиниозов <i>Чеснокова М.В., Климов В.Т., Каримова Т.В., Иванова Л.К.</i>	135
Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Восточной Сибири в 2015 г. <i>Яковчиц Н.В., Адельшин Р.В., Мельникова О.В., Андаев Е.И.</i>	138

РАЗДЕЛ 5. РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ СРЕДСТВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ОСНОВАННЫХ НА НОВЕЙШИХ ТЕХНОЛОГИЯХ И ДОСТИЖЕНИЯХ НАУКИ	140
Разработка лабораторных методов ПЦР-диагностики ранее не выявляемых гастровирусов	
<i>Бабкин И.В., Соколов С.Н., Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В.</i>	140
Разработка биолюминесцентных сенсоров для диагностики вируса клещевого энцефалита и ортопоксвирусов	
<i>Байков И.К., Франк Л.А., Буракова Л.П., Кудрявцев А.Н., Хлусевич Я.А., Морозова В.В., Тикунова Н.В.</i>	141
Трудности лабораторного подтверждения диагноза «корь» у привитых	
<i>Бичурина М.А., Железнова Н.В., Тимофеева Е.В.</i>	143
Стандартные условия биотехнологии производства магнимоносорбентов, используемые в лабораторной диагностике	
<i>Гаркуша Ю.Ю., Старцева О.Л., Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А., Жданова Е.В.</i>	145
Германо-Казахстанское сотрудничество в области совершенствования лабораторной диагностики и биобезопасности при работе с опасными патогенами	
<i>Дмитровский А.М., Frey S., Essbauer S., Zinner J., Егембердиева Р.А., Ералиева Л.Т., Шатиева Ж.Ж., Туребеков Н., Абдиева К., Жалмагамбетова А.</i>	147
Центральная референтная (референс) лаборатория в Республике Казахстан. Состояние дел, цели и задачи	
<i>Дмитровский А.М., Мамадалиев С.М., Егембердиева Р.А., Искакова Ф.А., Сарыбаева Г.К.</i>	149
Диагностика холеры на основе препаратов нового поколения	
<i>Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф.</i>	151
Совершенствование технологии получения иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих для выявления возбудителей опасных инфекций	
<i>Жарникова Т.В., Жарникова И.В., Таран Т.В.</i>	154
Одновременное выявление двух мишеней – подход к решению проблем ПЦР-диагностики заболеваний, вызываемых вирусами с высокой генетической изменчивостью	
<i>Иванов М.К., Прасолова М.А., Тимофеев Д.И., Глушков С.А., Кандрушин Е.В.</i>	156
Современное состояние лабораторной диагностики иерсиниозов в Сибири и на Дальнем Востоке	
<i>Каримова Т.В., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Опочинский Э.Ф.</i>	158
Сплайсинг-чувствительный ДНК-микрочип для оценки экспрессии мРНК элементов апоптоз-ассоциированного сигналинга	
<i>Князев Д.И., Солнцев Л.А., Сахарнов Н.А., Цветкова В.Д., Уткин О.В.</i>	159
Видоспецифичная дифференциация вирусов натуральной оспы, оспы обезьян и ветряной оспы методом ПЦР в реальном времени в мультиплексном формате	
<i>Максютов Р.А., Гаврилова Е.В., Маренникова С.В., Щелкунов С.Н.</i>	161

Методические подходы к разработке бруцеллезного корпускулярного цветного L-диагностикума	
<i>Михайлов Л.М., Токарева Л.Е., Баранникова Н.Л., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Балахонов С.В.</i>	162
Диагностика метициллинрезистентности штаммов стафилококков методом ПЦР в реальном времени	
<i>Морозова В.В., Фоменко Н.В., Козлова Ю.Н., Тикунова Н.В.</i>	164
Автономный набор для мультиплексного дот-иммуноанализа гемотрансмиссивных инфекций	
<i>Нечитайло О.В., Офицеров В.И., Полтавченко А.Г.</i>	166
Лабораторная диагностика и особенности клинических проявлений возвратной клещевой лихорадки, вызванной <i>Borrelia miyamotoi</i>, в Новосибирской области	
<i>Савельева М.В., Тикунова Н.В., Краснова Е.И., Рар В.А., Проворова В.В., Хохлова Н.И., Мельникова О.В., Сабитова Ю.В., Капустин Д.В.</i>	170
Разработка эритроцитарного иммуноглобулинового моноклонального диагностикума для лабораторной диагностики мелиоидоза	
<i>Савина Е.В., Новицкая И.В., Татаренко Ю.С.</i>	172
Выявление возбудителя бруцеллеза в крови методом времяпролетной масс-спектрометрии	
<i>Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Пономаренко Д.Г., Куличенко А.Н.</i>	174
РАЗДЕЛ 6. РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ ИННОВАЦИОННЫХ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ И СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	177
Проблема антифагового иммунного ответа при энтеральной фаготерапии	
<i>Алешкин В.А., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Еришова О.Н., Киселева И.А., Зулькарнеев Э.Р.</i>	177
Зимографический анализ секретируемых РНКаз штаммов <i>Bacillus thuringiensis</i>, культивируемых на средах различного состава	
<i>Андреева И.С., Закабунин А.И., Мокрушина О.С.</i>	178
Дизайн полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – кандидатов ДНК-вакцины против ВИЧ-1	
<i>Бажан С.И., Антонец Д.В., Карпенко Л.И., Офицеров В.И., Ильичев А.А.</i>	181
Новые расы холерных бактериофагов и их применение	
<i>Гаевская Н.Е.</i>	182
Изучение интерферониндуцирующих свойств препарата дельтаферон в составе молекулярной конструкции для интраназального введения	
<i>Гамалей С.Г., Батенева А.В., Иванова О.С., Левагина Г.М., Медикова Л.Д., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д.</i>	184
Совершенствование биотехнологии чумной вакцины на этапе синхронизации	
<i>Гостищева С.Е., Абзаева Н.В., Будыка Д.А., Иванова Г.Ф., Зуенко А.А.</i>	187

Иммуномодулирующие и противовирусные свойства индуктора интерферона ридостина при непарентеральном применении	
<i>Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Шишкина Л.Н., Гамалей С.Г., Цыпленкова Е.С., Сысоева Г.М., Батенева А.В., Скарнович М.О.</i>	188
Вируснейтрализующая активность антител при оспопрививании: оценка влияния демографических факторов, схем вакцинации и осложнений	
<i>Ермилова О.С., Гинько З.И., Маренникова С.В., Белявская В.А.</i>	191
Средство для профилактики и лечения инфекционных заболеваний на основе двуспиральной РНК бактериофага ф6	
<i>Ермолаев В.В., Клименко В.П., Гогина Я.С., Батенева А.В., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д.</i>	194
Антителозависимое усиление тяжести течения геморрагической лихорадки Эбола (БВВЭ) и феномен ускоренной гибели в эксперименте на морских свинках - возможные причины	
<i>Зубавичене Н.М., Пьянков О.В., Бочаров Е.Ф.</i>	196
Разработка и исследование свойств интраназальной формы аналога интерферона гамма	
<i>Иванова О.С., Левагина Г.М., Гамалей С.Г., Батенева А.В., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д.</i>	198
Исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1	
<i>Каплина О.Н., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Боронова Е.А., Карпенко Л.И., Бажан С.И.</i>	200
Конструирование искусственных иммуногенов, способных индуцировать нейтрализующие антитела против широкого спектра изолятов ВИЧ-1	
<i>Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Чикаев А.Н., Щербаков Д.Н., Бакулина А.Ю., Каплина О.Н., Щербакова Н.С., Андреева Н.Б., Ильичев А.А.</i>	202
Влияние иммуномодуляции на апоптоз клеток иммунной системы при моделировании противотуберкулезного вакцинного процесса	
<i>Кравцов А.Л., Клюева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А.</i>	203
Клинические испытания кандидатной вакцины против ВИЧ-инфекции «КомбиВИЧвак»	
<i>Кузубов В.И., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Алейников Р.П., Василевич И.В., Сергеев А.Н., Нечаева Е.А., Ильичев А.А., Карпенко Л.И.</i>	205
Вакциномика клещевого вирусного энцефалита: оценка влияния генетических и физиологических факторов реактивности макроорганизма на функциональную активность специфических антител	
<i>Лутова С.Л., Туманов Ю.В., Воевода М.И., Белявская В.А.</i>	206
Получение моноклональных антител против аналога бета-глюкана клеточной стенки <i>Candida albicans</i>, пригодных для использования в диагностике	
<i>Матвеев А.Л., Хлусевич Я.А., Кухаренко Л.А., Нифантьев Н.Э., Тикунова Н.В.</i>	208

Опыт оценки изменений напряженности аутоиммунного гомеостаза лиц, вакцинированных против пневмококковой инфекции и сезонного гриппа	
<i>Матвеев А.В., Талаева М.В., Цыганова М.И., Мохонова Е.В., Никитина З.И., Коптелова В.Н., Лапин В.А.</i>	210
Организация работы по массовой иммунизации населения в очаге заболевания особо опасной инфекцией	
<i>Михалева Т.Ю., Кузубов В.И., Гинько З.И., Рындюк Н.Н., Чернов В.И.</i>	212
Разработка живой культуральной тривалентной вакцины против сезонного гриппа	
<i>Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф., Думченко Н.Б., Свириденко Т.М., Жилина Н.В., Нечаев Ю.С., Богрянцева М.П., Усова С.В., Руденко Л.Г.</i>	213
Влияние вакцинации на последствия эпидемий особо опасных и социально значимых инфекций (универсальная модель)	
<i>Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г.</i>	215
Модельная биосистема «мышь аутбредной популяции ICR центральноафриканский штамм V79-1-005 ВОО» для оценки эффективности химиопрепаратов	
<i>Овчинникова А.С., Сергеев Ал.А., Галахова Д.О., Титова К.А., Сергеев Ар.А., Таранов О.С., Булычев Л.Е., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.</i>	218
Опыт применения гетерологичных иммуноглобулинов в профилактике и лечении вирусных геморрагических лихорадок Эбола и Марбург в Медико-санитарной части № 163 ФМБА России	
<i>Орловский В.Г., Кузубов В.И., Гинько З.И.</i>	220
Противовирусное средство на основе метаболитов бактерий рода <i>Serratia</i>	
<i>Пучкова Л.И., Ибрагимова Ж.Б., Мазуркова Н.А., Андреева И.С.</i>	221
Использование глобулярного белка из <i>Bacillus subtilis</i> в качестве носителя эпитопа ВИЧ-1, узнаваемого широконейтрализующим антителом 10E8	
<i>Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Бакулина А.Ю., Карпенко Л.И., Щербаков Д.Н.</i>	223
Модельные биосистемы для оценки эффективности препаратов от натуральной оспы, оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1)	
<i>Овчинникова А.С., Сергеев Ал.А., Галахова Д.О., Титова К.А., Сергеев Ар.А., Таранов О.С., Булычев Л.Е., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.</i>	225
Высшие грибы в профилактике и лечении вирусных заболеваний	
<i>Теплякова Т.В., Ильичева Т.Н., Косогова Т.А., Ананько Г.Г.</i>	228
Результаты доклинического исследования препарата «Энцемаб», созданного на основе гуманизированного антитела против вируса клещевого энцефалита	
<i>Тикунова Н.В., Матвеев А.Л., Байков И.К., Хлусевич Я.А., Стронин О.В., Бондаренко Д.А., Мурашев А.Н.</i>	230
Разработка биосистемы для оценки эффективности химиопрепаратов против натуральной оспы с использованием мышей ICR	
<i>Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Овчинникова А.С., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.</i>	232

**Получение вируснейтрализующих полноразмерных антител человека
против ортопоксвирусов**

Хлусевич Я.А., Матвеев А.Л., Байков И.К., Бормотов Н.И., Булычев Л.Е., Тикунова Н.В. 234

**Полиэпитопный ВИЧ-1 иммуноген, включающий имитаторы эпитопов, узнаваемых
широконейтрализующими антителами 10E8, Z13e1 и VRC01**

*Чикаев А.Н., Рудометов А.П., Щербакова Н.С., Андреева Н.Б., Каплина О.Н., Ильичев А.А.,
Карпенко Л.И.* 236

**Разработка и проведение доклинических исследований химически синтезированной
субстанции отечественного противооспенного препарата НИОХ-14**

*Шишкина Л.Н., Кабанов А.С., Мазурков О.Ю., Скарнович М.О., Бормотов Н.И., Серова О.А.,
Скарнович М.А., Сергеев Ал.А., Титова К.А., Сергеев Ар.А., Булычев Л.Е., Сысоева Г.М.,
Шимица Г.Г., Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д., Селиванов Б.А., Тихонов А.Я., Чернонос А.А.* 237

Кандидатные вакцины против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций

Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютин Р.А., Щелкунов С.Н. 239

Авторский указатель 242

Список участников 247

РАЗДЕЛ 1.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭПИДЕМИОЛОГИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

В.Г. Акимкин

*ФБУН «Научно-исследовательский институт дезинфектологии» Роспотребнадзора,
Москва, Россия*

В современных условиях развития здравоохранения и человечества в целом, профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), является одной из глобальных мировых проблем. Решению этих серьезных вопросов сегодня подчинена деятельность значительного количества ученых, многочисленных практиков здравоохранения и большинства крупных компаний, представляющих свою продукцию и услуги на мировом рынке.

В настоящее время трудно переоценить социальный и экономический ущерб, наносящий ИСМП ежегодно мировому сообществу. Так, по данным официальной статистики, в США от ИСМП ежегодно страдает более 2 млн пациентов, погибает 88000 больных, ежегодный экономический ущерб составляет 4–10 млрд долларов; в Великобритании с учетом регистрируемых ИСМП стационарное лечение пациентов увеличивается на 3,6 млн дней, ежегодный экономический ущерб составляет около 1 млрд фунтов стерлингов [1–3].

К сожалению, сегодня в Российской Федерации отсутствуют обобщенные достоверные статистические сведения о конкретном социальном и экономическом бремени, причиняемом ИСМП населению, есть лишь определенные представления о его масштабах, которые базируются на результатах научных исследований отечественных ученых в последние годы. Показано, что ИСМП поражают 5–10 % пациентов, находящихся в стационарах, и занимают десятое место в ряду причин смертности населения. В России по данным официальной статистики ежегодно регистрируется примерно 25–30 тыс. случаев ИСМП (0,7–0,8 на 1 000 пациентов), однако отечественные исследователи считают, что их истинное количество составляет не менее 2–2,5 млн человек (т.е. учету подлежит не более 1–5 % реальной заболеваемости!). В зависимости от действия различных факторов, частота возникновения ИСМП колеблется. Некоторые группы пациентов особенно уязвимы: новорожденные дети, пожилые люди, пациенты с тяжелым течением основной патологии и множественными сопутствующими заболеваниями, пациенты, подвергающиеся агрессивным и инвазивным медицинским манипуляциям, трансплантации органов и т.п. В этих группах показатели заболеваемости ИСМП значительно выше [2].

Пациенты с ИСМП находятся в стационаре в 2–3 раза дольше, чем аналогичные пациенты без признаков инфекции. В среднем на 10 дней задерживается их выписка, в 3–4 раза возрастает стоимость лечения, и в 5–7 раз – риск летального исхода. Экономический ущерб, причиняемый ИСМП, значителен:

в Российской Федерации эта цифра, официально не изменяясь уже более 15 лет, предположительно составляет 10–15 млрд рублей в год. Однако аналогичное количество реально существующих случаев ИСМП в России и США позволяет очевидно свидетельствовать о недоучете экономического ущерба от ИСМП в 30–50 раз [2].

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, существенно снижают качество жизни пациента, приводят к потере репутации учреждения здравоохранения.

Интенсивное развитие высокотехнологичных, инвазивных методов диагностики и лечения в сочетании с широким распространением микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью определяет необходимость непрерывного совершенствования систем надзора и контроля за ИСМП.

В нашей стране впервые на государственном уровне основные направления профилактики были сформулированы в 1999 г. в программном документе «Концепция профилактики внутрибольничных инфекций», который определил на последующее десятилетие стратегию научных исследований, задачи разработки нормативного, правового обеспечения, внедрения передовых методов профилактики в практику. В современных условиях в России принята и действует «Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (2011 г.). Настоящая Концепция разработана специалистами Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, известными учеными и организаторами здравоохранения и определяет цель, принципы, общую архитектуру, основные направления совершенствования национальной системы профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, механизмы обеспечения ее функционирования, а также ожидаемый социально-экономический эффект.

Как известно, важнейшей основой практической реализации положений современной Национальной Концепции профилактики ИСМП является ее научная составляющая. Проблема профилактики ИСМП – междисциплинарное научное направление, исследующее закономерности развития эпидемического процесса различных нозологических форм ИСМП в организациях здравоохранения различного профиля, особенности этиологии и свойства возбудителей, обуславливающие развитие инфекционных заболеваний у пациентов и медицинского персонала, условия и факторы (медико-биологические, гигиенические, организационные, лечебно-диагностические и пр.), способствующие или препятствующие появлению и распространению ИСМП в учреждениях здравоохранения, и одновременно – сфера практической деятельности, направленная на разработку и реализацию профилактических и противоэпидемических мероприятий для обеспечения безопасности пребывания пациентов, условий труда медицинских работников в организациях здравоохранения.

Развитие научных исследований в соответствии с основными направлениями Концепции предусматривает:

- совершенствование методологии, технологии ведения эпидемиологического надзора и контроля ИСМП в организациях здравоохранения различного профиля;
- разработку эпидемиологической классификации ИСМП;
- изучение особенностей проявлений ИСМП в учреждениях здравоохранения различного профиля в современных условиях;
- изучение механизмов, факторов и условий развития эпидемического процесса различных нозологических форм ИСМП на современном этапе;
- изучение структуры и динамических изменений популяций бактериальных, вирусных и паразитарных патогенных агентов в организациях здравоохранения различного профиля;
- совершенствование подходов и методов обеспечения биологической безопасности в организациях здравоохранения (в т. ч. высокого риска инфицирования), сохранения здоровья медицинского персонала;
- разработку средств и методов диагностики ИСМП;
- совершенствование подходов и методов многоуровневой профилактики ИСМП;
- повышение эффективности дезинфекционных и стерилизационных мероприятий;
- совершенствование методов лечения ИСМП;
- разработку критериев случаев профессионального инфицирования персонала;
- оценку социального и экономического ущерба от ИСМП, эффективности мероприятий по профилактике ИСМП [2, 3].

В рамках данной статьи рассмотрены лишь некоторые направления перспективных научных исследований, исходя из вышеперечисленных аспектов изучения проблемы ИСМП.

Возбудитель инфекции является одним из основных звеньев эпидемического процесса. Следует подчеркнуть, что, в отношении практически всех нозоформ ИСМП не существует специфических мер профилактики, и поэтому дезинфекционные и стерилизационные мероприятия определяют основу их системы профилактики. Учитывая это, проблема устойчивости возбудителей ИСМП к антибактериальным препаратам, включая антибиотики, дезинфицирующие средства (ДС) и кожные антисептики в настоящее время находится в фокусе пристального внимания ученых и специалистов практического здравоохранения многих стран. Наличие устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам изучается уже на протяжении ряда лет. Установлено наличие устойчивости к различным группам дезинфектантов у разных видов микроорганизмов. Знания о механизмах устойчивости микроорганизмов варьируют от выявления генетических аспектов ее формирования к четвертично-аммониевым соединениям (ЧАС) и кислородсодержащим ДС до отсутствия достоверных представлений и только описания феномена резистентности. Еще меньше информации о распространенности устойчивости и влиянии различных факторов на ее формирование [4–6].

В условиях нарастания устойчивости возбудителей к антибактериальным средствам назрела необходимость глубокого всестороннего изучения проблемы устойчивости и осуществления ее мониторинга. Необходимость изучения и динамического наблюдения за устойчивостью микроорганизмов к ДС и кожным антисептикам обусловлена целым рядом факторов: ростом заболеваемости инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), широким распространением госпитальных штаммов, большим арсеналом адаптационных механизмов, характерных для условно-патогенных микроорганизмов, расширением спектра применяемых ДС, отсутствием единой стратегии применения дезинфектантов в практическом здравоохранении и др. причинами [7].

Чувствительность микрофлоры к применяемым ДС в настоящее время может рассматриваться как один из основных факторов, влияющих на качество и эффективность дезинфекционных мероприятий в лечебно-профилактических организациях (ЛПО). Чувствительность различных микроорганизмов к указанным средствам может варьировать в зависимости от типа ЛПО, особенностей соблюдения противоэпидемического режима, политики применения ДС. Способность микроорганизмов адаптироваться к воздействию неблагоприятных факторов, в т. ч. применяемым в ЛПО дезинфицирующим средствам, обуславливает возможность формирования устойчивых госпитальных штаммов. Более того, в последние годы в России были созданы определенные условия для использования заведомо неэффективных режимов применения целого ряда дезинфицирующих средств.

Одним из научно обоснованных направлений борьбы с ИСМП является совершенствование дезинфекционных и стерилизационных мероприятий как за счет разработки новых ДС и технологий, так и за счет улучшения организации и проведения этого комплекса мероприятий. Рациональная организация и проведение эффективных дезинфекционных мероприятий играют важную роль в комплексе мер по борьбе с инфекциями, одним из приоритетов которой является систематическое проведение мер, направленных на сдерживание селекции штаммов микроорганизмов, устойчивых к ДС и антисептикам, за счет качества проведения дезинфекции, тактики дезинфекционных мероприятий с учетом результатов мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам. Выбор тех или иных ДС, технологий, режимов их применения определяется типом медицинского учреждения, а также складывающейся эпидемиологической ситуацией [6, 7].

В современных условиях внедряется система ротации дезинфицирующих средств, для обоснования которой требуется исследование механизмов формирования резистентности микроорганизмов к дезинфектантам (в т. ч. молекулярно-генетических), а также мониторинг резистентности в условиях применения ДС в ЛПО. Широкому внедрению мониторинга устойчивости во многом препятствует отсутствие методик определения чувствительности микроорганизмов к ДС, утвержденных на федеральном уровне. Необходимо полное и всестороннее научное изучение таких вопросов, как вероятность возникновения устойчивости к ДС, скорость ее формирования; факторов, влияющих на развитие устойчивости к ДС; влияния эпидемиологической ситуации в ЛПО на распространенность и формирование устойчивости больничной микрофлоры [7].

Подчеркивая актуальность рассматриваемого научного направления, следует констатировать, что

в современных условиях имеется множество нерешенных вопросов теоретического, методического и организационного характера, что препятствует широкому внедрению мониторинга устойчивости микроорганизмов к ДС на территории России и требует разработки научно-методических подходов к его проведению в медицинских учреждениях разного профиля.

В рамках перспектив научных исследований в данном направлении предполагается:

- разработать количественные методы оценки устойчивости к ДС микроорганизмов, циркулирующих в ЛПО;
- разработать количественный метод оценки бактериостатического эффекта ДС с целью исключения из практики использования препаратов с потенциально высоким уровнем риска формирования устойчивости;
- исследовать механизмы формирования приобретенной устойчивости к биоцидам по результатам секвенирования генома, атомно-силовой и электронной микроскопии, масс-спектрометрического анализа белков;
- установить критерии ранжирования ДС по уровню потенциального риска формирования к ним устойчивости;
- научно обосновать ротацию ДС;
- изучить новые подходы для создания перспективных ДС на основе синергичных комбинаций антимикробных препаратов и др.

Одним из важных современных научных направлений является применение бактериофагов для решения проблемы ИСМП [1, 8–10, 12].

Сегодня бактериофаги с высокой эффективностью применяются для лечения большинства нозологических форм гнойно-септических инфекций различной локализации, внутрибольничных кишечных инфекций. Особую значимость в последние годы приобрели бактериофаги в связи с проблемой антибиотикорезистентности. Бактериофаги порой являются единственным средством лечения пациентов, заболевания которых обусловлены полиантибиотикорезистентными госпитальными штаммами условно-патогенных микроорганизмов, в т. ч. стрептококков, стафилококков, кишечной палочки, синегнойной палочки, протей, клебсиелл и др.

Среди многообразия ИСМП важная роль отводится внутрибольничному сальмонеллезу. Широко известна и активно применяется в практическом здравоохранении методика комплексного использования адаптированного сальмонеллезного бактериофага, разработанная специалистами ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. В соответствии с ней сальмонеллезный бактериофаг используется для лечения заболевших сальмонеллезом пациентов, назначается с профилактической целью всем пациентам, поступающим в отделения с высоким риском заражения и находившимся в контакте с больными внутрибольничным сальмонеллезом, а также применяется для санации и фагопрофилактики медицинского персонала ЛПО, биологической дезинфекции объектов ЛПО. Использование данной комплексной методики позволяет быстро и эффективно ликвидировать длительно существующие эпидемические очаги данной инфекции [12].

Одним из важных современных направлений применения бактериофагов в условиях ЛПО является их использование для деконтаминации объектов внешней среды, в особенности госпитальных штаммов возбудителей ИСМП, устойчивых к действию рекомендуемых режимов использования дезинфицирующих средств. Применение бактериофагов с этой целью в эпидемических очагах ИСМП является высокоэффективным и документировано многими российскими исследователями – представителями различных эпидемиологических школ гг. Тбилиси, Санкт-Петербурга, Москвы, Кемерово, Нижнего Новгорода, Уфы, Хабаровска и др. [8–13].

Показано, что действие бактериофагов на различных поверхностях неодинаково. Установлено, что наиболее эффективно взаимодействие бактериофага с бактериальными клетками происходит на пластмассовых, стеклянных и металлических поверхностях. Тканевые и бумажные поверхности могут являться резервуаром для потенциальных возбудителей и снижать эффективность фагирования. Опыт применения бактериофагов позволяет констатировать отсутствие значимого влияния применяемых в больничных условиях дезинфектантов на эффективность бактериофагирования.

Документировано эффективное использование бактериофагов в хирургических, травматологических, акушерских, детских, терапевтических стационарах, отделениях реанимации и интенсивной те-

рации, в условиях чрезвычайных ситуаций при массовых травмах [8, 10–13].

Обязательным условием эффективности фагирования является чувствительность возбудителя к бактериофагу и степень его литической активности.

При длительном опыте применения бактериофагов методом распыления во внешней среде, внесения в наркозно-дыхательную аппаратуру, сочетанного применения в раны и на объектах окружающей среды отечественными исследователями не зарегистрировано ни одного случая нежелательных побочных эффектов от применения препаратов бактериофагов. Использование фагирования как метода биологической дезинфекции подчас является единственно возможной мерой для элиминации возбудителей и профилактики контаминации больничной среды в реанимационном отделении в присутствии пациентов, если традиционные химические дезинфектанты неэффективны или малоэффективны [11].

Однако данное направление требует современного научного развития как с точки зрения методологических подходов, так и изучения применения бактериофагов как биологических дезинфектантов в эпидемических очагах различных нозологических форм ИСМП и ЛПО различного профиля.

Значимым разделом дезинфекционных мероприятий в лечебно-профилактических организациях является обеззараживание поверхностей. Реализация данного направления осуществляется в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3.2630–10 «Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность» и рядом других регламентирующих документов. Для решения данной практической задачи в ЛПО в основном применяется химический метод. Однако проблема формирования штаммов микроорганизмов, резистентных к воздействию дезинфицирующих средств на основе четвертично-аммониевых соединений (ЧАС), составляющих до 70 % существующего в России рынка дезинфектантов, требует поиска новых эффективных методов решения рассматриваемой задачи, одним из которых является импульсное ультрафиолетовое излучение.

Учитывая широкую распространенность данного отечественного оборудования в практическом здравоохранении многих зарубежных стран и высокую оценку эпидемиологической и экономической эффективности его применения, отдельные аспекты использования данного метода требуют глубокой научной оценки с целью более активного его внедрения в ЛПО Российской Федерации. Кроме того, необходима детальная научная оценка использования метода аэрозольной дезинфекции воздуха и поверхностей, который в последнее время стал применяться в ЛПО.

Таким образом, следует подчеркнуть необходимость и актуальность современного научного развития системы дезинфекционных мероприятий в ЛПО, являющихся основой решения проблемы профилактики ИСМП.

Библиографический список

1. Лившиц М. Л., Брусина Е. Б. Госпитальные инфекции: проблемы и пути решения // Журн. микробиол. – 1992. – № 1. – С. 22.
2. Покровский В. И., Акимкин В. Г., Брико Н. И. и др. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 1. – С. 4–7.
3. Покровский В. И., Брико Н. И., Брусина Е. Б. и др. Основы современной классификации инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2011. – № 3. – С. 4–10.
4. Брико Н. И., Брусина Е. Б., Зуева Л. П. и др. Госпитальный штамм – непознанная реальность // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 1 (68). – С. 30–35.
5. Шкарин В. В., Ковалишена О. В., Благодарова А. С. и др. Формирование устойчивости бактерий к четвертичным аммониевым соединениям в экспериментальных условиях // Медицинский альманах – 2012. – № 3. – С. 129–133.
6. Шкарин В. В., Благодарова А. С., Ковалишена О. В. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2011. – № 3. – С. 48.
7. Шкарин В. В., Ковалишена О. В., Благодарова А. С., Разгулин С. А. Принципы мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам в рамках эпидемиологического надзора за внутрибольничными инфекциями // Дезинфекционное дело. – 2010. – № 1. – С. 46–50.
8. Дроздова О. М., Брусина Е. Б. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 5. – С. 20–24.
9. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – 528 с.

10. Цитко А. А. Профилактика госпитальных гнойно-септических осложнений у пострадавших в чрезвычайных ситуациях: Автореферат дисс. ... канд. мед. наук – Омск, 1997. – 21 с.
11. Цитко А. А., Брусина Е. Б., Дроздова О. М. Профилактика госпитальных гнойно-септических инфекций в реанимационных отделениях: Методические рекомендации. – Кемерово, 1997. – с. 8.
12. Акимкин В. Г., Покровский В. И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. – М.: Изд-во РАМН, 2002. – 136 с.
13. Яфаев Р. Х., Зуева Л. П., Любимова А. В. и др. Перспективы использования бактериофагов с лечебной и профилактической целью // В книге Б. М. Тайц, Л. П. Зуева. Инфекционный контроль в лечебно-профилактических учреждениях. – СПб, 1998. – С. 55–61.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ГЛПС В ЕВРЕЙСКОЙ АВТОНОМНОЙ ОБЛАСТИ В ДОПАВОДКОВЫЙ И ПОСЛЕПАВОДКОВЫЙ ПЕРИОД 2014 ГОДА И УТОЧНЕНИЕ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ХАНТАВИРУСОВ

**Е. И. Андаев¹, А. В. Севостьянова¹, А. К. Носков¹, Р. В. Адельшин¹, П. В. Копылов²,
Ю. Г. Безногов², И. П. Снеткова², Л. Н. Авдошина², Н. В. Бренева¹**

*¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Иркутск; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Еврейской автономной области»
Роспотребнадзора, Биробиджан, Россия*

Эндемичные очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) на Дальнем Востоке известны с тридцатых годов прошлого столетия. Первые случаи заболевания зарегистрированы в Еврейской автономной области (АО) в с. Амурзет Амурского района (после 1963 г. переименован в Октябрьский) и в с. Бира (Облученский район) – за четыре года наблюдений в 1956–1959 гг. описано 26 случаев болезни [1]. В последующем максимальный уровень заболеваемости ГЛПС – 50 на 100 тыс. населения (100 случаев) в Еврейской АО наблюдали в 1984 г., когда возникло осложнение эпидемиологической ситуации на Дальнем Востоке в связи с крупным наводнением на Амуре [2]. В настоящее время sporadическая заболеваемость регистрируется во всех районах области. В 2013 г. в результате крупнейшего за историю наблюдений наводнения значительное ухудшение среды обитания создало предпосылки для осложнения эпидемиологической ситуации по инфекционным болезням, в том числе и ГЛПС.

В литературе отсутствуют данные о геновариантах хантавирусов, циркулирующих в Еврейской АО.

Цель исследования – оценка эпидемиологической обстановки по ГЛПС в допаводковый (2003–2012 гг.), паводковый (2013 г.), послепаводковый периоды 2014 г. и уточнение видового разнообразия хантавирусов в Еврейской АО.

Материалы и методы. Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости ГЛПС в Еврейской АО проведен на основе архивных литературных, статистических данных и материалов, поступающих из учреждений Роспотребнадзора Еврейской АО в Референс-центр по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. Учет численности и отлов мелких млекопитающих осуществляли в июле 2015 г. в природных и антропогенных биотопах Биробиджанского и Ленинского районов. Всего было отработано 400 ловушко-суток. Добыто 90 и исследовано 63 особи мелких млекопитающих семи видов.

Выявление РНК хантавирусов осуществляли с использованием метода ОТ-ПЦР. Тотальное выделение РНК хантавирусов проводили набором «Рибозоль-В» в соответствии с инструкцией производителя (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Получение кДНК хантавирусов на матрице РНК осуществляли набором реагентов «Реверта-Л» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва). Технология генотипирования включала ПЦР с использованием набора праймеров, кодирующих L-фрагмент генома хантавирусов и последующим учетом результатов методом общепринятой электрофоретической детекции в агароз-

ном геле, прямое секвенирование ампликонов положительных образцов. Для секвенирования использовали набор «Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1» и автоматический анализатор Applied Biosystem 3500 xL. Обработку нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit V.7.0.9., филогенетический анализ – с применением программы Mega 5.0. Для подтверждения таксономической принадлежности мелких млекопитающих, от которых выделена РНК хантавирусов, было проведено определение и сравнительный анализ с базой данных GenBank последовательностей фрагмента митохондриальной ДНК (D-loop).

Результаты и обсуждение. ГЛПС регистрируются во всех районах Еврейской АО с наиболее сильными эпидемическими проявлениями в Биробиджанском, Октябрьском, Ленинском и Облученском районах, где среднегодовые показатели на 100 тыс. населения составили 18,9; 14,5; 10,3 и 8,5 соответственно. Ретроспективный анализ заболеваемости за 10-летний период (2003–2012 гг.) показал, что наиболее высокий уровень отмечен в 2007 г. – 10,2 на 100 тыс. населения. Всего зарегистрировано 95 случаев ГЛПС, среднегодовой интенсивный показатель составил 5,1. С 2009 по 2013 гг. наблюдали динамику снижения заболеваемости с 4,8 до 2,8 на 100 тыс. населения.

При анализе возрастной структуры заболевших обращает на себя внимание, что в основном болели люди в возрасте 20–59 лет (85,2±3,6%). Более высокая заболеваемость регистрировалась среди лиц 30–39 (30,5±4,7%), 20–29 (23,5±4,3%) и 40–49 (17,9±3,9%) лет. Мужское население болело значительно чаще женского – 71,5% и 28,5% соответственно.

Как правило, случаи ГЛПС встречаются в течение всего календарного года, но чаще в осенне-зимний период – с сентября по январь, на эти месяцы приходится 54,7±5,4%, причем пик интенсивности эпидемического процесса наблюдается в декабре – 22,1±4,5%, меньше всего болело в феврале – марте (3,1±1,8%).

Анализ предполагаемых мест заражения населения ГЛПС свидетельствует, что контакт с возбудителем происходит при перевозке сена, соломы (28,4±4,6%); уборке помещений (21,0±4,1%); работе в пыльных помещениях (13,6±3,5%); контакте с грызунами (10,5±3,1%); на рыбалке (6,3±2,4%) и при выполнении сельскохозяйственных работ (5,2±2,2%).

В 2014 г. зарегистрирован подъем заболеваемости – всего выявлено 19 серологически подтвержденных случаев во всех районах области и г. Биробиджане, показатель на 100 тыс. населения (11,0) превысил среднегодовой в 2 раза и в 3,9 раз прошлогодний показатель. Наиболее высокая заболеваемость отмечена в Биробиджанском (41,4), Облученском (25,4) и Сидовичском (11,1) районах. Среди заболевших преобладают мужчины – 16 (84,2%), женщин всего три (15,8%), возраст заболевших от 20 до 59 лет и старше. Половина случаев отмечена у лиц в возрасте от 50 до 65 лет. На возрастные группы 20–29 лет пришлось 10,5%; 30–39 лет – 21%; 40–49 лет – 15,7%. В социальной структуре заболевших преобладали работающие (52,6%), затем следовали неработающие (26,3%) и пенсионеры (21%). Основная заболеваемость зарегистрирована в осенние месяцы октябрь, ноябрь (52,6%) от общего числа случаев, в летний период заболело 5 человек (26,3%).

Результаты лабораторных исследований показали, что основным хозяином хантавирусов является *Apodemus agrarius*, составившая почти половину всех исследованных животных и 75% среди инфицированных с наличием РНК хантавирусов. Из других видов животных РНК хантавирусов обнаружена только в одном случае у *Microtus maximowiczii*. Дальнейшее изучение всех РНК-содержащих образцов хантавирусов от грызунов с применением метода секвенирования L фрагмента гена (328 п. н.) показало их таксономическую принадлежность к хантавирусам трех геновариантов: от *M. maximowiczii* – к вирусу *Khabarovsk*, *A. agrarius* – вирусу *Hantaan* (2 пробы) и *Puumala*-подобному хантавирусу *Fusong-MF-682*. Два РНК-изолята от *A. agrarius* (KU82127, KU82128) вируса *Hantaan* оказались идентичны между собой, при сравнении с последовательностями из международной базы *GenBank* они наиболее близки к РНК-изолятам *Galkino/AA57/2002* из Хабаровска и *Fuyuan-Aa-26* из Китая (Большой Уссурийский остров), уровень гомологии 95,6%.

РНК-изолят от *M. maximowiczii* (KU821029) относится к генотипу *Khabarovsk*, располагается в группе последовательностей с территории Большого Уссурийского острова (Китай), уровень гомологии с изолятом *Fuyuan-Mm-312 M. maximowiczii* 95,6%. [3].

РНК-изолят от *A. agrarius* (KU821030) располагается в одной группе с последовательностями из Китая (*Fusong-MF-682* и *Shenyang-MF-136*), с уровнем гомологии 91 и 88% соответственно.

Определение видовой принадлежности полевок на основании сравнения последовательности фрагмента митохондриальной ДНК (*D-loop*) показало, что изолят *Khabarovsk* выделен от *M. maximowiczii*, а изоляты *Hantaan* и *Puumala* – от *A. agrarius*, причем нуклеотидные последовательности группируются с последовательностями от *A. agrarius* из Китая.

Таким образом, наблюдается значительное ухудшение эпидемиологической ситуации по ГЛПС в Еврейской АО после паводка 2013 г. В 2014 г. зарегистрирован подъем заболеваемости с превышением среднесезонного показателя в 2 раза и показателя 2013 г. – в 3,9 раз. Проводимые профилактические мероприятия позволят предотвратить более серьезные эпидемические осложнения, но не исключают полностью все эпидемиологические риски.

На территории Еврейской АО установлена циркуляция трех геновариантов хантавирусов: *Khabarovsk*, *Hantaan* и *Puumala*-подобного *Fusong-MF-682*. Причем очаги вирусов *Hantaan* и *Khabarovsk* территориально перекрываются. Геновариант вируса *Puumala*, обнаруженный в образце от полевой мыши, генетически дистанцирован от известных вариантов этого вида хантавирусов, основным носителем которого в европейской части страны является рыжая полевка (*Myodes glareolus*). Отсутствие в Еврейской АО лабораторной диагностики клинического материала на видовую принадлежность хантавирусов не позволяет окончательно установить эпидемиологическую роль хантавирусов вирусов *Puumala* и *Khabarovsk*.

Анализ видового состава и инфицированности мелких млекопитающих подтвердил ведущую роль полевой мыши как основного хозяина *Hantaan* вируса и вероятного источника заражения людей в Еврейской АО. Необходимы дальнейшие молекулярно-генетические исследования для расшифровки этиологии заболевания, изучения пейзажа и пространственного распределения различных геновариантов хантавирусов, циркулирующих среди мелких млекопитающих.

Библиографический список

1. Осипова В.Г. О заболеваниях геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Еврейской автономной области в 1955–1957 гг. // Сб. науч. работ Хабаровского н.-и. ин-та эпидемиол. и гигиены. – 1959. – Вып. 5. – С. 177–178. – РЖГеогр., 1961, 3 Д415.
2. Носков А.К., Балахонов С.В., Дугаржапова З.Ф. и др. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям и сибирской язве на территориях Приамурья, пострадавших от паводка 2013 г., и прогноз на 2014 г. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика – 2014. – № 4 (77). – С. 30–33.
3. Wang C.Q., Gao J.H., Li M. et al. Co-circulation of Hantaan, Kenkeme, and Khabarovsk Hantaviruses in Bolshoy Ussuriysky Island, China // Virus Research. – 2014. – Vol. 191. – P. 51–58.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ: НОВЫЕ УГРОЗЫ И МЕРЫ ПО ИХ МИНИМИЗАЦИИ

**С.В. Балахонов¹, Л.В. Щучинов³, Е.П. Михайлов², В.М. Корзун¹, С.А. Косилко¹,
А.И. Мищенко², Е.Н. Рождественский², А.В. Денисов², Г.Х. Базарова², М.Б. Ярыгина¹**

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск;

²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск; ³Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск, Россия

Для современных эпидемических проявлений чумы характерна территориальная приуроченность заболеваний к природным очагам инфекции, а риск заражения напрямую связан с интенсивностью протекания эпизоотий в популяциях носителей, степенью контакта населения с компонентами паразитарных систем природных очагов. Агрессивная интродукция возбудителя чумы основного подвида в поселения серого сурка в Юго-Восточном Алтае привела к существенному увеличению эпидемического потенциала территории. Это проявилось двумя спорадическими случаями заболевания людей бубонной чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай (2014, 2015 гг.) и формированием следующих эпидемиологических рисков: 1. Экспансия возбудителя чумы основного подвида на новые участки в Горно-Алтайском

природном очаге. 2. Реальная угроза заражения чумой населения, проживающего на энзоотичной территории, или лиц, ее посещающих, медицинских работников. 3. Существенное возрастание опасности вывоза чумы за пределы Кош-Агачского района, обусловленное реализацией крупных инвестиционных, туристических и природоохранных проектов на территории природного очага чумы. 4. Вовлечение в эпизоотический процесс верблюдов. 5. Повышение степени угрозы завоза чумы из Монголии как в приграничные районы Республики Алтай, так и в удаленные субъекты Российской Федерации. Сложившаяся ситуация требует реализации риск-ориентированных мер, направленных на оптимизацию мониторинга эпизоотической ситуации в Горно-Алтайском природном очаге чумы, минимизацию угрозы возникновения как спорадических и/или групповых случаев заболевания чумой среди населения Республики Алтай, вывоза этой болезни за пределы Кош-Агачского района и завоза ее из Монголии.

Реализация разработанной программы эпизоотологического обследования природного очага чумы в Кош-Агачском районе и внедрение в практику Алтайской ПЧС нового алгоритма мониторинга эпизоотической ситуации, обусловленного формированием очага смешанного (сурочье-пищухового) типа, уже в 2015 г. дали положительные результаты. Об этом свидетельствует изоляция от серого сурка и его эктопаразитов 17 штаммов чумного микроба основного подвида, а также обнаружение в 34 пробах полевого материала ДНК данного возбудителя. Это позволило оценить реальную интенсивность эпизоотий и пространственное распространение возбудителя чумы основного подвида в природном очаге. На основании анализа полученных данных на территории Горно-Алтайского природного очага выявлен новый (четвертый) мезоочаг (Талдуайрский) в отрогах хребта Чихачева и горного массива Талдуайр. Определены территории высокого риска заражения людей чумой, о чем проинформированы местные органы исполнительной власти, учреждения Роспотребнадзора и здравоохранения.

Для минимизации риска возникновения эпидемических осложнений по чуме на территории республики разработана «Республиканская целевая программа по снижению рисков возникновения эпидемических осложнений на территории Горно-Алтайского природного очага чумы на 2016–2018 годы». Средства, необходимые для ее исполнения, заложены в республиканский бюджет на 2016–2018 гг. и уже частично освоены в 2016 г.

Для повышения эпидемической настороженности специалистов общей медицинской сети и обеспечения раннего выявления больных с подозрением на чуму на всех этапах оказания медицинской помощи для медицинских работников были организованы семинары, на которых в 2015 г. прошли подготовку 568 человек. В ходе тренировочных учений с вводом условного больного проведена оценка готовности 75 лечебно-профилактических учреждений к реализации комплекса противоэпидемических мероприятий при выявлении больных с диагнозом, не исключающим чуму. Для повышения эффективности обучения медицинского персонала специалистами Иркутского противочумного института подготовлен учебный фильм «Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий при выявлении опасного инфекционного заболевания в лечебно-профилактической организации поликлинического профиля», который используется при подготовке медицинского персонала. В 2015 г. информационно-разъяснительной работой в Кош-Агачском районе охвачено более 12 тыс. человек.

Учитывая сложность эпидемической ситуации, существенно увеличен объем противочумной вакцинации населения и расширены подлежащие ей контингенты на территории Кош-Агачского района. Так, количество вакцинированных составило в 2013 г. 809 человек, в 2014 г. – 1857, в 2015 г. – 4163, а в 2016 г. – 5600 человек, или около 30% населения района. На случай обострения эпидемической ситуации создан неснижаемый запас противочумной вакцины в количестве 4000 накожных доз.

Подчеркнем, что спорадических случаев заболеваний чумой на фоне высокой эпизоотической активности очага избежать достаточно сложно, особенно при наличии браконьерского не контролируемого промысла эпидемически значимых животных, в первую очередь сурков. В условиях совершенствования бытовой техники и электрификации отдаленных поселений сформировался новый фактор эпидемического риска распространения чумы, связанный с возможностью длительного сохранения тушек сурков, в том числе и контаминированных чумным микробом, при низкой температуре в условиях бытовых холодильников или морозильных камер. Отметим, что употребление в пищу сурочьего мяса традиционно для коренных жителей Республики Алтай, и, более того, оно является деликатесом и сохраняется для особо торжественных случаев, а также может выступать в качестве подарка уважаемым гостям. Примером возникновения такого риска служат события, связанные со случаями

заболеваний людей в Кош-Агачском районе. Так, три тушки сурков, одна из которых была заражена чумой, изъяты в 2014 г. из холодильника в доме у заболевшего, были специально добыты и хранились для праздничного застолья по поводу встречи сына из армии. В 2015 г. две тушки сурков (заражённые чумным микробом), изъятые из холодильника в доме больного, предназначались для новогоднего праздника. Таким образом, эпидемические осложнения по чуме могут происходить как в нетипичный для этого заболевания сезон года, так и далеко за пределами энзоотичной по чуме территории, где источником может послужить контаминированное чумным микробом мясо сурка. Учитывая это, исполнительной властью республики принято решение о полном запрете охотпромысла сурка на территории Кош-Агачского района.

В связи с интродукцией в экосистему очага чумного микроба основного подвида существенно возрос риск вовлечения в эпизоотический процесс верблюдов, выпасающихся на эндемичной территории, что, в свою очередь, значительно увеличивает опасность возникновения эпидемических осложнений, источником которых может послужить больное или погибшее от чумы животное. Для снижения опасности на постоянной основе организовано ветеринарное наблюдение за этими животными, запрещен их выпас на эпизоотических участках, выделены необходимые средства для организации дезинсекционных мероприятий. В 2016 г. проведена вакцинация всего поголовья верблюдов, выпасающихся на территории природного очага чумы.

На территории Кош-Агачского района реализуются крупные инвестиционные проекты: расширение «Национального парка «Сайлюгемский» и строительство газопровода «Сила Сибири-2» из РФ в КНР. Приоритет туристической отрасли в экономическом развитии Республики Алтай уже отразился на интенсивности миграционных процессов в республике. В туристический сезон 2015 г. Республику Алтай посетило около 1,7 млн человек, в том числе около 15 тыс. – непосредственно Кош-Агачский район. В основном это жители крупных городов Сибири (Новосибирск, Барнаул) и Европейской части России (до 11,5% от общего потока) (Москва, Санкт-Петербург). Все это на фоне высокого риска заражения человека чумой на энзоотичной территории создает реальную угрозу вывоза возбудителя за пределы природного очага в крупные административные центры как на территории Сибири, так и Европейской части России, что может привести к возникновению чрезвычайных ситуаций эпидемиологического характера с серьезным социально-экономическим ущербом. В рамках минимизации этой угрозы на уровне Правительства Республики Алтай определены необходимость согласования туристических маршрутов, организуемых Национальным парком «Сайлюгемский» и проходящих по территории очага чумы, с Алтайской ПЧС, и обеспечение беспрепятственного доступа специалистам для осуществления эпизоотологического мониторинга чумы на территории Национального парка «Сайлюгемский».

В соответствии с вступившим в силу 14.11.2014 г. Соглашением между Правительствами Российской Федерации и Монголии об условиях взаимных поездок граждан этих стран значительно увеличилось количество иностранных граждан, въезжающих в Российскую Федерацию в пункте пропуска «Ташанта» (в два раза). В этих условиях значительно повышается риск завоза возбудителя чумы на территорию Республики Алтай из Монголии, где существуют активные природные очаги этой болезни и практически ежегодно регистрируются спорадические случаи чумы на людях. Для повышения готовности к выявлению подозрительных больных в пункте пропуска через Государственную границу на МАПП «Ташанта» в апреле 2016 г. проведено межведомственное тренировочное учение с вводом условного больного легочной чумой. В ходе его отработан алгоритм действий в случае возникновения чрезвычайной ситуации санитарно-эпидемиологического характера.

Важным направлением работы по снижению риска завоза чумы из Монголии является организация совместного с Национальным центром по изучению зоонозных инфекций Монголии мониторинга эпизоотической ситуации в приграничных районах. В 2015 г. Иркутским НИПЧИ и Алтайской ПЧС разработан проект программы «Изучение современного состояния трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы и снижение возможных эпидемиологических рисков на его территории» и подготовлено его финансовое и материально-техническое обоснование. В настоящее время он включен самостоятельным разделом в программу по развитию сотрудничества с сопредельными государствами для снижения рисков завоза и распространения на территории Российской Федерации чумы из трансграничных природных очагов, представленную для утверждения в Правительство Российской Федерации.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЦЕССА РАЗМНОЖЕНИЯ БЛОХ В ГНЕЗДАХ ГОРНОГО СУСЛИКА В СВЯЗИ С СЕЗОННОЙ СМЕНОЙ НОР ЗВЕРЬКАМИ НА СВОИХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ УЧАСТКАХ

Л.И. Белявцева, Н.В. Цапко, Н.А. Давыдова

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Эпизоотологический мониторинг состояния популяций переносчиков возбудителя чумы на территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага блох горного суслика включает обязательные сборы этих паразитов из гнезд хозяев. Оценка эпизоотической ситуации в очаге невозможна без анализа количественных и качественных показателей состояния микропопуляций блох, населяющих гнезда зверьков. Добытые в гнездах сусликов питавшиеся имаго блох – ценный материал для лабораторного исследования.

Вместе с этим практика эпизоотологического мониторинга показывает, что состав микропопуляций блох гнезд горного суслика, добытых в один и тот же период на территории одной точки обследования, существенно различается по многим параметрам: по обилию (как имаго, так и особей находящихся на преимагинальных фазах развития), физиологическому и возрастному составу паразитов, видовому составу. Различия состава паразитов в гнездах сусликов отмечены во все основные фенологические периоды жизни зверьков и их блох, однако параметры их меняются по сезонам.

Исследования показали, что основной причиной количественных и качественных различий состава микропопуляций паразитов, обитающих в гнездах сусликов, являются особенности фенологии размножения блох в этих гнездах. Возможность размножения паразитов в свою очередь непосредственно зависит от сезонной динамики использования сусликами нор на своих индивидуальных участках.

Период размножения блох, паразитирующих на горных сусликах, совпадает по времени с периодом активной жизни их хозяев (с апреля по сентябрь), однако генеративная активность паразитов в начале и конце этого периода (в условиях низких температур воздуха и почвы) низкая [1]. Процесс размножения блох находится в прямой зависимости от регулярного питания кровососов. Возможно это только в гнездах, где суслики длительно обитают в период активной жизни.

Разнообразие горного ландшафта в Приэльбрусье: экспозиция и крутизна склонов, наличие кормовых угодий и участков с грунтом, пригодным для постройки нор, определяют структуру нор индивидуальных участков и сезонную динамику использования их зверьками. Это в свою очередь отражается на образе жизни блох, обитающих в гнездах сусликов на участках с разной структурой нор.

Индивидуальные участки горных сусликов включают систему нор. Среди них – защитные норы (без гнезд) и норы с гнездами (постоянные и летние). В зимовочных гнездах из постоянных нор суслики проводят зиму в состоянии спячки, в летних гнездах обитают в период активной жизни. Исследования выявили наличие в поселениях горных сусликов в Приэльбрусье участков с постоянными норами простого строения (с одним зимовочным гнездом) и участков со сложными постоянными норами (с несколькими гнездами) [2]. Одно из гнезд – зимовочное, другие используются зверьками как летние.

Большую часть поселений горных сусликов занимают участки с постоянными норами простого строения. В зависимости от расположения плотность зверьков на них различна. На небольших участках с оптимальными условиями для обитания сусликов плотность зверьков высока. Однако основная часть поселений, с постоянными норами простого строения расположена по склонам, где условия обитания грызунов менее благоприятны. Плотность зверьков здесь ниже.

По склонам, на небольших выровненных террасовидных площадках, удобных для норовой деятельности, расположены группировки постоянных нор более сложного строения, с несколькими гнездами, а летние и защитные норы зверьки обычно устраивают ниже террасы с группировкой постоянных нор нескольких зверьков.

На участках с простым строением постоянных нор (как с высокой, так и с низкой плотностью сусликов) сезонная динамика смены нор зверьками сходна. Весной, после выхода из зимней спячки сус-

лики осваивают летние норы на своих индивидуальных участках, а гнезда в этих норах становятся местом постоянного обитания сусликов в течение всего летнего периода. Выводковые гнезда на таких участках самки устраивают в летних норах. Постоянные норы и зимовочные гнезда суслики летом посещают и охраняют, но постоянно там не живут. В период подготовки к зимнему периоду зверьки возвращаются в постоянные норы и обновляют зимовочные гнезда к предстоящей зимней спячке.

На участках с постоянными норами простого строения период высокой генеративной активности блох совпадает с периодом постоянного пребывания сусликов в гнездах из летних нор. В этих гнездах (в результате активного размножения паразитов, особенно в выводковых гнездах) и происходит накопление блох на стадиях преимагинального развития, а после завершения метаморфоза и имаго.

Вследствие того, что в зимовочных гнездах из постоянных нор в летний период паразиты лишены регулярного питания (суслики посещают их только периодически), активность размножения блох низкая. А в сентябре, в период обновления зверьками зимовочных гнезд, генеративная активность паразитов снижается вследствие низких температур.

Таким образом, на участках поселений горных сусликов с постоянными норами простого строения численность имаго переносчиков возбудителя чумы в гнездах из летних нор значительно выше, чем в гнездах из постоянных нор.

На участках с постоянными норами сложного строения сезонная динамика использования гнезд другая. В сложных постоянных норах суслики обитают во все фенотериоды жизни. Происходит только смена гнезд. После выхода из зимней спячки суслики оставляют зимовочные гнезда, и осваивают другие, в этой же норе, используя их как летние (самки – как выводковые). Посещение оставленных зимовочных гнезд, а следовательно, и подкормка блох в них здесь происходит более регулярно. В период подготовки к зимней спячке суслики обновляют бывшие зимовочные гнезда (или устраивают другие, но в этой же норе). Постоянный (в течение всего периода размножения блох) доступ паразитов к питанию способствует активному размножению блох во всех гнездах из сложных постоянных нор и накопление в них особей на стадиях преимагинального развития, а затем и имаго.

Летние норы на таких участках расположены обычно ниже площадок, занятых постоянными норами, ближе к подножью склона. От снега весной они освобождаются на одну – две недели позже, чем террасы с постоянными норами. Освоение летних нор сусликами идет постепенно, активизируясь только с началом расселения молодняка. Так как период постоянного использования гнезд из летних нор зверьками на этих участках непродолжителен (до начала подготовки зимовочных гнезд в постоянной норе), период размножения блох в этих гнездах также невелик. Следовательно, значительного запаса имаго блох в гнездах из летних нор на участках с постоянными норами сложного строения не происходит, численность имаго в гнездах из летних нор заметно ниже, чем в гнездах из сложных постоянных нор.

В течение зимы в гнездах из летних нор (как на участках с постоянными норами простого строения, так и на участках с постоянными норами сложного строения) отмечена большая гибель блох, зимующих на стадии имаго, чем в гнездах со спящими хозяевами.

В сезонном перераспределении имаго блох (в пределах гнезд индивидуального участка сусликов) немаловажное значение имеют видовые особенности приуроченности блох к отдельным элементам микробиотопа. Так, часть имаго блох основного переносчика возбудителя чумы в очаге *Citellophilus tesquorum elbrusensis* (которым характерна выраженная привязанность к шерсти хозяина) перетаскиваются сусликами при сезонной смене нор в гнезда наиболее обитаемые в тот или иной период жизни.

Гнездо хозяина является для блох, паразитирующих на сусликах, местом постоянного обитания, размножения и развития преимагинальных фаз. Различия в сезонной динамике использования сусликами нор на участках с разным строением постоянных нор являются основными причинами различий в процессе размножения блох в этих гнездах и накопления в них имаго паразитов.

В случае совпадения периода длительного пребывания активного суслика в гнезде с периодом активного размножения блох паразиты, питаясь и размножаясь, накапливаются в этих гнездах на стадиях преимагинального развития, а затем и имаго. На участках с постоянными норами простого строения это гнезда из летних нор, на участках с постоянными норами сложного строения – все обитаемые гнезда из постоянных нор.

Библиографический список

1.Белявцева Л. И., Цапко Н. В., Давыдова Н. А. Синхронность фенологии блох сусликов с фенологией их хозяев и проявлением эпизоотической активности природных очагов чумы Северного Кавказа // Материалы международной конференция «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения паразитических членистоногих в XXI веке», памяти чл.-корр. РАН Ю. С. Балашова (г. Санкт-Петербург, 21–25 октября 2013 г.). – СПб: ЗИН РАН, 2013. – С. 31–33.

2.Белявцева, Л. И. Динамика численности блох в гнёздах горного суслика на участках поселений зверьков с разной структурой нор // Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения: Материалы IV Всероссийского Съезда Паразитологического общества при Российской академии наук (20–25 октября 2008, г. Санкт-Петербург). – СПб: Лемма, 2008. – Т. 1. –С. 70–74.

ВЫЯВЛЕНИЕ ХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ КАК «МАРКЕРА» ИММУНОДИФИЦИТА

Л.М. Веркина, Е.А. Березняк, И.Р. Симонова, А.В. Тришина, Л.А. Егиазарян

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Широкая распространённость хеликобактериоза среди населения и пути его передачи позволяют рассматривать хеликобактериоз как инфекционное заболевание, носящее характер эпидемии, что особенно опасно в закрытых (декретированных) коллективах людей. Особенностью патогенеза хеликобактерной инфекции является значительное количество субклинических случаев и, вследствие этого, отсутствие субъективных жалоб на поражение желудочно-кишечного тракта. «Бессимптомная» *H. pylori* инфекция может проявляться не только как гастро-дуоденальная патология, но и быть причастна к нарушениям работы всех систем организма, приводя к снижению массы тела и развитию вторичных иммунодефицитов. Несвоевременная диагностика хеликобактериоза может привести к отдалённым последствиям болезни – раку, лимфоме. В связи с этим необходимо проводить своевременный серологический мониторинг лиц с гастро-дуоденальной патологией, направленный на обнаружение антител к цитотоксину *CagA H. pylori* с целью выявления не только манифестированных, но и скрытых форм хеликобактерной инфекции.

Однако после выявления и эрадикации *H. pylori* из организма возможно повторное заражение посредством двух различных механизмов – реинфекции и рецидивирования. Подтверждением факта реинфекции является наличие геномных различий между прежним и новым штаммами возбудителя, циркулирующими в исследуемом коллективе. Генотипирование штаммов, выделенных от больных по генам вирулентности *H.pylori* (*cagA* и *vacA*) и по *VNTR*-локусам позволит четко дифференцировать случаи реинфекции и реактивации хеликобактерной инфекции. Таким образом, предлагаемый алгоритм исследований (серодиагностика и ПЦР), направленные на активное выявление лиц – носителей возбудителя хеликобактериоза и оценку вирулентности выделенных изолятов *H. pylori*, способствует формированию представления о дальнейшем течении заболевания и является своеобразным «маркером», указывающим на возможность развития иммунопатологии. Своевременная эрадикация возбудителя у инфицированных и соответствующие профилактические мероприятия ограничат распространение *H. pylori* и исключат возможность горизонтальной передачи хеликобактериоза в декретируемых контингентах.

Библиографический список

1. Аркайкина Л. С., Матвеева Л. В., Мосина Л. М. Внегастральные проявления хеликобактериоза // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 8. – С. 87–88.

2. Ford A. C., Forman D., Hunt R. H. et al. Helicobacter pylori eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials // BMJ. – 2014. – Vol. 348: g. –13 p.

3. Najafi M., Sobhani M., Khodadad A. et al. Reinfection Rate after Successful Helicobacter pylori Eradication in Children // Iran J Pediatr. – 2010. – Vol. 20, N 1. – P. 58–62.

ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЕТЕКЦИИ ICE ЭЛЕМЕНТА *VIBRIO CHOLERAЕ* ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, С.В. Титова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Integrative Conjugative Elements (ICEs) представляют собой мобильные генетические элементы размером от 79 до 108 kb, способные интегрироваться в состав хромосомы хозяина и передаваться путем конъюгации. Эти элементы содержат свыше 50 генов, включая гены, детерминирующие процесс конъюгации, интеграции, продукцию токсинов, устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, ДНК-азы и др. [1]. У холерного вибриона первый ICE был описан в 1992 г. под названием *SXT/R391* элемента. В настоящее время по итогам секвенирования предложено несколько классификаций ICE, выделяющих свыше десяти основных типов [2, 3].

В настоящее время подавляющее большинство вспышек холеры во всем мире вызвано токсигенными штаммами, содержащими ICE элементы разных типов. Это способствовало началу изучения этой структуры и у нас в стране [4, 5]. Это делает целесообразным введение анализа на наличие ICE элемента в практику молекулярного мониторинга за холерой.

Цель работы – с помощью компьютерного анализа локальной базы данных полногеномных сиквентов *V. cholerae* O1 и неO1/неO139 и ПЦР на коллекции штаммов различного происхождения оценить возможность использования детекции ICE элемента и его типирования в практике эпиднадзора за холерой.

ПЦР *in silico* проводили согласно описанному алгоритму [6] с использованием локальной базы данных неполных геномов *Vibrio cholerae*. Глубину секвенирования и репрезентативность данных анализировали с помощью авторской программы *SegAnalyzer*. Для работы *in silico* и ПЦР *in vitro* использовали систему праймеров (пары родových для выявления ICE элемента и трех пар видовых) для выявления и типирования ICE элемента с помощью мультиплексной ПЦР [2]. Коллекция изученных штаммов включала 222 культуры сероваров O1, O139 и неO1/неO139, выделенных в различные сроки в различных регионах РФ и мира.

Результаты виртуальной ПЦР *in silico* на наличие ICE элемента и его типы, проведенные на локальной базе из 395 полногеномных нуклеотидных последовательностей *V. cholerae* сероваров O1 и неO1/неO139, свидетельствовали о широком распространении ICE элемента у токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae* серовара O1. При этом все ICE элементы успешно типировали использованной системой праймеров на три основных типа: Индийский, Мозамбикский и *SXT*. Эти данные согласуются с мнением о существовании трех типов ICE элемента [3] и позволяют упростить молекулярное генотипирование при практическом использовании метода.

Отсутствие ICE элемента у части изученных токсигенных штаммов можно объяснить их ранним сроком выделения до наступления этапа приобретения ICE элемента [1, 3]. Интересно, что 40% атоксигенных штаммов O1 серовара и штаммы неO1/неO139 несли ICE элемент.

Результатом следующего этапа работы был анализ с помощью ПЦР коллекции штаммов, выделенных на территории РФ для выявления и типирования ICE элемента. Токсигенные штаммы, лишенные ICE элемента, были выделены в период эпидемических осложнений 1965–1974 годов, т.е. до момента приобретения этой генетической структуры холерным вибрионом [1]. Все токсигенные штаммы последующих сроков изоляции содержали ICE. При этом все выявленные нами ICE элементы, обнаруженные у O1 *ctx+tcpA+* штаммов, были успешно идентифицированы до вида, что совпало с нашими данными типирования *in silico* и свидетельствует о достаточной разрешающей способности использованного нами метода типирования.

Все атоксигенные O1, O139 и неO1/неO139 штаммы, выделенные на территории РФ, лишены ICE элемента, что отличает от штаммов, циркулирующих в эндемичных по холере регионах, где по данным ранее проведенного типирования *in silico* 40% штаммов содержит анализируемый фрагмент ДНК. Это наблюдение позволяет рассматривать наличие ICE элемента как новый эпидемический маркер «заносных штаммов» холерных вибрионов. Полученный результат совпадает с данными недавнего ис-

следования, когда из 10 изученных неO1/не O139 штаммов, выделенных из судовых балластных вод, у 7 культур был обнаружен специфический фрагмент интегразы, что прямо свидетельствовало о наличии ICE элемента. Это позволило авторам сделать вывод о заносной природе подобных штаммов [5].

На основании проделанной работы можно сделать выводы, что ICE элемент является информативным генетическим маркером токсигенных штаммов *V. cholerae*, а для молекулярного типирования ICE элемента достаточно определения двух основных типов. Кроме того, отсутствие ICE элемента у атоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных в РФ, позволит использовать выявление ICE элемента как признак, характерный для «заносных» штаммов.

Библиографический список

1. Mutreja A., Kim D. W., Thomson N. et al. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, N 7365. – P. 462–465.
2. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M. M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants // *J. Microbiol. Methods*. – 2012. – Vol. 88. – P. 98–102.
3. Marin M. A., Fonseca E. L., Andrade B. N. et al. Worldwide Occurrence of Integrative Conjugative Element Encoding Multidrug Resistance Determinants in Epidemic *Vibrio cholerae* O1 // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9, N 9. – e108728.
4. Подшивалова М. В., Кузютина Ю. А., Захарова И. Б. и др. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы sxt-типа // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2014. – № 3. – С. 34–39.
5. Захарова И. Б., Водяницкая С. Ю., Подшивалова М. В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae* NON-O1/NON-O139, выделенных из балластных вод судов и акватории портов Ростовской области // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 2015. – № 3. – С. 47–50.
6. Водопьянов А. С., Водопьянов С. О., Олейников И. П., Мишанькин Б. Н. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквентов ДНК штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 // *Здоровье населения и среда обитания*. – 2013. – № 3. – С. 28–31.

ЭНТЕРОВИРУСЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2007–2015 гг.

Л.Н. Голицына, В.В. Зверев, Н.А. Новикова

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Энтеровирусы (ЭВ) (более 100 представителей видов Энтеровирус А, В, С и D, рода *Enterovirus*, сем. *Picornaviridae*), входят в ряд самых распространенных и значимых возбудителей инфекционных заболеваний человека, характеризующихся полиморфизмом клинической картины. ЭВ являются основными этиологическими агентами серозного менингита (СМ) и ящуроподобного синдрома (энтеровирусной экзантемы).

В XXI веке в странах Европы (в том числе и РФ), Азии и Тихоокеанского региона наблюдается значительный рост заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ).

В России показатели регистрируемой заболеваемости ЭВИ и энтеровирусным менингитом введены в официальную статистическую отчетность в 2006 г.

В нашем исследовании в рамках работы референс-центра по мониторингу ЭВИ проводились типирование, изучение генетического разнообразия и анализ филогенетических взаимосвязей неполиомиелитных ЭВ, выявленных в образцах биоматериала от 5417 пациентов с различными клиническими проявлениями ЭВИ и в пробах 409-ти ООС, собранных в различных регионах России в 2007–2015 гг. Работу проводили при тесном взаимодействии с Управлениями Роспотребнадзора и Центрами гигиены и эпидемиологии (ЦГиЭ) в субъектах РФ, Дальневосточным научно-методическим центром по изучению ЭВИ (на базе Хабаровского НИИ эпидемиологии и микробиологии), НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (г. Санкт-Петербург).

Определение типа энтеровирусов проводили методом частичного секвенирования области VP1 генома [9] в собственной модификации.

Неполиомиелитные ЭВ были типированы в 2604 случаях. Идентифицировано 52 типа неполиомиелитных ЭВ: вирусы вида Энтеровирус А: Коксаки А2–6, 8, 10, 14, 16, ЭВА71, ЭВА76, ЭВА120; вирусы вида Энтеровирус В: Коксаки А9, Коксаки В1–5, ЕСНО 1-7, 9, 11, 13–19, 21, 25, 29, 30, 31, 33, ЭВВ75; вирусы вида Энтеровирус С: Коксаки А1, 13, 17, 19, 20, 21, 22, 24, ЭВ99, ЭВ113, ЭВ116. Ежегодно выявляли около 30 типов неполиомиелитных ЭВ, при этом многие типы энтеровирусов характеризовались наличием нескольких одновременно циркулирующих геновариантов. Установлены этиологические агенты 114 групповых заболеваний ЭВИ.

За исследуемый период наиболее высокие показатели заболеваемости энтеровирусным менингитом в РФ регистрировали в 2008–2009 и 2013 гг.; при этом в 2013 г. увеличение заболеваемости как СМ, так и ЭВИ в целом было многократным, а в эпидемический процесс было вовлечено большинство субъектов РФ [5]. Оба пика заболеваемости энтеровирусным менингитом были связаны с вирусом ЕСНО30. При этом в 2007–2009 гг. циркулировал вирус ЕСНО30 генотипа еС2 [6], а в 2013 г. активизировался вирус ЕСНО30 генотипа h, представленный новым эпидемическим вариантом E30-h/2013RU1, [1]. Распространение эпидемического варианта E30-h/2013RU1, сопровождавшееся повышением заболеваемости ЭВИ и СМ в отдельных субъектах РФ, продолжилось в 2014–2015 гг. [4]. В годы с относительно низкими показателями заболеваемости эпидемический процесс СМ поддерживался другими представителями вида Энтеровирус В. В разное время на большинстве обследованных нами территорий Европейской части России помимо вируса ЕСНО30 наблюдалась активизация циркуляции вирусов: ЕСНО9 – в 2009–2010 г., Коксаки А9 – в 2010 – 2011 гг., ЕСНО6 – в 2011 – 2012 г., Коксаки В1 – в 2012 г., ЕСНО11 – в 2012 и 2014 гг., Коксаки В5 – в 2014 – 2015 гг., Коксаки В3 в 2015 г. При изучении очагов серозного менингита идентифицировали вирусы ЕСНО30, ЕСНО6, ЕСНО9, Коксаки В5, Коксаки А9, ЕСНО4, ЭВВ75 [2, 6].

В 2010 г. в ряде субъектов РФ была отмечена активизация циркуляции вирусов вида Энтеровирус А [6]. Эти вирусы, в том числе ЭВА71, который на сегодняшний день считается наиболее патогенным среди неполиомиелитных ЭВ, являются основными возбудителями герпангины и энтеровирусной экзантемы полости рта и конечностей. Начиная с 2010 г. в разных регионах России ежегодно регистрируются случаи групповой заболеваемости экзантемой, герпангиной и ОРВИ, связанные с вирусами Коксаки А16 и Коксаки А6, Коксаки А10, Коксаки А5, Коксаки А2 [2], с 2011 г. доля энтеровирусов вида А, в структуре вирусов, идентифицируемых нами при спорадической заболеваемости ЭВИ, превышает 25% (рис. 1).

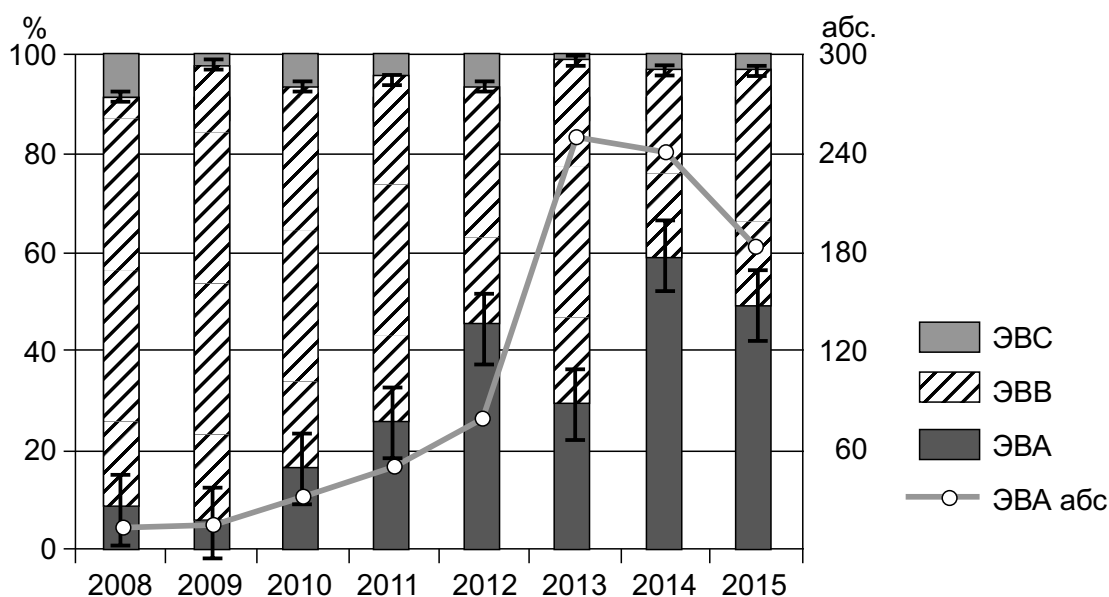


Рис. 1. Выявление ЭВА в абсолютных числах и в соотношении с ЭВВ и ЭВС в 2008–2015 гг.

В 2014 г. на фоне снижения общей активности циркуляции ЭВ вида В, и ЭВ71 доминирующее положение (39,1%) среди всех типированных НПЭВ занял вирус Коксаки А6, циркуляция которого была зафиксирована в 18 субъектах РФ. Начиная с 2008 г. активизация циркуляции этого вируса, связанная с формированием нового, динамично эволюционирующего эпидемического генотипа, для которого характерно атипичное и более тяжелое проявление инфекции, отмечается в странах Юго-Восточной Азии и Европы [8]. В России в 2014 г было дифференцировано 6 субгенотипов этого эпидемического варианта Коксаки А6 [3]. В 2015 г. доля вируса Коксаки А6 среди всех типированных ЭВ также была значительной (14.5%). Таким образом, именно вследствие активизации вируса Коксаки А6 в 2014 – 2015 гг. и других ЭВА в 2015 г. в целом по России сохранился относительно высокий уровень заболеваемости энтеровирусной экзантемой, герпангиной и малыми формами ЭВИ.

России сохранился относительно высокий уровень заболеваемости энтеровирусной экзантемой, герпангиной и малыми формами ЭВИ.

Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основе анализа частичной (306 н. о.) последовательности области VP1 генома российских и зарубежных изолятов ЭВ71 генотипа С4. Звездочками отмечены узлы с апостериорной вероятностью выше 0,95.

AF135934 CHN 1987

5

1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015

KJ400360 Rostov 2013
1025 Rostov 2013
KJ645805 RUS 2013
KJ645812 RUS 2013
226-15 Omsk 2014
1319 Voronezh 2015
1452 14 Omsk 2013
KJ645802 RUS 2013
KJ645797 KAZ 2012
JX509927 CHN 2011
KM260009 1906-Henan CHN 2010
JN579911 CHN 2010
GU353080 CHN 2009
KJ645808 RUS 2013
4125 Saratov 2013
2051 Astrahan 2013
2336 Stavropol 2012
4542 Volgograd 2013
KJ645798 RUS 2012
JQ766144 CHN 2011
JQ639016 CHN 2010
GQ121421 CHN 2008
4293/500-Hab/EAR 2013
4292/445-Hab/EAR 2013
KF142415 CHN 2012
KF853494 CHN 2010
JX203281 TR126 CHN 2011
KP308406 KHM397 Cambodia 2012
2456 Krasnodar 2013
4547 Volgograd 2013
3358 Bashkort2013
KF853493 CHN 2010
1651 Kursk 2014
KJ784496 HuzhouE696 CHN 2012
KM260054 152-Henan CHN 2014
KF925277_FL008T/AH CHN 2011
587 Omsk 2016
KU595901 FJQ2003/CHN 2015
KU726187 561-2014-HenanCHN 2014
KT177886 13MA242 08 TZ CHN 2013
KT177841 12ME12 07 TZ CHN 2012
JN256063 CHN 2009
KC222960 VNM 2011
JN579935 CHN 2010
JQ973704 RUS 2011
FJ785421 CHN 2008
1921 Rostov/Tag 2015RU7
KM402021 S0102b CHN 2013
KM260024 1576-Henan CHN 2012
EU753388 CHN 2007
KC866703 CHN 2009
EU729117 KOR 2007
AB433872 JPN 2006
HQ676196 JPN 2005
KC436267 Hong Kong 2006
HQ676185 CRO 2005
HQ647171 CAN 2006
FN675346 AUT 2004
FN598741 FRA 2004
FN649252 GER 2004
AB465416 JPN 2003
AY465356 C4 CHN 1998
JQ742002 4b CHN 2001
GU350629 CHN 2008

RU1
RU2
RU3
RU4
RU5
RU6
RU7
RU8
RU9

C4a

Заключение

1. В результате 9-летних наблюдений за циркуляцией неполиомиелитных энтеровирусов в РФ изучено генетическое разнообразие современной вирусной популяции, представленной 52 типами.
2. Самые значительные подъемы sporadic и вспышечной заболеваемости ЭВИ и серозным менингитом, зарегистрированные в РФ в 2008–2009 и 2013 гг., были обусловлены активизацией циркуляции и формированием эпидемических вариантов вируса ЕСНО30.
3. Начиная с 2010 г. в РФ наблюдается активизация циркуляции энтеровирусов вида Энтеровирус А – основных возбудителей энтеровирусной экзантемы/герпангины. Наибольшая настороженность должна быть сохранена в отношении ЭВ71, как наиболее патогенного среди неполиомиелитных ЭВ, и вируса Коксаки А6, который в результате динамичной молекулярной эволюции сформировал новый эпидемический вариант.
4. Актуальные в настоящее время эпидемические типы ЭВ требуют непрерывного мониторинга и, в случае дальнейшего сохранения активности циркуляции и повышения вирулентности, разработки специфических средств профилактики

Библиографический список

1. Голицына Л.Н., Новикова Н.А., Фомина С.Г. и др. Молекулярная характеристика эпидемического варианта вируса ЕСНО30-2013 // Молекулярная диагностика-2014: Сб. трудов VIII Всерос. науч. –практ. конф. с междунар. участием / Под ред. В.И. Покровского. – М., 2014. – Т.1. – С. 416–417.
2. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Новикова Н.А. Эпидемические варианты неполиомиелитных энтеровирусов в России // Медицинский альманах – 2015. – Т. 5, № 40. – С. 136–140.
3. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Парфенова О.В. и др. Вирус Коксаки А6 в Российской Федерации в 2014 году // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. – № 28. – С. 12–20.
4. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Сашина Т.А. и др. Распространение эпидемического варианта вируса ЕСНО30 E30h/2013RU-1 в Российской Федерации в 2014–2015гг. // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: Материалы Всероссийской научно-практической конференции (25 мая 2016 г., Нижний Новгород) / Под. ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород: типография «Растр-НН», 2016. – С.41–43.
5. Морозова Н.С., Чернявская О.П., Михайлова Ю.М. и др. Энтеровирусная (неполио) инфекция в Российской Федерации в сезон 2013 года // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – №10. – С. 34–37.
6. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Фомина С.Г., Ефимов Е.И. Молекулярный мониторинг неполиомиелитных энтеровирусов на территории России в 2008–2011 гг. // Журн. микробиол. – 2013. – № 1. – С. 75–78.
7. Akhmadishina L.V., Ereemeeva T.P., Trotsenko O.E. et. al. Seroepidemiology and molecular epidemiology of Enterovirus 71 in Russia // PloS One. – 2014. – Vol. 9, N 5: e97404.
8. Bian L., Wang Y., Yao X. et al. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2015. – Vol. 13, N 9. – P. 1061–1071.
9. Nix W.A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 2698–2704.
10. Yip C.C., Lau S.K., Woo P.C., Yuen K.Y. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? // Emerg. Health Threats J. – 2013. – Vol. 6:19780.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ.

Г.М. Дмитриева, Н.Д. Орешкина, А.А. Метелёв

Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю, Красноярск, Россия

В течение последних 3-х лет ситуация по туберкулезу в Красноярском крае стабилизирована, но показатели эпидемического процесса остаются на высоком уровне. Заболеваемость всеми формами туберкулеза за 3 года снизилась на 6,5% и составила за 2015 г. 88,6 случаев на 100 тыс. человек населения (за 2014 год в крае – 91,4; в СФО – 98,8; в РФ – 60,0 на 100 тыс. человек населения).

По-прежнему среди впервые выявленных случаев туберкулеза 96,8% составляет туберкулез органов дыхания, на другие локализации туберкулеза в структуре заболевших приходится менее 4,0%. Среди впервые зарегистрированных больных туберкулезом лица из мест лишения свободы составляют 12,3% (в 2013 г. – 10,0%, в 2014 г. – 12,0%).

Наибольшие уровни заболеваемости туберкулезом отмечаются в возрастной группе от 25 до 54 лет (около 70,0% от общего количества заболевших).

Заболеваемость туберкулезом детского населения по сравнению с 2014 г. уменьшилась и составила в 2015 г. 18,5 случаев на 100 тыс. детского населения (заболеваемость детей в 2014 году в Красноярском крае – 30,4 на 100 тыс. детского населения, в СФО – 26,2; в РФ – 13,2 на 100 тыс. детского населения).

Всего в противотуберкулезных учреждениях Красноярского края по состоянию на 01.01.2016 состоит на учете 5654 больных активными формами туберкулеза, распространенность туберкулезом составила 210,1 на 100 тыс. населения, за 3 года болезненность туберкулезом в крае снизилась на 14,0% (в 2013 г. – 244,3 на 100 тыс. населения). Туберкулез органов дыхания в структуре болезненности составляет 95,3%, из них 39,7% с бактериовыделением, число бактериовыделителей уменьшилось за 3 года на 241 человек и по состоянию на 01.01.2016 составило 2242 человека.

Наряду с уменьшением общего числа бактериовыделителей возрастает проблема распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью, когда возбудитель туберкулеза устойчив по меньшей мере к двум противотуберкулезным препаратам первой линии – изониазиду и рифампицину. Общее число больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью в Красноярском крае по состоянию на 01.01.2016 составило 1097 человек (в 2013 году – 1114 человек).

За 3 года возросло количество больных сочетанной патологией (ВИЧ-инфекция и туберкулез), число таких больных по состоянию на 01.01.2016 составляет 836 человек (29,3 на 100 тыс. населения). Лечение туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией и множественной лекарственной устойчивостью значительно длительнее, а также в десятки и сотни раз дороже.

Смертность от туберкулеза в крае снизилась по сравнению с 2013 годом на 14,3% и по предварительным данным за 2015 год составляет 15,0 случаев на 100 тыс. человек населения (за 2014 год в СФО – 18,3, в РФ – 10,0 случаев на 100 тыс. человек населения). В 2015 году случаев смерти детей от туберкулеза в Красноярском крае не зарегистрировано.

По итогам 2015 года охват населения профилактическими осмотрами на туберкулез увеличился и составил 73,1% от всего населения (в 2013 году – 69,0%).

Внедрение молекулярно-генетического метода ускоренной диагностики туберкулеза позволило улучшить качество микробиологической диагностики туберкулеза, на что указывает увеличение соотношения больных, выделяющих микобактерии туберкулеза и имеющих полость распада, в 2015 г. составило 123,0% (в 2011 году – 102,0%).

Выполнение плана профилактических прививок против туберкулеза на территории Красноярского края в 2015 г. среди новорожденных детей составило 95,7%, что позволяет обеспечить защиту этой группы детей от туберкулезного сепсиса.

Таким образом, туберкулез остается актуальной проблемой здравоохранения Красноярского края и требует проведения адекватных профилактических и надзорных мероприятий.

Библиографический список

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Красноярском крае в 2015 году: Государственный доклад. – Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Красноярскому краю, 2015. – 317 с.

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ОПТИМИЗАЦИИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫМИ ТРЕМАТОДОЗАМИ

А.Г. Драгомерецкая, О.Е. Троценко

*ФБУН Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия*

Совокупность природных факторов Приамурья создает благоприятные условия для обитания промежуточных, дополнительных и дефинитивных (диких) хозяев трематод – *Nanophyetus salmincola schikhobalowi*, *Metagonimus yokogawai*, *M. katsuradai*, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani ichunensis*. Приверженность местных жителей к употреблению рыбы в сыром и малосоленном виде обеспечивает высокий уровень пораженности трематодами населения на отдельных территориях и делает возможным заражение вне очагов [3, 5]. Поэтому наряду с гельминтозами, обычными для других районов России (аскаридозом, трихинеллезом и другими) на Дальнем Востоке России широкое распространение получила группа зоонозных биогельминтозов (клонорхоз, нанофиетоз, метагонимоз и парагонимоз), геогенетически связанных с районами Юго-Восточной Азии и не встречающихся в России за пределами Приамурья. Очаги указанных выше трематодозов локализируются на территориях РФ, которые в административном отношении входят в состав Приморского и Хабаровского краев, Сахалинской, Амурской и Еврейской автономной областей.

На основе стандартов и алгоритмов эпидемиологического надзора за другими широко распространенными паразитами, предложенных С.А. Амиреевым с соавторами [7], нами были разработаны эпидемиологические, клинические и лабораторные критерии выявления случаев дальневосточных трематодозов (табл. 1, 2), а также схемы обследования очагов, оптимизации эпидемиологического надзора за инвазией и проводимых профилактических мероприятий.

Таблица 1.

Эпидемиологические предпосылки возникновения случаев клонорхоза, нанофиетоза, парагонимоза, метагонимоза и характеристика эпидемического процесса этих паразитарных заболеваний

Эпидемиологические предпосылки	Проживание на эндемичной территории; Пребывание в эндемичных по <i>C.sinensis</i> , <i>N.s.schikhobalowi</i> , <i>M.yokogawai</i> , <i>M.katsuradai</i> , <i>P.w.ichunensis</i> регионах; Принадлежность к группе риска; Употребление сырой, малосоленной и недостаточно термически обработанной рыбы, раков, мяса кабана.
Резервуар и источник инвазии	Рыбоядные домашние и дикие млекопитающие; Человек, выделяющий с фекалиями яйца гельминтов.
Пути передачи	Алиментарный (пищевой)
Факторы передачи	Недостаточно термически обработанная рыба; Недостаточно просоленная и вяленая рыба; Сырые раки и пресноводные крабы; Недостаточно термически обработанное мясо кабана
Группы риска	Профессиональные рыбаки и любители; Работники речного флота; Коренное население с кулинарными традициями сыроядения рыбы; Охотники.

Учитывая эпизоотический характер циркуляции возбудителей трематодозов на большей части ареала, главное внимание в системе профилактических мероприятий должно уделяться снижению риска заражения населения. Поэтому основные мероприятия по профилактике дальневосточных трематодозов направлены на изменение пищевых привычек населения, способствующих уменьшению числа случаев употребления необеззараженной рыбы в сыром или малосоленом виде, и соблюдению норм термической и других видов обработки рыбы при приготовлении блюд из нее.

Алгоритм эпидемиологического обследования очага включает в себя выяснение обстоятельств заражения населения для предотвращения инвазирования людей, оказавшихся в зоне риска, опрос и лабораторное обследование лиц из групп риска. При этом обязателен отбор проб из внешней среды и от лиц с подозрением на инвазию, которые проводятся для выяснения путей и факторов передачи инвазии, поиска источников фекального загрязнения водоемов, назначения соответствующих профилактических и противоэпидемических мероприятий.

В системе профилактических мероприятий одно из ведущих мест занимает экспертиза рыбы на паразитологическую безопасность. Лидером среди дальневосточных трематод по показателям экстенсивности инвазии (ЭИ) и интенсивности инвазии (ИИ) рыб является возбудитель нанофиетоза - *N. s. schikhobalowi*. ЭИ этим возбудителем у отдельных видов рыб достигает 100%, а ИИ исчисляется несколькими тысячами паразитов у одной особи промыслового размера [1]. При этом в соответствии с существующими методическими указаниями [4] определение ИИ исследуемой особи требовалось проводить путем подсчета числа метацеркарий в вырезке из средней трети спины рыбы, что, по данным наших исследований, не позволяло оценить ИИ *N. s. schikhobalowi* ввиду особенностей их локализации в теле лососеобразных рыб. Полученные нами данные о локализации 51% метацеркарий *N. s. schikhobalowi* в почках лососеобразных рыб [1] позволили произвести расчет ИИ исследуемой особи, используя число метацеркарий, обнаруженных в этих органах. Поэтому для приблизительного определения интенсивности инвазии у лососеобразных рыб промыслового размера нами предложено использовать формулу: $I = 2n$, где I – интенсивность инвазии исследуемой особи, n – число метацеркарий, обнаруженных в почках.

Таблица 2.

Стандартное определение случая клонорхоза, нанофиетоза, метагонимоза, парагонимоза

Нозоформа	Предположение на случай: заболевание, протекающее с нижеприведенными клиническими симптомами:	Вероятный случай: заболевание, соответствующее предположению на случай, наличие эпидемиологических предпосылок и нижеперечисленное:	Подтвержденный случай: заболевание, соответствующее определению предположения и/или вероятного случая и нижеперечисленное:
Клонорхоз	Боль в правом подреберье, чувство тяжести и боли в эпигастрии, тошнота. Горечь во рту. Увеличение печени и селезенки	Употребление в пищу недостаточно термически обработанной рыбы семейства карповых (язь амурский, карась, сазан, верхогляд, толстолоб).	Обнаружение яиц <i>C. sinensis</i> в кале, дуоденальном содержимом при паразитологическом исследовании.
Нанофиетоз	Боли в эпигастриальной области, диарея. Головные боли и головокружение, кожный зуд, общая слабость, обложенный язык.	Употребление в пищу недостаточно просоленной и термически обработанной рыбы отряда лососеобразных (ленки, хариус, таймень).	Обнаружение яиц <i>N. s. schikhobalowi</i> в кале при копроовоскопическом исследовании.
Метагонимоз	Обнаружение яиц <i>N. s. schikhobalowi</i> в кале при копроовоскопическом исследовании.	Употребление в пищу недостаточно просоленной и термически обработанной рыбы бассейна р. Амур.	Обнаружение яиц <i>Metagonimus</i> spp. в кале при копроовоскопическом исследовании.
Парагонимоз	Лихорадка, одышка, кашель с гнойной мокротой с примесью крови; боли в груди.	Употребление в пищу сырых или недостаточно термически обработанных раков, пресноводных крабов, мяса кабана.	Обнаружение яиц <i>P. w. ichunensis</i> в мокроте, кале при паразитологическом исследовании.

При использовании предложенного метода трудозатраты на проведение тестирования существенно снижаются (в 3–12 раз) и в 6–10 раз сокращается время исследования [2]. Усовершенствованный таким образом способ исследования защищен патентом на изобретение № 2549949.

Значимая роль в системе профилактических мероприятий отводится санитарному просвещению населения. При всех формах санитарно-просветительной работы проводится разъяснение населению о необходимости обеззараживания рыбы от личинок трематод в домашних условиях. В дополнение к общеизвестным мерам санитарного просвещения [6] нами рекомендовано не использовать в пищу мышцы плавников пресноводных лососеобразных рыб, тщательно вычищать почки при разделке рыбы; промывать и высушивать посуду и инструменты (разделочные доски, ножи).

Библиографический список

1. Драгомерецкая А.Г., Зеля О.П., Троценко О.Е. Оценка инвазированности лососеобразных рыб метацеркариями *Nanophyetus salmincola schikhobalowi* (Skrjabin et Podjapolskaja, 1931) в реках Хабаровского края // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2014. – № 3. – С. 25–29.
2. Драгомерецкая А.Г., Троценко О.Е., Зеля О.П. Оптимизация метода исследования инвазированности лососеобразных рыб метацеркариями возбудителя нанофиетоза // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 11. – С. 49–52.
3. Драгомерецкая А.Г., О.П. Зеля, О.Е. Троценко, Иванова И.Б. Социальные факторы функционирования очагов нанофиетоза в Приамурье // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2014. – № 4. – С. 23–28.
4. Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки: МУ 3.2.988-00.
5. Посохов П.С. Биолого-эпидемиологическая характеристика очагов эндемичных трематодозов человека на Дальнем Востоке в связи с перспективой их оздоровления: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. – М., 1984. – 47 с.
6. Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. Приложение 3. Профилактика гельминтозов, передающихся через рыбу, ракообразных, моллюсков, земноводных, пресмыкающихся и продукты их переработки: Санитарные правила. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 47 с.
7. Стандарты и алгоритмы мероприятий при инфекционных и паразитарных болезнях. Т. 2. Практическое руководство / под редакцией С.А. Амиреева, Т.А. Муминова, В.П. Сергиева, К.С. Оспанова. – Алматы: Люкс Биндер Сервис, 2008. – 845 с.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РАСШИФРОВКА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ВЗРОСЛЫХ: ВЫЯВЛЕНИЕ СМЕНЫ ДОМИНИРУЮЩИХ ГЕНОТИПОВ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ

**Е.В. Жираковская¹, С.Н. Соколов², Д.В. Капустин³, Е.В. Фаст⁴, О.Б. Шеронова⁴,
Е.И. Краснова³, Н.В. Тикунова¹**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ³ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»; ⁴ГБУЗ НСО «Государственная инфекционная клиническая больница №1», Новосибирск, Россия

Острые кишечные инфекции (ОКИ) остаются актуальной проблемой здравоохранения во всех регионах мира. Имея высокую эпидемиологическую, социальную и экономическую значимость, ОКИ стабильно удерживают второе место в структуре инфекционной заболеваемости после инфекций дыхательных путей. За последние 10 лет в Российской Федерации отмечается тенденция к увеличению числа регистрируемых случаев ОКИ, связанная с улучшением их диагностики. В 2013 и 2014 гг. заболеваемость ОКИ в Новосибирской области (НСО) составляла 707,84 и 723,64 на 100 тыс. населения

соответственно и превышала средние показатели по РФ (551,9 и 548,9 на 100 тыс. населения) [1, 2]. Следует отметить, что в 2014 г. доля ОКИ неустановленной этиологии в НСО составила 72,2% и также превышала средний показатель по РФ – 64,9%. Наиболее высокие показатели заболеваемости ОКИ приходятся на детей до 17 лет. Тем не менее в НСО в 2014 и 2015 гг. на долю взрослых приходилось около 40% от всей заболеваемости ОКИ неустановленной этиологии [1, 2].

Спектр возбудителей ОКИ очень разнообразен и включает бактерии, простейших и вирусы из различных таксономических групп. Этиологическая структура ОКИ определяется возрастом госпитализированных больных, эпидемиологической ситуацией и социально-экономическими условиями жизни. Вирусные ОКИ у взрослых мало изучены. У человека в течение жизни формируется иммунитет к большинству циркулирующих на данной территории возбудителей, поэтому зачастую вызвать заболевание, требующее госпитализации, у взрослого может вирус редкого или нового генотипа. Взрослые также могут быть латентными вирусоносителями и являться источниками инфицирования не только членов семьи, но и других людей, с которыми они контактируют на рабочем месте или в социальной сфере. В задачи данного исследования входило определение этиологической структуры ОКИ при спорадической заболеваемости взрослых, а также генотипирование выявленных изолятов вирусных возбудителей.

В исследование были включены 305 больных ОКИ в возрасте от 15 до 87 лет, госпитализированных в ГИКБ № 1 Новосибирска в 2016 г. Ранее было показано, что спорадическая заболеваемость ОКИ в Сибири наблюдается в течение всего года с сезонным повышением в зимне-весенние месяцы [3–5], поэтому был оценен вклад различных патогенов в этиологию ОКИ у взрослых, госпитализированных с января по апрель. Стандартный алгоритм обследования всех больных включал в себя бактериологическое исследование фекалий для выявления сальмонелл, шигелл и условно патогенной микрофлоры, а также копроскопию. В первые сутки от момента госпитализации собирали и замораживали образцы фекалий для дальнейшего их исследования на наличие вирусных агентов. Выявление РНК ротавирусов группы А (*HRVA*) и группы С (*HRVC*), норовирусов второго генотипа (*HNoV GII*) и астровирусов (*HAstV*) проводили методом ПЦР с использованием набора специфических праймеров, разработанных в лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН.

Анализ полученных данных показал, что доля этиологически уточненных диагнозов ОКИ составила 38,4% (117/305). Среди ОКИ установленной этиологии преобладали вирусные инфекции (67/117; 57,3%), бактериальные инфекции составили 35,1% (41/117), а простейший паразит *Entamoeba histolytica* был выявлен в 5% (6/117).

Наиболее часто встречающейся бактериальной инфекцией у взрослых пациентов был сальмонеллёз (28/41; 68,3%). В этиологической структуре сальмонеллёзов преобладали *S. enteritidis* (22/28; 78,6%), доля *S. nigeria* составила 10,7% (3/28), *S. typhimurium* – 7,1% (2/28) и *S. virchow* – 3,6% (1/28). У трех пациентов была дизентерия, вызванная в 2-х случаях *S. flexneri*, а в третьем – *S. sonnei*. Другие уточненные бактериальные инфекции составили 17,9%, в том числе вызванные *Staphylococcus aureus* (4/41; 9,6%), *Klebsiella pneumoniae* (4/41; 9,6%) и *E. faecalis*.

В структуре ОКИ вирусной этиологии норовирусная инфекция составила 59,7% (40/67), ротавирусная – 40,3% (27/67) и астровирусная – 8,9% (6/67). У 3-х пациентов наблюдалась инфекция сочетанной этиологии: *NoV GII+S. enteritidis* и *NoV GII+S. aureus*. Выявленные изоляты вирусов были охарактеризованы методом прямого секвенирования соответствующих фрагментов геномов.

Анализ последовательностей фрагментов двух генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) и капсидный белок VP1, показал, что преобладающими были HNoV генотипа GII.P17-GII.17 (25/40; 62,5%), далее следовал генотип GII.Pe-GII.4 вариант *Sydney* (8/40; 20%), и в единичных случаях были определены генотипы GII.P7/GII.14 и GII.P7/GII.6. Наблюдение за циркуляцией HNoV GII на территории НСО нами ведется с 2003 г. [3, 4]; до 2016 г. HNoV GII.P17-GII.17 и GII.P7/GII.14 не выявлялись. Полученные в данном исследовании данные подтверждают информацию о том, что HNoV нового генотипа GII.P17-GII.17 стали доминирующими во многих странах мира и заменили доминирующий до этого генотип GII.Pe-GII.4 вариант *Sydney* [5]. В Новосибирске HNoV GII.Pe-GII.4 вариант *Sydney* впервые был выявлен в сезон 2012/2013, а GII.P7/GII.6 был третьим по встречаемости в 2010–2012 гг. Филогенетический анализ показал, что новосибирские изоляты GII.P17-GII.17, GII.Pe-GII.4 и GII.P7/GII.6 группируются в соответствующие кластеры, которые включают штаммы, цир-

кулировавшие в странах Юго-Восточной Азии в 2012–2015 гг. Тогда как HNoV редкого генотипа GII. P7/GII.14, выделенный из фекалий 17-летнего школьника, кластеризовался только с двумя южноафриканскими штаммами данного генотипа, выявленными в 2013 г.

Ротавирусную инфекцию у взрослых вызвали HRVA (26/27; 96,3%) генотипов G1P [8] (10/26; 38,5%), G2P [4] (9/26; 34,6%), G3P [8] (6/26; 23,1%), и в единичном случае HRVC (3,7%). Ротавирусы данных генотипов циркулируют на территории НСО в последнее десятилетие, но частота их выявления изменяется каждый сезон [3, 6, 7]. Филогенетический анализ полных последовательностей гена, кодирующего внутренний капсидный белок VP6, показал, что большинство новосибирских изолятов группировались со штаммами, циркулировавшими как в Сибири, так и в Юго-Восточной Азии в 2006–2012 гг. В то же время один изолят G2P [4] имел высокую степень гомологии с венгерскими штаммами 2012 г., а другой – с североамериканскими штаммами, циркулировавшими в 2009–2013 гг.

Секвенирование полного генома изолята HRVC, выделенного из фекалий 39-летней пациентки, показало, что заболевание вызвал реассортантный вирус. Последовательности 5 сегментов dsRNA генома, кодирующие VP7, VP4, VP6, NSP1 и NSP2, имели высокую степень гомологии с российскими штаммами 2008/2009 гг. [7]; сегмент, кодирующий NSP4, кластеризовался с корейскими штаммами; оставшиеся 5 сегментов, кодирующие VP1–VP3, NSP3 и NSP5, кластеризовались со штаммами дальневосточной линии, циркулирующими преимущественно в Китае и Японии.

Филогенетический анализ двух фрагментов геномов показал, что все выделенные изоляты HstV являются рекомбинантными; инфекцию у взрослых вызвали *AstV-2/4* (5/6; 83,3%) и *AstV-2/8* (1/6; 16,7%). По фрагменту ORF1, кодирующему сериновую протеазу, все новосибирские изоляты кластеризовались вместе с южнокорейским рекомбинантным штаммом *AstV-2/8* (kor85/2014). Однако по фрагменту ORF2, кодирующему капсидный белок VP1, пять изолятов кластеризовались вместе с китайскими штаммами *AstV-4* 2007–2014 гг. и с новосибирским штаммом *AstV-4* (*Rus-Nsc10-N358/2010*). По ORF2 со штаммами *AstV-8*, включая *kor85/2014*, кластеризовался только один изолят, обнаруженный в фекалиях 26-летней пациентки. В НСО *AstV-4* детектировались в единичных случаях в 2005–2013 гг., а *AstV-8* ранее не выявлялся.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что вирусные инфекции занимают значительное место в этиологии ОКИ у взрослых. Необходимо более активное включение в практику учреждений здравоохранения методов лабораторной диагностики вирусных ОКИ. Многолетний мониторинг генетического разнообразия гастровирусов, циркулирующих в Западной Сибири, позволил выявить смену доминирующих генотипов у норовирусов и астровирусов. Также обнаружен и охарактеризован реассортантный штамм ротавируса группы С, имеющий уникальный геном.

Исследование финансировалось по научной теме ФАНО России № 55.1.1 «Геномика экстремофилов и бактериально-вирусных сообществ патогенов» (0309–2014–0001).

Библиографический список

1. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Новосибирской области в 2015 году: Государственный доклад – 2016 – С. 126–140.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году: Государственный доклад – М., 2015 – С. 103–106.
3. Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Курильщикова А.М. и др. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у взрослых в Новосибирске // Инфекционные болезни – 2013 – Т. 11, № 2. – С. 31–37.
4. Zhirakovskaia E.V., Tikunova A.Y., Bodnev S.A. et al. Molecular epidemiology of noroviruses associated with sporadic gastroenteritis in children in Novosibirsk, Russia, 2003–2012 // J Med Virol. – 2015. – Vol. 87, N 5. – P. 740–753.
5. de Graaf M., van Beek J., Vennema H. et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus - End of the GII.4 era? // Euro Surveill. – 2015. – Vol. 20, N 26. – pii: 21178.
6. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г. и др. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 2012. – № 4 – С. 33–41.
7. Zhirakovskaia E., Tikunov A., Klemesheva V. Et al. First genetic characterization of rotavirus C in Russia // Infect Genet Evol. – 2016. – Vol. 39 – P. 1–8.

ФЕНОМЕН ФОРМИРОВАНИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ВИРУСОНОСИТЕЛЬСТВА, РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО ХАРАКТЕРА ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ПОЗДНЕЙ (ОТСРОЧЕННОЙ) ГИБЕЛИ У БОЛЬНЫХ БВВЭ ПО ДАННЫМ ЭПИДЕМИИ 2014 – 2015 ГОДА И ПОЛУЧЕННЫМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ

Н.М. Зубавичене, О.В. Пьянков, Е.Ф. Бочаров

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

По данным эпидемии 2014–2015 гг. инкубационный период болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), составляет 11,4 сут, и 95% случаев укладывается в этот показатель [PubMed PMID:25244186]. Однако ещё в 1999 г. была доказана возможность длительной персистенции вируса в жидкости через 3 мес после начала заболевания [Van der Groen, 1984, Rowe, 1999, Rodriguez, 1999]. В 2003 г. [Casillas, 2003] описан случай выделения РНК вируса Эбола в семенной жидкости методом ПЦР у четырех пациентов: у первого – на 52-й и 82-й день после начала заболевания, у второго – на 47-й и 91-й день, у третьего и четвертого – на 63-й после начала заболевания.

В работе Naas [2014] на основе данных с предыдущих вспышек заболевания и данных за 9 мес текущей вспышки была показана теоретическая вероятность нахождения вируса в организме человека после 21 сут (время карантина) от 0,2 до 12% случаев.

В сентябре 2014 г. врач Ян Крозье заразился вирусом Эбола, однако с помощью врачей Университета Эмори ему удалось излечиться. Анализы показывали, что в крови Яна Крозье вирусов не оставалось. Через некоторое время врач начал испытывать боль и повышение давления в одном глазу. В результате исследований выяснилось, что в глазной жидкости содержится вирус Эбола, в то время как в окологлазных тканях и в слезах его нет [Jau, 2015]. Позже стало известно о том, что подобные случаи происходили и ранее: излечившиеся нередко жаловались на боль в глазах, однако до сих пор не было известно, что воспаление было вызвано вирусом Эбола.

Таким образом, документально подтвержден феномен длительного (более 3 мес) носительства возбудителя БВВЭ у реконвалесцентов. Причем носительство может формироваться как с проявлением признаков клинического заболевания, так и без их проявления.

Необычным является случай неожиданного тяжелого позднего двукратного рецидива БВВЭ у заболевшей женщины (Полина Кэферки) с развитием поражения ЦНС (проявлением менингоэнцефалита) в октябре 2015 г. и феврале 2016 г., который был описан британскими учеными. Авторы пришли к выводу: «Наш отчет показывает, что могут возникать неожиданные, поздние, тяжелые рецидивы вируса Эбола, в данном случае в ЦНС. Это открытие в корне меняет все, что было известно об инфицировании вирусом Эбола. Необходимо соблюдать бдительность в отношении тысяч выздоровевших больных Эболой с точки зрения рецидивов инфекции».

Помимо феномена длительного носительства вируса Эбола в организме реконвалесцентов и рецидивирующего характера самого заболевания БВВЭ при анализе данных, полученных в ходе последней эпидемии БВВЭ 2014–2015 гг., были зафиксированы и подтверждены случаи поздней гибели заболевших БВВЭ людей.

Смерть людей, выживших после БВВЭ, некоторое время спустя происходит очень редко. В исследуемой когорте в Сьерра-Леоне она наступила менее чем у 1% выживших пациентов. Авторы из Англии и Сьерра-Леоне, часть которых работала в группах реагирования в этой стране, наблюдали за 151 пациентом, выжившим после БВВЭ, которые были выписаны из лечебного центра в Сьерра-Леоне с ноября 2014 г. по март 2015 г. на протяжении почти 13 мес. Четыре пациента (0,7%) умерли в течение среднего периода наблюдения, составившего 10 мес, только один из них умер после явного полного выздоровления (у остальных вероятными причинами смерти были поздние осложнения или туберкулез). Авторы считают, что их данные о редкости рецидива Эболы с последующими случаями смерти «должны быть обнадеживающими для людей, выживших после Эболы, и контактных лиц, но не от-

меняют необходимости постоянного контроля здоровья выживших».

В ходе наших собственных исследований экспериментальной БВВЭ на лабораторных животных был установлен факт волнообразного (рецидивирующего) течения этого заболевания. Для инфицирования морских свинок использован вирус Эбола штамм Заир К-5 В (летальный для морских свинок). Инфицирующая доза составила 30–50 ЛД₅₀ на 1 животное, способ инфицирования – внутрибрюшинный. В опытах использовали 48 морских свинок Hartly массой 200–250 г. При выполнении экспериментальных исследований все болезненные процедуры проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Инфицированных животных содержали в помещениях, обеспечивающих уровень биобезопасности (BSL-4). На каждую экспериментальную точку брали 6 морских свинок. Уход, наблюдение и измерение ректальной температуры осуществляли ежедневно в течение 21 сут (максимальный инкубационный период), далее уход за животными и учет состояния по внешним проявлениям заболевания осуществляли в течение 62 сут. Было установлено, что инкубационный период составил 4–5 сут. Средняя продолжительность лихорадочного состояния составила 6,7 сут, гибель 69% животных наступила на 9–11 сутки. Однако у 19% выживших морских свинок на 11–14 сутки от момента инфицирования был зарегистрирован второй пик температурной реакции, после чего часть животных погибла на 17–20 сутки от момента инфицирования. За выжившими морскими свинками было продолжено наблюдение. Было установлено, что при отсутствии явных признаков клинического заболевания 2 морские свинки пали на 26 сут и 1 морская свинка – на 50 сут. При вскрытии павших животных наблюдали патологоанатомическую картину, характерную для проявления БВВЭ на лабораторных животных (морских свинок). Анализ результатов проведенного эксперимента позволил предположить существование феномена отдаленной гибели в случае экспериментальной лихорадки Эбола. Последующий анализ событий, реализовавшихся в ходе эпидемии БВВЭ 2014–2015 гг., показал, что геморрагическая лихорадка Эбола может протекать как в острой форме заболевания с летальностью до 57%, так и в рецидивирующей форме с длительной персистенцией вируса в организме. Подтверждены случаи поздней (отсроченной) гибели заболевших БВВЭ людей в период до 10 мес.

Таким образом, необходимо соблюдать бдительность в отношении тысяч выздоровевших больных Эболой с точки зрения рецидивов инфекции.

Библиографический список

1. Brainard J., Pond K., Hooper L. et al. Presence and persistence of Ebola or Marburg virus in patients and survivors: a rapid systematic review // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2016. – Vol. 10: e0004475.
2. Sonnenberg P., Field N. Sexual and mother-to-child transmission of Ebola virus in the postconvalescent period // *Clin Infect Dis.* – 2015. – Vol. 60. – P. 974–975.
3. Farge E., Giahue J.H. Female survivor may be cause of Ebola flare-up in Liberia. Reuters. 2015 Dec 17 // *Kaye D. 15 March news. Clin Infect Dis.* – 2016. – Vol. 62. – P. i–ii.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for management of survivors of Ebola virus disease in US healthcare settings. 2016 [cited 2016 Mar 18]. <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/evaluating-patients/guidance-for-management-of-survivors-ebola.html>
5. Bower H., Smout E., Bangura M.S. et al. Deaths, late deaths, and role of infecting dose in Ebola virus disease in Sierra Leone: retrospective cohort study // *BMJ.* – 2016. – Vol. 353. – i2403 | doi: 10.1136/bmj.i2403

АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ГЛПС В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.В. Иванова, Н.В. Попов

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

В настоящем сообщении проанализирована заболеваемость ГЛПС на территории Российской Федерации с 1990 по 2015 гг., показаны территории, наиболее неблагоприятные в эпидемиологическом отношении. Для анализа использованы данные официальной статистики Роспотребнадзора и Федеральных центров гигиены и эпидемиологии, литературные источники.

За последние 25 лет на территории Российской Федерации сохраняется чрезвычайно напряженная обстановка по заболеваемости природно-очаговыми вирусными болезнями. А в самой структуре природно-очаговой заболеваемости, регистрирующейся на территории Российской Федерации, доля ГЛПС достигает практически 90%, что делает данное заболевание одним из актуальнейших среди всех природно-очаговых заболеваний в России [1, 2].

За изучаемый период (1990–2015 гг.) на территории Российской Федерации зарегистрировано 194 116 случаев заболевания ГЛПС. Заболеваемость регистрировалась в 8 федеральных округах Российской Федерации, в 58 субъектах. Однако распределение заболеваемости по территории Российской Федерации было неоднородным.

Установлено, что в 97% случаев заболеваемость регистрировалась в Европейской части России. Среди всех случаев заболевания ГЛПС по стране на долю Приволжского федерального округа (ПФО) приходилось 86,4%, что характеризует этот регион, как территорию с наибольшей эпидемической активностью природных очагов ГЛПС в стране. Всего в ПФО за 1990–2015 гг. зарегистрировано 167 778 случаев заболевания ГЛПС, при этом в среднем на 1 год приходилось 6712 больных. За период с 2000 по 2010 гг. на территории округа было зарегистрировано 68 666 случаев заболевания ГЛПС, на 1 год – 6242 больных, что на 470 случаев меньше среднееголетних значений. Аналогичные показатели заболеваемости регистрировались и в предыдущем десятилетии (в 1990–1999 гг. зарегистрировано 67 779 случаев, в год – 6778 больных). За последние пять лет регистрации (2011–2015 гг.) зафиксировано 37 801 случаев заражения людей ГЛПС. Среднее значение заболеваемости за пять лет составляло 7560 случаев. К наиболее неблагоприятным по ГЛПС субъектам ПФО относятся Республики Башкортостан, Удмуртия, Татарстан в которых доля от всей заболеваемости ГЛПС в ПФО за анализируемый период составляла 62%, а среднее количество заболевших за исследуемый период превышало 30 человек на 100 тыс. населения. Все случаи заражения ГЛПС на территории ПФО были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

Высокая заболеваемость ГЛПС регистрировалась и в Центральном федеральном округе, ее доля в общей структуре заболеваемости по стране составляла 7,2%. Ежегодно регистрировалось от 100 до 1318 случаев заболевания. Случаи заболевания были отмечены во всех (18) субъектах федерального округа, однако наибольшее количество больных регистрировалось в Тульской (18,4%), Ярославской (16%) и Московской областях (17,2%). В природных очагах ГЛПС Центрального федерального округа на большинстве территорий циркулирует хантавирус серотипа Puumala, а в 3–5% случаев заболевание ассоциируют с хантавирусом серотипа Dobrava.

Доля Уральского федерального округа в общероссийской заболеваемости ГЛПС составляла 2,5% (14 129 случаев). При этом почти 80% всех зарегистрированных случаев ГЛПС в округе приходилось на Челябинскую область (1551 случай). Все случаи заражения ГЛПС были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

За аналогичный период регистрации (1990–2015 гг.) в Северо-Западном федеральном округе зарегистрировано 2 549 случаев заболевания, что составляет 1,3% от общероссийской заболеваемости за этот период. Больше половины всех больных ГЛПС в округе составляли жители Вологодской области (611 сл.), впервые случаи ГЛПС были выявлены в Новгородской (2 сл.) и Архангельской областях (1 сл.). Все случаи заражения ГЛПС на территории Северо-Западного ФО также были ассоциированы с серотипом вируса Puumala.

В Дальневосточном регионе за период с 1990 по 2015 гг. было официально зарегистрировано 4312 случаев заболевания ГЛПС среди населения округа, что составляет 2,2% от общероссийской заболеваемости за этот период. Заражения людей обусловлены хантавирусами трех серотипов: Seoul, Hantaan и Amur.

На территории Южного федерального округа зарегистрирован 321 (0,16%) случай заболевания ГЛПС. Все случаи заболевания людей были выявлены в Волгоградской области и Краснодарском крае. Практически в 100% случаев заболевания источником заражения людей являлись рыжие полевки, носители вируса Puumala, однако описаны случаи заражения людей тяжелыми формами ГЛПС, обусловленными вирусом Dobrava.

В Сибирском ФО было зарегистрировано 198 случаев заболевания ГЛПС, что составляет 0,2% от общероссийской заболеваемости за этот период. В Северо-Кавказском ФО регистрировались единичные спорадические случаи заболевания. Не исключено, что случаи заболевания могли быть завозными из других регионов страны.

Выводы.

1. За анализируемый период на территории Российской Федерации отмечена крайне неблагоприятная эпидемиологическая обстановка по ГЛПС.

2. Среди всех случаев заболевания ГЛПС по стране, на долю Приволжского Федерального округа за анализируемый период приходилось 86,4%, что характеризует этот регион, как территорию с наибольшей эпидемической активностью природных очагов ГЛПС в стране.

3. Для снижения уровня заболеваемости ГЛПС на территории Российской Федерации необходимо усилить эпидемиологический надзор в природных очагах, внедрить в практику пространственные и временные прогнозы обострения эпидемиологической обстановки. Также необходимо увеличить объемы полевой и поселковой дератизации. В целях снижения заболеваемости ГЛПС на очаговых территориях рекомендуется использовать современные дератизационные технологии. Неспецифические профилактические мероприятия проводить не менее двух раз в год: весной и осенью, информационно-разъяснительную работу – постоянно. [3]

При этом также необходимо внедрение в практику противоэпидемических работ в очагах ГЛПС вакцинопрофилактики.

Библиографический список

1. Ткаченко Е.А., Бернштейн А.Д., Дзагурова Т.К. и др. Актуальные проблемы геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Микробиология. – 2013. – № 1. – С. 51–58.
2. Кутырев В.В., Добло А.Д., Куклев Е.В. Эпидемиологическая ситуация по карантинным и другим опасным инфекционным болезням в Приволжском федеральном округе и совершенствование санитарной охраны территории // НМЖ. Здравоохранение ПФО– 2001– № 1. – С. 138–141.
3. Мочалкин П.А. Очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом города Уфы: опыт оздоровления: Дис. ... канд. мед. наук. – Саратов; 2010. – 191 с.

АНАЛИЗ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ГРИППУ В 2014–2016 гг.

**Т.Н. Ильичева, А.Г. Дурыманов, И.М. Суслопаров, Н.П. Колосова, С.В. Святченко,
Н.И. Гончарова, О.В. Петрова, А.В. Шиповалов, В.Н. Михеев, А.Б. Рыжиков**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Для контроля за коллективным иммунитетом населения к сезонным вирусам гриппа, а также для надзора за появлением в сыворотках крови людей антител к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом было проанализировано 3888 образцов сыворотки крови, собранных в 25 регионах России в октябре–ноябре 2014 г., и 4779 образцов, собранных осенью 2015 г. в 35 регионах РФ. Сыворотки собирали после отлета перелетных птиц и накануне сезонной эпидемии гриппа. Ни в одном образце антитела к вирусам гриппа A(H5N1) и A(H7N9) обнаружены не были: ни одна из исследованных сывороток не взаимодействовала в РТГА с этими антигенами даже в разведении 1:10.

Анализ сывороток, собранных в 2014 г., показал, что 41% всех образцов, собранных осенью 2014 г., были позитивными к вирусу A/California/07/09(H1N1pdm09), 36% позитивны к A/Texas/50/2012 (H3N2), 40% положительны к B/Brisbane/60/2008(Vict.lin.) и 47% взаимодействовали в РТГА со штаммом B/Massachusetts/2/2012 (Yam.lin.).

Популяционный иммунитет к гриппу осенью 2015 г. несущественно различался в разных регионах России. Так, количество положительных сывороток к вирусу A/California/07/09 (H1N1pdm09) было несколько выше в Европейской части РФ (43,6%), чем на Урале и Западной Сибири (29,7%) или в Восточной Сибири и на Дальнем Востоке РФ (29,4%). Весьма тревожные данные получены в отношении популяционного иммунитета к вирусу A(H3N2): только 8% сывороток из всех регионов были положительными к A/Switzerland/9715293/13, а среди образцов из Восточной Сибири и Дальнего Востока этот показатель еще ниже – 5,2%. В целом можно заключить, что популяционный иммунитет только к вирусу B (Yamagata) находился на среднем уровне накануне эпидемического сезона 2015–2016: количество позитивных образцов было около 50%.

В 2014–2015 гг. эпидемический подъем заболеваемости гриппом в России начался на 5-й календарной неделе (25.01–01.02), пик эпидемии был пройден на 8-й неделе (16.02–22.02), снижение активности регистрировалось до 13-й недели. Более 59% всех выделенных штаммов в России пришлось на вирус гриппа A(H3N2), около 37% на вирус гриппа B, доля вирусов A(H1N1pdm) составила менее 4% [1]. Эксперты из СЦ ВОЗ по гриппу подтвердили, что вакцинный штамм A/Texas/50/2012 был недостаточно эффективен против циркулировавших штаммов A(H3N2) вируса гриппа.

В 2015–2016 гг. резкий подъем заболеваемости гриппом начался на второй неделе 2016 г. К 12-й неделе эпидемический сезон по гриппу завершился. По результатам лабораторного мониторинга было подтверждено более 28,2 тыс. случаев заболевания, вызванного вирусами гриппа, в том числе около 28 тыс. вирусом гриппа A, из которых на долю вируса гриппа A(H1N1)2009 пришлось около 93% [2].

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора из Центров гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ, а также из санитарно-эпидемиологических учреждений иностранных государств поступал аутопсийный материал (фрагменты бронхов, трахеи, легких) от людей, умерших предположительно от гриппа, и клинический материал (мазки из носа и зева в транспортной среде) от лиц с тяжелым течением ОРВИ. По данным вирусологических лабораторий ЦГиЭ все образцы были положительны в ПЦР-анализе на наличие РНК вируса гриппа. В ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора образцы от умерших людей повторно исследовали в ПЦР, далее весь материал вне зависимости от данных ПЦР, использовался для выделения изолятов вируса в культуре клеток MDCK линии Лондон путем заражения монослоя клеток.

В 2014–2015 гг. от людей, умерших предположительно от гриппа, и лиц с тяжелым течением болезни нами выделено 15 штаммов вируса A(H3N2), относящихся к генетическим группам 3С.2а and 3С.3а [3]. Все вирусы отличались от вакцинного штамма сезона 2014–2015 (A/Texas/50/2012) и были подобны A/Switzerland/9715293/2013 and A/Hong Kong/4801/2014. Несмотря на то что вирусы A(H1N1)pdm09 составили менее 4% среди всех циркулировавших в России вирусов гриппа, из аутопсического и клинического материала мы выделили 2 штамма вируса, подобного A/California/07/2009. Кроме того,

от погибшего человека был выделен 1 штамм вируса гриппа, подобного B/Phuket/3073/2013. Все выделенные нами вирусы были чувствительны к антинейраминидазным препаратам.

В эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора поступило 510 аутопсийных образцов от умерших предположительно от гриппа и 1155 клинических образцов от пациентов с тяжелым течением гриппоподобного заболевания. Из полученного материала выделено 360 штаммов вируса гриппа, в том числе 115 штаммов от умерших. 354 штамма принадлежали субтипу A(H1N1pdm 09), шесть штаммов вируса гриппа A(H3N2). Кроме того, из ЦГиЭ субъектов Российской Федерации получено 244 выделенных ими штаммов вируса гриппа. Из них 237 штаммов A(H1N1pdm 09) и 7 штаммов вируса гриппа B.

Таблица.

Количество аутопсийных и клинических образцов и выделенных из них штаммов вируса гриппа в эпидемическом сезоне 2015–2016 гг.

Регион	Материал от умерших от гриппа людей (прижизненные мазки, аутопсийный материал)		Клинический материал (мазки, смывы) от выздоровевших		Изоляты, выделенные в ЦГиЭ в регионах
	Кол-во людей, у которых были забраны пробы	Кол-во умерших человек, от которых были выделены изоляты	Кол-во людей, у которых были забраны пробы	Выделено штаммов	
Федеральные округа Российской Федерации					
Центральный	82	22	24	8	0
Северо-Западный	156	38	38	16	0
Южный	28	8	31	8	38
Северо-Кавказский	15	6	92	26	0
Приволжский	64	13	80	46	14
Уральский	70	12	176	37	10
Сибирский	40	5	569	54	113
Дальневосточный	25	2	100	35	69
Крымский	19	6	3	1	0
Иностранные государства					
Армения	0	0	25	6	0
Республика Абхазия	0	0	7	6	0
ДНР	10	3	0	-	0
ЛНР	1	0	10	2	0
Всего	510	115	1155	245	244

Штаммы вируса гриппа A(H1N1pdm 09) по генетической характеристике относились к группе 6В [4], по антигенным свойствам были родственны вакцинному штамму A/California/07/09 и реагировали в РТГА с человеческой сывороткой, полученной через месяц после вакцинации вакциной «Гриппол» сер.300815. Штаммы вируса гриппа A(H3N2) были подобны штамму A/Hong Kong/4801/2014, рекомендованному ВОЗ в качестве вакцинного штамма на эпидемический сезон 2016–2017 гг. [5]. Все исследованные вирусы чувствительны к антинейраминидазным препаратам озелтамивиру и занамивиру.

Заключение. Следует обратить особое внимание на крайне низкий уровень популяционного иммунитета к вирусу гриппа A(H3N2). Поскольку накануне эпидемии 2015–2016 гг. процент серопозитивных был в среднем 8–9% по регионам России, а во время эпидемии циркулировали в основном штаммы другого субтипа – A(H1N1pdm 09), то к концу 2016 г. естественный иммунитет к вирусу A(H3N2) снизится еще больше.

Вероятность того, что в эпидемию 2016–2017 гг. будет доминировать субтип A(H3N2), довольно высока, а следовательно социально значимые последствия от эпидемии гриппа во многом будут зависеть от кампании по вакцинации населения осенью 2016 г.

Библиографический список

1. «О завершении эпидсезона гриппа 2014–2015 гг. в Российской Федерации» http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=3465&phrase_id=676406
2. «О завершении эпидемического сезона по гриппу и ОРВИ 2015–2016» http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=5995&phrase_id=638303
3. Stucker K.M., Schobel S.A., Olsen R.J. et al. Haemagglutinin mutations and glycosylation changes shaped the 2012/13 influenza A(H3N2) epidemic, Houston, Texas // Euro Surveill. – 2015. – Vol. 20, N 18. – pii=21122.
4. Takashita E., Fujisaki S., Shirakura M. et al. Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A (H1N1)pdm09 Virus Imported from India in March 2015 // Jpn J Infect Dis. – 2016. – Vol. 69, N 1. – P. 83–86.
5. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016 Southern Hemisphere influenza season 2015. http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201509_recommendation.pdf?ua=1

АНАЛИЗ ЭПИДЕМИИ ГРИППА 2016 ГОДА ПО МАТЕРИАЛАМ ДВУХ НАЦИОНАЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ВОЗ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Л.С. Карпова¹, Н.М. Поповцева¹, Т.П. Столярова¹, К.А. Столяров¹, А.А. Соминина¹, Е.И. Бурцева²

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург; ²ФБГУ «ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Проведен анализ информации, еженедельно поступающей из 59 городов, сотрудничающих с Национальными центрами по гриппу при ФГБУ НИИ гриппа и ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи. Это 49 городов – опорных баз Федерального центра по гриппу и 10 городов Центра экологии и эпидемиологии гриппа (общей численностью населения 52 млн человек), являющихся Республиканскими, краевыми и областными центрами, а также городами Федерального значения (Москва, Санкт-Петербург, Севастополь), расположенными в различных Федеральных округах. Представлены сравнительные данные заболеваемости гриппом и ОРВИ, госпитализации и смертности в возрастных группах детей (0–2, 3–6 и 7–14 лет) и взрослых (15–64 г. и 65 лет старше) в период пандемии 2009 г. и эпидемии 2016 г.

Эпидемия 2016 г., в отличие от пандемии с ее необычно ранним началом (28.09–04.10.2009), началась в обычный для гриппа период (11.01.–17.01.2016) (рис. 1). Но для нее был характерен необычайно высокий темп развития: эпидемия достигла пика уже через 2 недели (25.01–31.01.2016), тогда как пандемия 2009 года – через 6 недель (2.11–8.11.2009). Показатели заболеваемости на пике обеих эпидемий существенно не отличались (134,4 и 138,2 на 10 тыс. населения).

Эпидемия 2016 г. была короче, чем пандемия 2009 г. как по продолжительности в России (12 и 17 недель), так и в среднем по городам (4,6 и 6,8 недель), особенно среди детей 7–14 лет (на 3 недели). Взрослое население и школьники были вовлечены в последнюю эпидемию, как и в пандемию, почти во всех городах, а дети 3–6 и 0–2 лет – в 53 и 43 городах.

Средняя заболеваемость гриппом и ОРВИ в границах эпидемии в городах составила по населению в целом 5,4%, в том числе от 21,8% и 25,4% среди детей до 6 лет до 10,4% среди детей школьного возраста. Заболеваемость взрослого населения составила 2,7%, в том числе 3,0% среди лиц от 15 до 64 лет и 1,3% среди лиц старше 65 лет. В границах эпидемии по стране переболело 9,6%, в том числе 52,0% детей 3–6 лет, 50,7% – 0–2 лет и 22,8% – 7–14 лет, 4,3% взрослого населения, в том числе 4,8% лиц от 15 до 64 лет и 2,0% старше 65 лет. Таким образом, в эту эпидемию заболеваемость была меньше по сравнению с пандемией 2009 г. по населению в целом (в городах в среднем 5,4% против 8,5% и по стране 9,6% против 14,4%), и во всех возрастных группах, особенно среди детей 7–14 лет, и только лица старше 65 лет болели больше.

Таблица 1.

Регистрация летальных исходов от гриппа в эпидемию 2016 г.

Федеральные округа	№ и дата недели														
	21-27.12.15	28.12-3.01.16	4-10.01	11-17.01	18-24.01	25-31.01	01-07.02.	08-14.02.	15-21.02	22-28.02	29.02-06.03	07-13.03	14-20.03	21-27.03	28.03-03.04
	52	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	1	1
Южный	2	1	9	15	9	3	3			1					
Северо-Запад	1	2	2	8	22	38	32	14	3	1	1		1		
Центральный	1			2	16	12	13	10	1	2	3		3		
Приволжский			1	2	4	3	5	7	3	3	3	5			
Уральский (облас)				1	3	1	3	1	2	2		1			
Дальнево-сточный				1	3	2	1			1					
Сибирский						1	3	3	3		2	1	1	2	1
Республика Крым									2			1			
Итого случаев смерти от гриппа:	4	3	12	29	57	60	60	35	14	10	9	8	5	2	1
A(H1N1) pdm09	3	3	12	28	56	60	58	34	14	10	9	7	4	2	1
A(H3N2)	1														
A(H1N1) pdm09+ A(H3N2)					1										
A(H1N1) pdm09+B							1								
B													1		
A не субтипирован				1			1	1				1			

В эпидемию 2016 г. уровень заболеваемости гриппом и ОРВИ по округам был меньше (от 3,0% в Южном до 7,0% в Северо-Западном ФО), чем в пандемию 2009 г. (от 5,7% в Южном до 10,3% в Дальневосточном ФО) (рис. 2). Наиболее высокая заболеваемость выявлена в Северо-Западном и Уральском ФО (7,0% и 6,9%), а в пандемию 2009 г. – в Дальневосточном и Сибирском округах (10,3% и 10,2%), то есть выше на территориях, где начинались эпидемии. Исключение составлял Южный ФО, где процент заболевших был меньше в обе эпидемии.

Частота госпитализации больных гриппом и ОРВИ в последнюю эпидемию была больше, чем в пандемию по населению в целом (3,6% против 2,4%) и во всех возрастных группах, особенно среди детей 0–2 лет (8,7% против 5,5%) и лиц старше 65 лет (5,2% против 1,4%). Процент госпитализированных с диагнозом «грипп» от всех госпитализированных с гриппом и ОРВИ был больше, чем в предшествующие эпидемии, но таким же (14,0%), как в пандемию.

В 59 городах зарегистрировано 309 случаев смерти, в том числе 301 (97,4%) от гриппа A(H1N1) pdm09. Первые летальные случаи от гриппа были зарегистрированы до начала эпидемии (на 52-й неделе 2015 г.) (табл. 1). Большое число летальных исходов зарегистрировано в С.-Петербурге – 102, в Ростове–на–Дону – 18 и в Волгограде – 13 случаев. Наибольшее число смертельных исходов зарегистрировано на пике эпидемии (на 5-й и 6-й неделях 2016 г.)

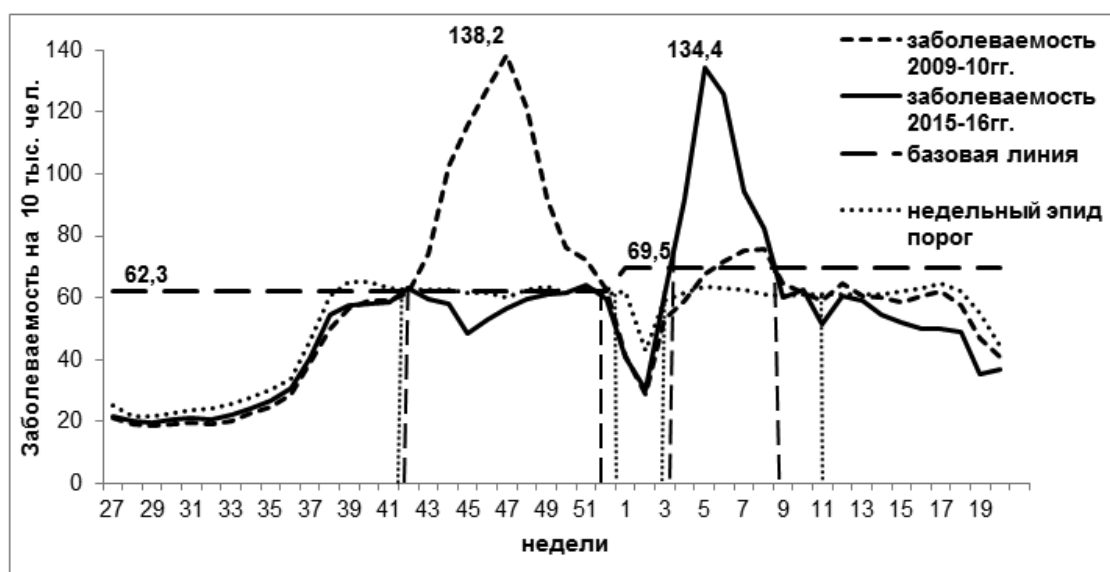


Рис. 1 Сравнение заболеваемости гриппом и ОРВИ в 59 городах РФ в пандемию 2009–10 гг. и эпидемию 2015–16 гг.

Как показал анализ последних 7 эпидемий, основной этиологической причиной летальных исходов при гриппе служил вирус A(H1N1)pdm09. Даже в годы, когда доминировали другие возбудители, именно он вызывал наибольшее количество смертельных исходов (рис. 3).

В последнюю эпидемию, по сравнению с пандемией, в возрастной структуре умерших снизилась доля лиц в возрасте от 18 до 31 года, но увеличилась доля умерших в возрасте 54–64 лет и пожилых старше 65 лет. Это связано с увеличением заболеваемости в старших возрастных группах и наличием у них сопутствующей патологии (рис. 4). К основным факторам риска смертельных исходов относились сердечно-сосудистые заболевания, диабет и ожирение, удельный вес которых, как и болезней внутренних органов в последнюю эпидемию существенно повысился, по сравнению с пандемией 2009–2010 гг., когда чаще всего умирали молодые здоровые люди без сопутствующих заболеваний (рис. 5).

Таблица 2.

Заболеваемость гриппом и ОРВИ и летальность в эпидемию 2016 г. в 30 городах с различным уровнем популяционного иммунитета у здоровых доноров

Группа городов	Среднегеометрические титры антител к гриппу A(H1N1) pdm09 (10.2015)	Продолжительность эпидемии в городах в неделях	Средняя заболеваемость(%) гриппом и ОРВИ у лиц старше 15 л. в границах эпидемии		Летальность от лабораторно подтвержденного гриппа		
			в городах . . .	по стране (3–14 нед)	Заболели	Умерли	%
14 городов	61,9	4,5	2,99	4,89	385430	15	0,004*
колебания	32,4÷104,7		0,9÷5,0	1,4÷7,8			0,0÷0,05
16 городов	17,5	4,5	2,96	4,96	595969	173	0,03*
колебания	5,1÷26,4		1,5÷4,4	2,3÷7,0			0,0÷0,07

* - различия статистически достоверны, при $p < 0,05$;

В эпидемию 2016 г. число летальных исходов было больше (309 умерших), чем в предшествующие сезонные эпидемии, но меньше, чем в пандемию 2009 г. (622). Процент летальности был меньше по сравнению с пандемией 2009 г. по населению в целом (в 1,7 раза) и в возрастных группах детей 7–14 лет (в 9 раз), 0–2 (в 3), 3–6 (в 1,4), лиц в возрасте от 15 до 64 лет (в 2,5). Исключение составили лица старше 65 лет, у которых летальность в эту эпидемию была больше (в 2,3 раза).

Это отчасти, было обусловлено формированием иммунной прослойки среди населения. Данные

Этиология эпидемий

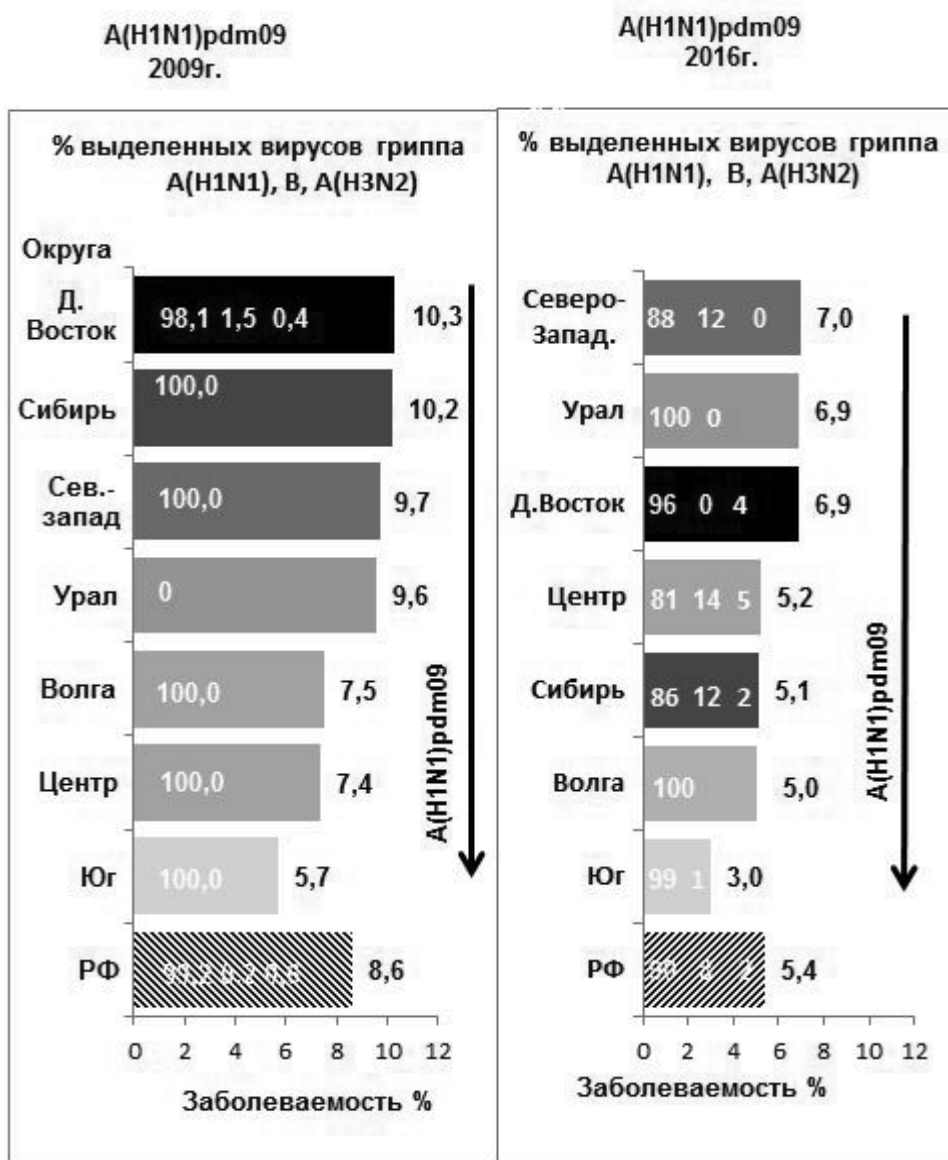


Рис. 2. Заболеваемость гриппом и ОРВИ, ее этиология и пути распространения эпидемий по округам РФ в пандемию 2009 г. и эпидемию 2016 г.

регулярного изучения популяционного иммунитета показали, что летальность была ниже в городах с более высокими среднегеометрическими титрами антител к гриппу A(H1N1)pdm09 (табл. 2).

В предэпидемический период (октябрь 2015 г.) в отдельных городах уровень популяционного иммунитета опустился до значений титров ниже защитных, возможно, с этим связано наибольшее число смертельных исходов в таких городах, как Санкт-Петербург, Волгоград и Ростов-на-Дону.

Число летальных исходов, регистрируемых в системе двух Национальных центров по гриппу в 59 городах, является неполным, так как не охватывает всю территорию России. Более полными являются данные официальной статистики Министерства здравоохранения РФ (рис. 6).

Выводы

Эпидемия 2016 г. и пандемия 2009 г. были похожи по этиологии (вызваны вирусом гриппа A(H1N1)pdm09), по заболеваемости и регистрации большего числа летальных исходов на пике эпидемии, по проценту госпитализированных с диагнозом «грипп» и вовлеченности в эпидемию взрослого населения и школьников.

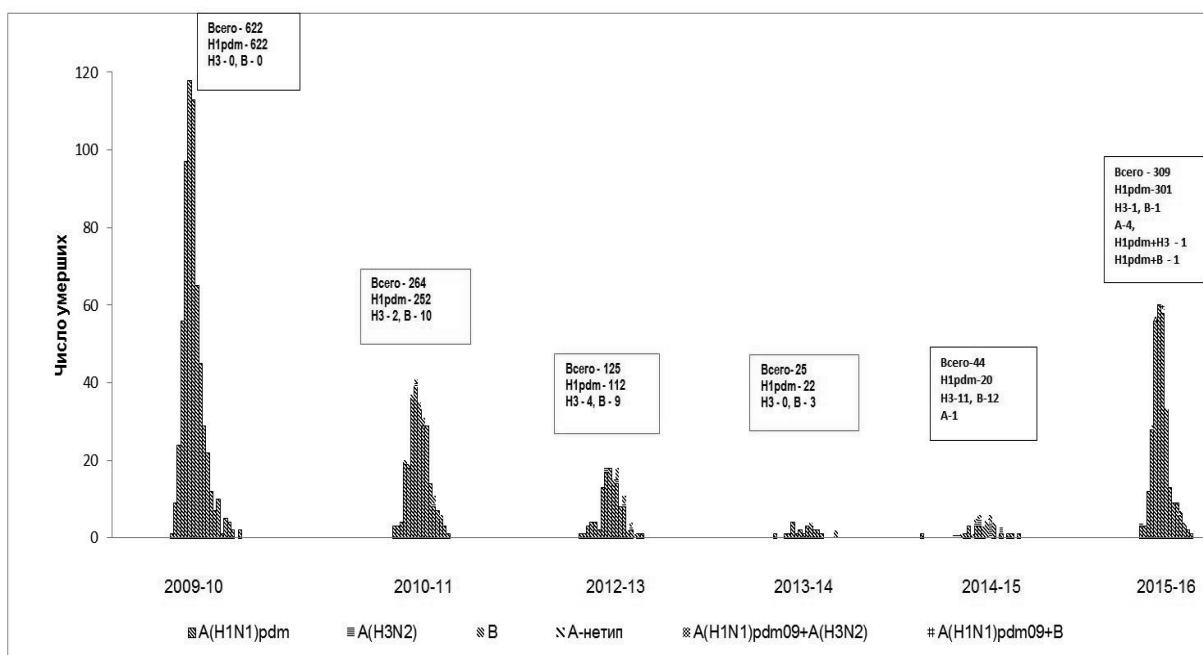


Рис. 3. Количество и этиология летальных исходов в пандемию гриппа 2009–10 гг. и в последующие эпидемии гриппа.

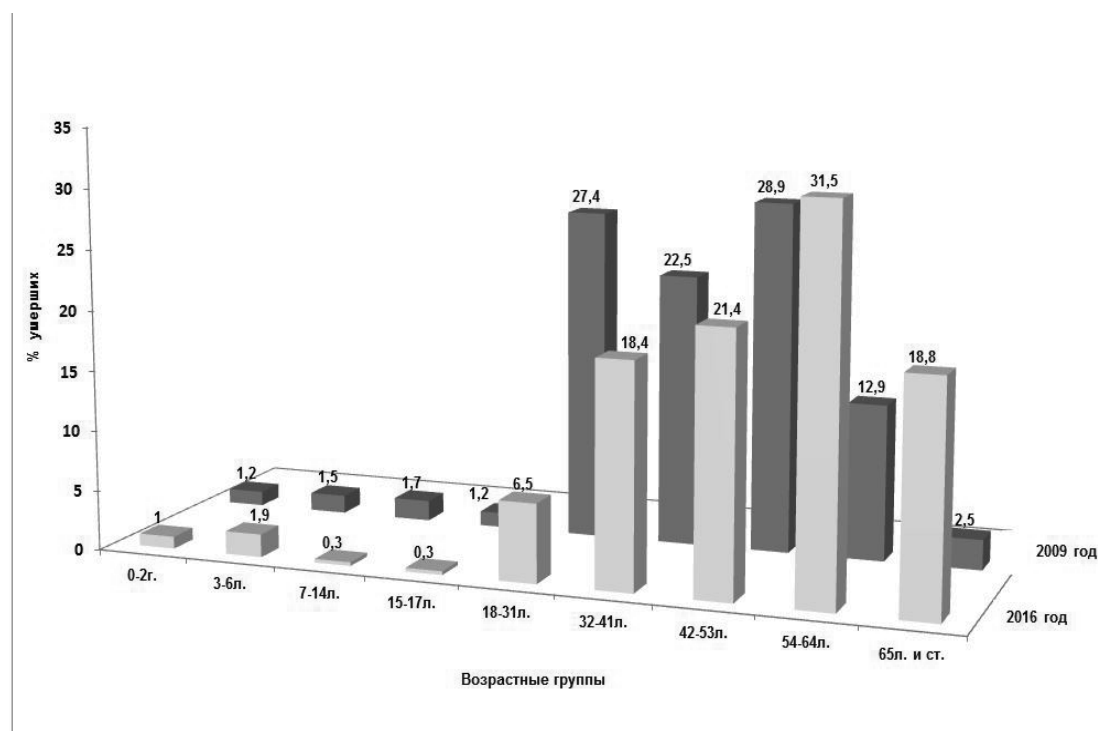


Рис. 4. Возрастная структура умерших от лабораторно подтвержденного гриппа в эпидемии 2016 и 2009 гг.

Эпидемия 2016 г. отличалась от пандемии более высоким темпом развития; направлением распространения по территории России (эпидемия 2016 г. – с запада на восток, а пандемия – с востока на запад); меньшей продолжительностью эпидемии по России и в среднем по городам, особенно, среди детей 7–14 лет; меньшей заболеваемостью населения в границах эпидемии в городах (5,4% против 8,5%), по стране (9,6% против 14,4%) и Федеральным округам; большей заболеваемостью в Северо-Западном и Уральском ФО, а в пандемию – в Дальневосточном и Сибирском ФО.

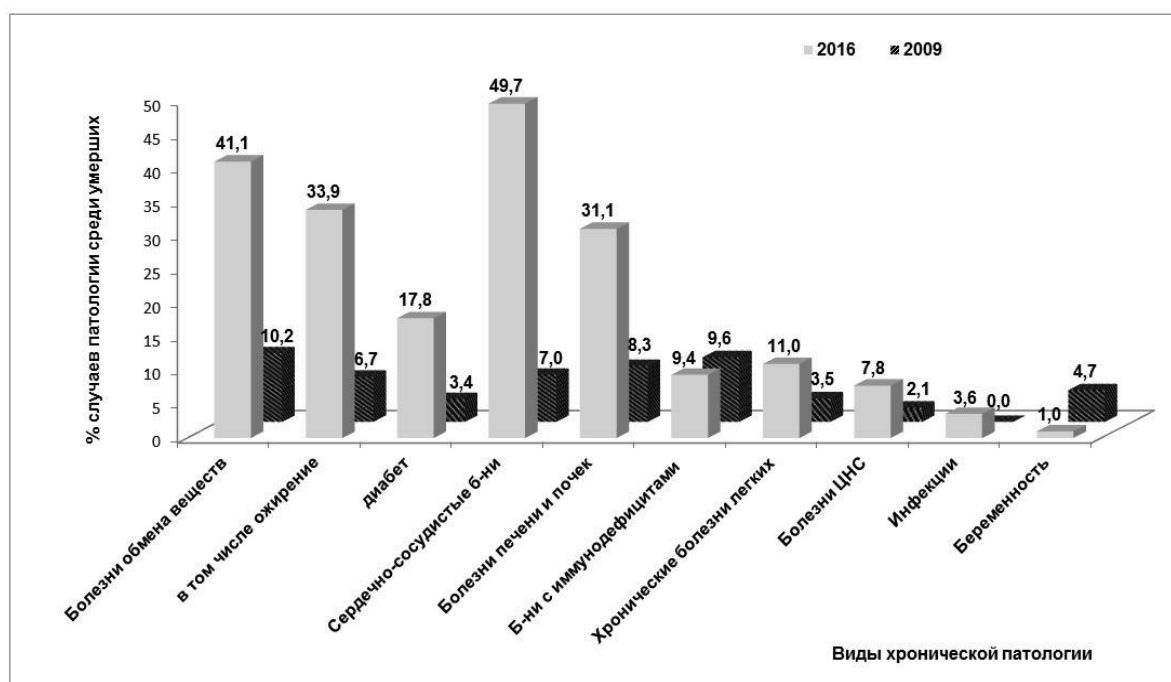


Рис. 5. Структура фоновой патологии при летальных исходах от гриппа A(H1N1)pdm09 в эпидемии 2016 г. и 2009 г.

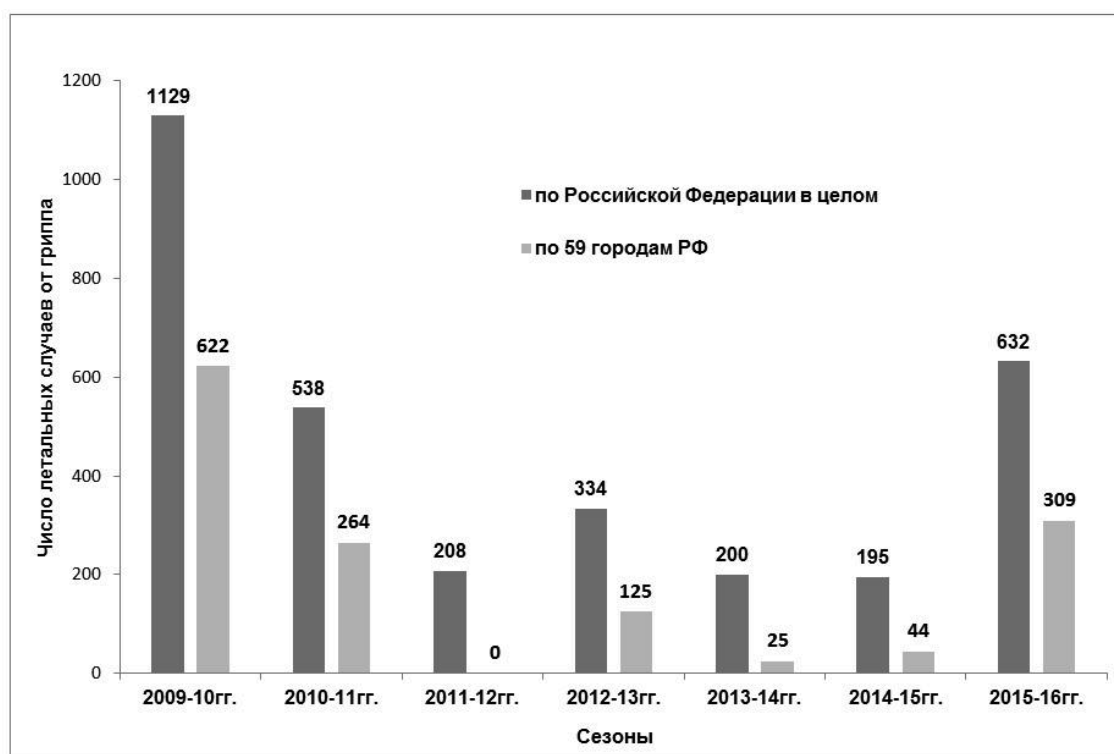


Рис. 6. Число летальных случаев от гриппа по Российской Федерации в целом (данные Минздрава РФ) и в 59 городах РФ (данные 2-х Национальных центров ВОЗ по гриппу) в пандемию 2009–10 гг. и последующие эпидемии с 2010 по 2016 г.

В эпидемию 2016 г. частота госпитализации была больше, особенно среди лиц старше 65 лет (5,2% и 1,4%), среди умерших увеличилась доля лиц старше 54 лет и процент лиц с сердечно-сосудистой патологией. Процент летальности был больше, чем в предшествующие сезонные эпидемии, но меньше, чем в пандемию, по населению в целом (в 1,7 раз).

ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ *VIBRIO* *CHOLERAЕ* O1 И O139 СЕРОГРУПП РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович, В.Б. Николаев

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Холерный вибрион наряду с известными факторами патогенности (холерный токсин, токсинорегулируемые пили адгезии и др.) обладает способностью к выработке растворимых и некоторых мембраносвязанных ферментов, которые являются маркерами поверхностных структур (наружная мембрана). Ранее нами были получены препараты наружной мембраны холерного вибриона и изучена их протективная активность [4, 5], однако состав и спектр гидролитических ферментов наружной мембраны до сих пор мало изучен. Известно, что некоторые бактериальные гидролазы, присутствующие в поверхностных структурах, участвуют в активации системы врождённого иммунитета макроорганизма, обладают протективной и иммуномодулирующей активностью [1, 2], в связи с чем могут быть использованы при конструировании диагностических тест-систем и вакцинных препаратов [3].

Цель работы – энзимологическая характеристика иммуногенных препаратов субклеточных фракций (наружная мембрана), полученных из штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения методом субстратного электрофореза в полиакриламидном геле.

Материалы и методы. В работе использовано 12 штаммов *V. cholerae eltor* O1 и 2 штамма *V. cholerae* O139 серогруппы, выделенных во время эпидемических вспышек от больных холерой (*V. cholerae eltor* O1 М-800, И-1263, И-1298, И-1300, И-1334, И-1342, И-1337, *V. cholerae* O139 И-12) и из поверхностных водоемов в благополучный по холере период (И-638, 129–05-В, И-1368, И-680, 2–01, *V. cholerae* O139 И-16), любезно предоставленные музеем живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Бактерии культивировали на казеин-дрожжевом агаре, pH 7,2. Суточную культуру каждого штамма вибриона, выращенного при 37 °С, смывали 3ФР, после чего определяли концентрацию микробной взвеси. Препараты наружных мембран получали лизисом живых клеток холерных вибрионов раствором 4,5 М в конечной концентрации мочевины с последующим дифференциальным центрифугированием и обработкой лизата нуклеазами [4, 5]. После суточной экспозиции нерастворимый в мочедине материал (наружная мембрана возбудителя холеры, НМ) отделяли высокоскоростным центрифугированием, супернатанты (мочевинные экстракты, МЭ) подвергали диализу против проточной и дистиллированной воды и лиофилизировали. Иммунизацию животных (кроликов) полученными препаратами проводили двукратно подкожно, внутривенно и внутрибрюшинно. Зимографический анализ осуществляли посредством ДСН-электрофореза в блоках 8%-ного ПААГ, импрегнированного в процессе полимеризации разделяющего геля желатином, казеином, деацетилированным гликоляхитином, пептидогликаном, α-лецитином, протаминсульфатом, дрожжевой РНК («Sigma-Aldrich»), взятыми в конечной концентрации 0,1% (вес/об.) по методу [6]. О наличии гидролитической активности судили по образованию неокрашенных зон (полос) гидролиза на фоне окрашенных субстратных гелей.

Результаты. Зимографически показано, что большинство взятых в работу препаратов субклеточных фракций (наружная мембрана и мочевиновый экстракт) обладает широким набором гидролитических ферментов. Высокая хитозаназная активность отмечена в препаратах наружной мембраны, полученных из токсигенных штаммов холерных вибрионов – 3 высокомолекулярных хитозаназы. Показано, что препараты наружной мембраны обладают лецитиназной активностью, например, больше 3 лецитиназ наблюдается у токсигенного производственного штамма *V. cholerae eltor* O1 М 878, используемого для производства холерной вакцины, при этом активность токсигенных штаммов в отношении некоторых выявляемых ферментов выше, чем нетоксигенных. При изучении спектра протеаз установлено, что препараты наружной мембраны, полученные из токсигенных штаммов, характеризуются большим набором желатиназ и казеиназ, чем препараты из нетоксигенных штаммов. Установлено, что препараты наружной мембраны из токсигенных штаммов содержат большее количество протеаз, гидролизующих

специфичный для омпинов субстрат – протаминсульфат, что указывает на причастность к процессу гидролиза белками наружной мембраны, в частности OmpT и OmpU, обладающими иммуногенными свойствами [7].

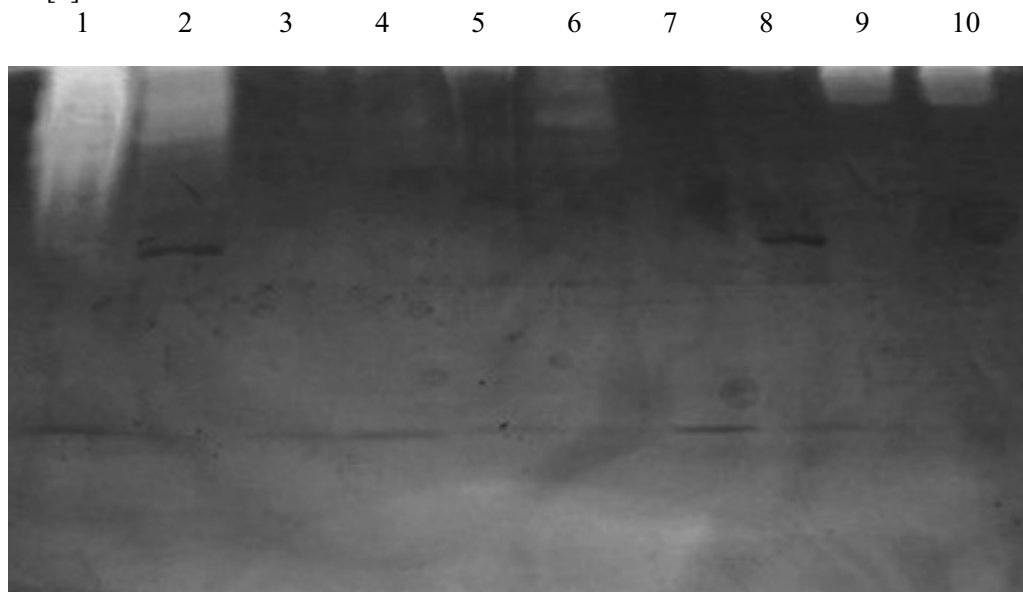


Рис. Энзим-электрофорез хитозаназ препаратов субклеточных фракций штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разного происхождения с 0,1% гликольхитином в качестве субстрата.

1 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 M 878 (ctx+); 2 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 И-1300 (ctx+); 3 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 129-05-B (ctx-); 4 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1368 (ctx-); 5 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1334 (ctx+); 6 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-1263 (ctx+); 7 – НМ *V. cholerae* eltor O1 И-638 (ctx-); 8 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 И-680 (ctx-); 9 – МЭ *V. cholerae* eltor O1 2-01 (ctx-); 10 – МЭ *V. cholerae* eltor O139 И-12 (ctx+).

Закключение. Таким образом, в результате проведённых исследований в препаратах наружной мембраны холерного вибриона зимографически выявлено наличие ряда гидролитических ферментов, установлены межштаммовые различия по степени их продукции. Показано, что препараты наружной мембраны из токсигенных штаммов обладают большим набором ферментов, что позволяет их использовать в качестве гиперпродуцентов гидролаз, т.е. сами препараты можно использовать в качестве одного из активных компонентов противохолерной химической вакцины.

Библиографический список

1. Nelson D.C., Garbe J., Collin M. Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* - a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins // *Biochem.* – 2011. – Vol. 392, N 12. – P. 1077–1088.
2. Potempa J., Pike R. Corruption of innate immunity by bacterial proteases // *J. Innate Immun.* – 2009. – Vol. 1, N 2. – P. 70–87.
3. Метаболический иммунитет к холере / А.К. Адамов. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1982. – 176 с.
4. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П. и др. Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины // *Журн. микробиол.* – 1995. – № 2. – С. 86–89.
5. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П. и др. Получение высокоиммуногенного препарата наружных мембран *Vibrio cholerae* eltor // *Журн. инфекционной патологии.* – 1998. – Т 5, №4. – С. 42–48.
6. Heussen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 102, N 1. – P. 196–202.
7. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae* // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63, N 11. – P. 4433–4438.

СИТУАЦИЯ ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ В 2015 г., ПРОГНОЗ НА 2016 г.

С.А. Косилко, С.В. Балахонов, Е.И. Андаев, М.В. Чеснокова, Н.В. Бренева,
Е.А. Сидорова, А.В. Севостьянова, Н.В. Яковчиц, А.В. Мазепа

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Иркутск, Россия*

По оценке специалистов Референс-центра по мониторингу возбудителей природно-очаговых инфекций при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям в регионе остается стабильно напряженной. В зону ответственности Референс-центра входят 12 субъектов Сибирского (СФО), 9 – Дальневосточного (ДФО) и три Уральского (УФО) федеральных округов. В 2015 г. зарегистрировано 6183 (в 2014 г. – 5350) больных природно-очаговыми инфекционными болезнями, в т. ч. туляремией – 20 (25), лептоспирозами – 5 (14), псевдотуберкулезом – 817 (891), кишечным иерсиниозом – 657 (543), клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ) – 1218, иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) – 1705, клещевым риккетсиозом (КР) – 1535, гранулярным анаплазмозом человека (ГАЧ) – 32, моноцитарным эрлихиозом человека (МЭЧ) – 10, ГЛПС – 140 и 44 завозных случая лихорадки денге. Наиболее пораженным остается СФО, на который приходится 80% всех зарегистрированных случаев. Традиционно среди природно-очаговых инфекционных болезней преобладают клещевые инфекции: ИКЭ, ИКБ, ИР.

Клещевой вирусный энцефалит. В 2015 г. зарегистрировано 1218 случаев КВЭ, из них в СФО – 1115 (5,77‰), в ДФО – 37 (0,6‰), в УФО – 66 (0,5‰). В сравнении с предыдущим годом наблюдается рост заболеваемости в 1,4 раза (2014 г. – 1027) преимущественно за счет увеличения числа заболевших в СФО (2014 г. – 919). Неблагополучными по КВЭ территориями, определяющими показатель заболеваемости по СФО в 2015 г., являются Красноярский край (13,26‰), Республики Алтай (8,03‰) и Хакасия (6,7‰), Новосибирская область (6,15‰). Подъем заболеваемости зарегистрирован в девяти субъектах из 12. Снижение показателя заболеваемости в 1,2–1,6 раза отмечено в Республике Тыва – 4,4‰ (в 2014 г. – 6,04‰), Омской – 1,31‰ (1,62‰) и Томской – 5,89‰ (9,87‰) областях.

В ДФО заболеваемость КВЭ зарегистрирована в трех субъектах из восьми: Приморском (1,37‰) и Хабаровском (0,6‰) краях, Амурской области (0,49‰). Рост заболеваемости в 1,6 раза зарегистрирован в Приморском крае (в 2014 г. 0,85‰). На курируемой территории УФО заболеваемость регистрировалась в Тюменской области (3,92‰) и Ханты-Мансийском автономном округе (0,62‰).

Иксодовый клещевой боррелиоз. На курируемой территории в 2015 г. зарегистрировано 1705 случаев ИКБ, что на 19,1% больше, чем в 2014 г. (1436) в т. ч. в СФО – 1370 случаев, показатель составил 7,09‰. Увеличение числа заболевших отмечено практически во всех субъектах округа за исключением Республики Тыва – 25,8‰ (2014 г. – 27,99‰), Томской – 10,5‰ (17,8‰) и Омской – 0,51‰ (0,56‰) областей. Подобная картина на этих административных территориях наблюдается и по КВЭ. Наиболее неблагополучные по ИКБ Республики Тыва (25,8‰) и Хакасия (11,4‰), Новосибирская (10,7‰), Томская области (10,5‰). В ДФО диагноз ИКБ поставлен 266 больным, что на 46,9% больше, чем в 2014 г. (181 случай). Заболеваемость отмечалась в шести субъектах из восьми, исключением стали Камчатский край и Магаданская область. Существенный рост наблюдался в Приморском крае – 8,01‰ (2014 г. – 5,67‰), Сахалинской области – 9,2‰ (5,7‰), Хабаровском крае – 4,33‰ (3,43‰) и Амурской области – 1,85‰ (0,24‰). На курируемых территориях УФО зарегистрировано 69 (0,6‰) случаев заболевания ИКБ, что на 21,6% меньше в сравнении с предыдущим годом (88 случаев). Не исключено, что косвенной причиной роста заболеваемости послужило развитие диагностических возможностей профильных учреждений на местах.

Риккетсиозы. В 2015 г. зарегистрировано 1535 случаев в 17 субъектах курируемой территории.

Наиболее пораженным остается сельское население – 63,5%. В СФО зарегистрирован 1201 случай ($6,22^{0/0000}$), заболеваемость снизилась по сравнению с 2014 г. на 12,2% ($1345/7,55^{0/0000}$). Остается сложной ситуация в Республике Алтай, где показатель заболеваемости вырос на 18,2% и составил $88,83^{0/0000}$. Сохраняется высокий уровень заболеваемости в Алтайском крае – $20,83^{0/0000}$ и Республике Тыва – $18,6^{0/0000}$. В 2015 г. в ДФО зарегистрировано 317 больных, что на 18,3% выше, чем в 2014 г. Заболевания выявлены в Приморском – 121 случай ($6,25^{0/0000}$), Хабаровском – 156 ($11,65$), в Еврейской АО – 20 ($11,9^{0/0000}$) и Амурской области – 20 ($2,47^{0/0000}$). В УФО в минувшем году всего зарегистрировано 17 случаев, из них в Тюменской области – 12 ($0,14^{0/0000}$) и ХМАО – 5 ($0,31^{0/0000}$).

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. В минувшем году выявлено 140 случаев ГЛПС (в 2014 г. – 122), диагноз в 95% случаев подтвержден серологически. Традиционно наибольшее число заболевших (133) отмечено в ДФО с показателем $2,1^{0/0000}$, уровень заболеваемости вырос на 30% по сравнению с 2014 г. Эпидемические проявления ГЛПС наиболее выражены в Приморском, где показатель вырос в 2 раза и составил $4,94^{0/0000}$ (90 случаев) против 43– ($2,44^{0/0000}$) в 2014 г. и Хабаровском краях – $2,24^{0/0000}$ (30 случаев), в 2014 г. – $1,79^{0/0000}$ (24 случая). Снижение показателей заболеваемости в 2,5 раза ($0,25^{0/0000}$) отмечается в Амурской области и в 1,8 раза ($5,9^{0/0000}$) в Еврейской АО. Впервые за 15-ти-летний период зарегистрирован один случай ($0,2^{0/0000}$) ГЛПС в Сахалинской области у местного жителя. В 64% случаев больные ГЛПС являются городскими жителями, среди детского населения случаи ГЛПС зарегистрированы в Еврейской АО – 2 случая ($6,2^{0/0000}$) и Приморском крае – 1 случай ($0,32^{0/0000}$). В УФО выявлено 7 случаев ГЛПС ($0,05^{0/0000}$), в 2014 г. – 13. Больные регистрировались в Тюменской области – один случай ($0,07^{0/0000}$), Ханты-Мансийском АО – два ($0,12^{0/0000}$) и Ямало-Ненецком АО – четыре ($0,74^{0/0000}$).

Лихорадка денге. В 2015 г. зарегистрировано 44 завозных случая лихорадки денге, из них в СФО – 18 (Новосибирская область – 6, Красноярский край – 6, Иркутская область – 5, Забайкальский край – 1), в ДФО – 26 (Хабаровский край – 14, Сахалинская область – 6, Приморский край – 4, Амурская область – 1, Р. Саха – 1). В сравнении с 2014 г. (40 случаев) число завозных случаев лихорадки денге увеличилось на 4. Перераспределилась заболеваемость среди округов: в предыдущие годы число завозных случаев в СФО было выше, чем в ДФО. Как правило, заражение происходит во время посещения стран Юго-Восточной Азии: Таиланд – 32 (72,7%), Вьетнам – 8 (18,2%), Индонезия – 1 (2,3%), Филиппины – 3 (6,8%). Диагноз у больных был подтвержден вирусологическими, серологическими и молекулярно-генетическими методами. Патогенный агент выделен из 9 проб.

Туляремия. В 2015 г. зарегистрировано 20 случаев туляремии в семи субъектах (в 2013 г. – 1016, в 2014 г. – 25), в том числе в Новосибирской – 5, Омской – 1, Кемеровской областях – 1, Алтайском крае – 1, Хабаровском крае – 9, Приморском крае – 1 и Ханты-Мансийском АО – 1. Эпизоотические проявления на большинстве территорий носили локальный характер и не распространялись на соседние территории.

Лептоспирозы. Заболевания лептоспирозами зарегистрированы в Сахалинской области – 2, Приморском крае, Иркутской и Новосибирской областях по 1 случаю, что с высокой вероятностью не отражает уровень заболеваемости в Сибири и на Дальнем Востоке. Об этом косвенно свидетельствуют высокий уровень летальности – 40% (2 умерших из пяти заболевших).

Основная проблема лабораторной диагностики лептоспирозов заключается в том, что имеющиеся коммерческие тест-системы ИФА и ПЦР не имеют государственной регистрации. Поэтому клинические лаборатории лишены возможности быстрой диагностики заболевания. Как следствие этого – поздняя диагностика только тяжелых случаев и низкая выявляемость больных лептоспирозом.

Псевдотуберкулез. В 2015 г. зарегистрировано 817 больных псевдотуберкулезом в 21 субъекте Сибири и Дальнего Востока с преобладанием заболевших среди городского населения (74,9%) и детей до 14 лет (59,1%). Как и в предыдущие годы установлены территории с наиболее высокими показателями заболеваемости: в Сибири это Новосибирская ($11,47^{0/0000}$), Кемеровская ($5,65^{0/0000}$) и Томская ($4,3^{0/0000}$) области; на Дальнем Востоке – Камчатский край ($10,7^{0/0000}$) и Сахалинская ($6,1^{0/0000}$) область. Эпидемических осложнений не было. Впервые за последние 10 лет наметилась тенденция роста заболеваемости в ДФО с интенсивностью прироста 47%.

Прогноз на 2016 г. Исходя из анализа факторов, формирующих многолетний уровень заболеваемости, неблагоприятная эпидемическая ситуация ожидается по КВЭ в Красноярском крае, Республиках

Алтай, Хакасия, Томской области; ИКБ – в Республиках Тыва, Хакасия, Томской, Новосибирской, Сахалинской областях, Красноярском и Приморском краях; КР – в Республиках Алтай, Тыва, Алтайском крае; ГЛПС – в Приморском и Хабаровском краях, ЕАО; туляремии – в Алтайском, Красноярском, Хабаровском, Камчатском краях, Новосибирской, Омской, Томской, Кемеровской областях; лептоспирозам – Приморском, Хабаровском краях. Заболеваемость псевдотуберкулезом сохраняется в пределах среднесуточных показателей, хотя нельзя исключить возникновение локальных эпидемических вспышек в детских организованных коллективах.

РАНЖИРОВАННЫЙ АНАЛИЗ ПОСТГЕНОМНОЙ ОЦЕНКИ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО СТАТУСА МИКРОБИОЦЕНОЗОВ ГОРОДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ИНДИВИДУУМОВ, РИСКА ПАТОГЕННОСТИ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ МИКРОБИОЦЕНОЗНЫХ КОНСОРЦИУМОВ

В.М. Лахтин, М.В. Лахтин, А.Л. Байракова, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин

ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

В диагностике и профилактике инфекционных болезней важную роль играет развитие новых методологий постгеномной оценки событий в организме потенциального пациента. Среди них все большую значимость приобретает ранжированный анализ одновременно качественных и количественных макропараметров и макрофункций метаболизма микроорганизмов человека. **Цель** настоящей работы – обобщить результаты собственных исследований по применению анализа ранжирования выраженности регуляторов культур пробиотических и условно-патогенных штаммов микроорганизмов человека для диагностико-прогностической оценки статуса биотопных микробиоценозов организма, а также конструирования микробиоценозных консорциумов слизистой открытых полостей организма.

Результаты. 1. Конструирование пробиотиков – профилактических ингредиентов пробиотического компартмента микробиоценоза организма [1–3]. Предложены алгоритмы получения штаммовых, лактобациллярных, бифидобактериальных и смешанных про/синбиотиков для широкого применения в медицинской микробиологии и биотехнологии с профилактическими и терапевтическими целями. 2. Выявление лидерных микроорганизмов в функционирующих антагонистических микробиоценозах человека [4–8]. Предложены алгоритмы выявления лидерных штаммов во взаимодействующих пробиотическом и условно-патогенном компартментах биотопных микробиоценозов. 3. Антимикробные агенты - индикаторы групп условно-резистентных патогенов, регуляторы сцепленности микроорганизмов в микробиоценозах городской популяции индивидуумов [9–12]. Предложены алгоритмы оценки чувствительности и резистентности к антимикробным агентам (антибиотикам, в том числе антимикотикам) видов, групп штаммов и штаммов условно-патогенных микроорганизмов (дрожжеподобных и грамположительных).

Заключение. Результаты перспективны для применения в качестве составляющих новых инноваций в медицинскую микробиологию и медицинскую биотехнологию.

Библиографический список

1. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Черепанова Ю.В. и др. Ранжирование качеств производственных ингредиентов пробиотических штаммов бифидобактерий и лактобацилл человека для прогнозирования новых пробиотических формул // Современные достижения биотехнологии: Сб. материалов международной научно-технической конференции и международного научно-практического семинара «Феномен молочной сыворотки: синтез науки, теории и практики» (г. Ставрополь, 21–23 июня, 2011). Часть 2 – М.: НОУ «Образовательный научно-технический центр молочной промышленности», 2011. - С. 49–51.

2. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Агапова Ю.В. и др. Преимущества пробиотического консорциума «Аци-лакт» в сравнении с ингредиентными штаммами с использованием алгоритма ранжирования качеств // Materiały VIII Międzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Naukowa przestrzeń Europy - 2012» Vol. 32. – Str. 50–57. Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia.
3. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Ранжирование макропараметров культур грамположительных бактерий для конструирования консорциумов и штаммов на примере бифидобактерий и лактобацилл // Материали за 11-а международна научна практична конференция, «Образованието и науката на XXI век», - 2015. Том 7. Лекарство. Биологии. Екология. Химия и химически технологии. Селско стопанство. София. «Бял ГРАД-БГ» ООД - Стр. 25–28.
4. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Роль лидерных штаммов одних видов в упорядочивании, инициации и переключении сосуществующих в биотопе (суб)популяций микроорганизмов других видов // Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы: III Международная научная Интернет-конференция : материалы конф. (Казань, 16 апреля 2014 г.) / Сервис виртуальных конференций Pax Grid ; сост. Синяев Д. Н. - Казань : ИП Синяев Д. Н. , 2014. – С. 143–146.
5. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Биопленкообразование в биотопном микробиоценозе человека: модель для прогностических расчетов межмикробных взаимосвязей // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2015. - № 3. – С. 56–62.
6. Лахтин В.М., Лахтин М.В., Байракова А.Л., Афанасьев С.С. Алгоритм поиска составов штаммовых пулов взаимодействующих микроорганизмов, обеспечивающих стабильность биотопа // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. - Т. 60, № 9. – С. 72.
7. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Алешкин В.А. Лидерные микроорганизмы: перспективы для профилактики и терапии // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке. Серия Медицина». – 2015. - Т. 17, № 4. – С. 403–407.
8. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S. et al. Leader and consortia microorganisms in human synbiotope balanced microbiocenosis // Materiały XII Międzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Naukowa przestrzeń Europy - 2016» Vol. 10. Medycyna. Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia – Str. 68–75.
9. Лахтин В.М., Байракова А.Л., Лахтин М.В., Афанасьев С.С. Системная оценка резистентности и чувствительности к антимикотикам рода, видов и штаммов кандид популяционного урогенитального биотопа – потенциальных участников кандидозов // Успехи медицинской микологии. – 2014. - Т. 12. - С. 187–190.
10. Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Байракова А.Л. и др. Антибиотики как селективные упорядочивающие перестройщики эукариотического микробиоценоза человека: на примере пула кандид популяционного урогенитального биотопа // Инфекционные болезни. – 2014. – Т. 12, прил. № 1. – С. 171.
11. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С. и др. Прогнозирование взаимоотношений пробиотикоподобных бактерий, дрожжеподобных грибов и антибиотиков в популяционном биотопе // Materiały X Międzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Strategiczne pytania światowej nauki [Стратегические вопросы мировой науки] - 2014». Vol.28. – P.37–42. Nauk biologicznych. : Przemysł. Nauka i studia.
12. Лахтин В.М., Байракова А.Л., Лахтин М.В. и др. Оценка постгеномного риска патогенности антибиотикорезистентных групп клинических штаммов стафилококков городской популяции // Materiały XII Międzynarodowej naukowi-praktycznej konferencji «Aktualne problemy nowoczesnych nauk - 2016». Vol. 11. Biologiczne nauki, Medycyna, Chemia i chemiczne technologie , Gospodarka rolna, Weterynaria, Współczesne informacyjne technologie , Ekologia: Przemysł. Nauka i studia - Str.6–9.

О КОРРЕЛЯЦИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С РАЗНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКОЙ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Мониторинговые исследования за наличием холерных вибрионов в поверхностных водоёмах имеют существенное значение для объективной оценки эпидситуации по холере на контролируемой административной территории России [1–4]. Трактовка результатов мониторинга может быть неоднозначной: с одной стороны, в случае обнаружения в воде открытых водоёмов токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 речь идёт об угрозе этих объектов как резервуара инфекции, а с другой – при повышении частоты выделения атоксигенных культур можно косвенно судить о создавшихся благоприятных условиях для пребывания и сохранения в воде эпидемически опасных штаммов в случае их попадания в водоёмы и стоки в результате заноса. Водные экосистемы могут выступать в качестве резервуара генов патогенности холерных вибрионов [5].

Оценка эпидемической значимости штаммов *V. cholerae* в первую очередь требует определения наличия/отсутствия генетических детерминант факторов патогенности – холерного токсина (ctxAB) и токсин-корегулирующих пилей адгезии (TCP, tcpA). Наряду с ежегодным выделением на территории России атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 обращает на себя внимание появление клонов, не имеющих полный кластер коровой области CTXφ, но имеющие кластер VPI (tcpA и toxT) [6]. Так как, по-видимому, такие штаммы с большей вероятностью могут колонизировать кишечник, и, как следствие, способны вызывать спорадические случаи заболевания у людей и вспышки [7].

Цель исследования заключалась в определении взаимосвязи между выделением токсигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (ctxAB+tcpA+) и атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, не имеющих полный кластер коровой области CTXφ, но имеющих кластер VPI (tcpA и toxT) из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 2002 по 2015 гг.

В период с 2002 по 2015 гг., включая работу в рамках Референс-центра по мониторингу холеры (с 2008 г.), в лаборатории микробиологии холеры были идентифицированы 737 штаммов холерных вибрионов: из них 674 (91,5%) штамма атоксигенных культур *V. cholerae* O1, 60 (8,1%) – штаммы, с генетической характеристикой ctxAB-tcpA+ и 3 (0,4%) токсигенных штамма (ctxAB+tcpA+).

Штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой ctxA-tcpA+ выделяли на территориях Ростовской области (2002 г. – 3 штамма, 2005 г. – 10 штаммов, 2007 г. – 3 штамма, 2015 г. – 2 штамма), Республики Калмыкия (2003 г. – 21 штамм, 2011 г. – 1 штамм, 2012 г. – 10 штаммов, 2013 г. – 2 штамма, 2015 г. – 4 штамма) и Хабаровского края (2013 г. – 2 штамма). Культуры *V. cholerae* O1 с генетической характеристикой ctxAB+tcpA+ с 2002 по 2015 гг. были выделены только на территории Ростовской области (2003 г. – 1 штамм, 2011 г. – 1 штамм, 2014 г. – 1 штамм).

В виду того что штаммы с генетической характеристикой ctxA-tcpA+ были изучены с 2002 года, выделенные из объектов окружающей среды на территории России, мы посчитали, что корректный сравнительный анализ мы могли провести только за 2002–2015 гг. Результаты представлены в табл. 1.

Таким образом, в результате проведенного корреляционного анализа была выявлена прямая средняя связь между количеством штаммов холерных вибрионов O1 с генетической характеристикой ctxAB-tcpA+ и ctxAB+tcpA+, выделенных из воды с 2002 г. по 2015 г., что дает основание для предположения о том, что обнаружение штаммов холерных вибрионов в воде открытых водоемов на территории России (ctxAB-tcpA+) может быть расценено как косвенный показатель возможного присутствия токсигенных штаммов холерных вибрионов, однако для уточнения установленной связи требуется продолжение исследований в данном направлении.

Таблица 1.

Расчет и оценка коэффициента корреляции между выделением из водных объектов окружающей среды штаммов *V. cholerae* O1 с генетическими характеристиками *ctxAB-tcpA+* и *ctxAB+tcpA+* с 2002 г. по 2015 г.

Годы	Кол-во штаммов <i>V. cholerae</i> O1 <i>ctxAB+tcpA+</i> (x)	Кол-во штаммов <i>V. cholerae</i> O1 <i>ctxAB-tcpA+</i> (y)	Отклонение		dx^2	dy^2	xdy
			dx	dy			
2002	0	3	-0,2	-1,3	0,04	1,69	0,26
2003	1	21	0,8	15,7	0,64	246,49	15,56
2004	0	0	-0,2	-4,3	0,04	18,49	0,86
2005	0	10	-0,2	5,7	0,04	32,49	-1,14
2006	0	0	-0,2	-4,3	0,04	18,49	0,86
2007	0	3	-0,2	-1,3	0,04	1,69	0,26
2008	0	0	-0,2	-4,3	0,04	18,49	0,86
2009	0	0	-0,2	-4,3	0,04	18,49	0,86
2010	0	0	-0,2	-4,3	0,04	18,49	0,86
2011	1	1	0,8	-2,3	0,64	5,29	-1,84
2012	0	10	-0,2	4,7	0,04	22,09	-0,94
2013	0	4	-0,2	-0,3	0,04	0,09	0,06
2014	1	0	0,8	-4,3	0,64	18,49	-3,44
2015	0	6	-0,2	1,7	0,04	2,89	0,34
$n=14$	$\sum x=3$	$\sum y=58$			$\sum dx^2=1,76$	$\sum dy^2=423,66$	$\sum xdy=-10,42$
среднее	0,2	29					

Примечания 1 - полученные значения подставляли в формулу расчета r (коэффициента корреляции): $r = \sum xdy / \sqrt{\sum dx^2 \sum dy^2} = +10,42 / \sqrt{1,76 * 423,66} = +0,4$. Связь средняя. 2 - Достоверность коэффициента корреляции оценивалась с помощью средней ошибки (m_2) по формуле: $m_2 = 1 - r / \sqrt{n} = 0,99$; 3 - Коэффициент корреляции достоверен с вероятностью 95%.

Библиографический список

1. Мазрухо Б.Л., Кругликов В.Д., Монахова Е.В. и др. Микробиологические аспекты мониторинга за наличием холерных вибрионов в объектах окружающей среды г. Ростова-на-Дону // Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. – 2005. – №18. – С.22–25.
2. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. и др. Эпидемические проявления холеры, обусловленные *ctxAB-tcpA+* холерными вибрионами O1 // Журн. микробиол. – 2006. – № 1. – С. 23–29.
3. Кругликов В.Д., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. и др. Изучение циркуляции холерных вибрионов в водоемах и стоках г. Ростова-на-Дону в период с 2008 по 2011 гг. // Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2012. – №25. – С. 50–54.
4. Ежова М.И., Кругликов В.Д., Ломов Ю.М. и др. Результаты мониторинга наличия холерных вибрионов в поверхностных водоемах и стоках г. Ростова-на-Дону в 2010 г. // Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и материалы проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2011. – № 24. – С. 58–61.
5. Monakhova E.V. Phenotypic and molecular characteristics of epidemic and non-epidemic *Vibrio cholerae* strains isolated in Russia and certain countries of Commonwealth of Independent States (CIS) // Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera. – Springer Science+Business Media. – 2010. – Ch.4. – P. 51–78.
6. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxAB-tcpA+*, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 9 (258). – С. 32–34.
7. Костромитина Е.А. Молекулярно-генетические свойства штаммов холерного вибриона Эльтор с различной эпидемической значимостью // Автореферат дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2004. – 22 с.

ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА СТЫКЕ СЕВЕРНОЙ ТАЙГИ И ЛЕСОТУНДРЫ В ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

С.А. Леонтьева¹, Е.А. Брагина¹, А.А. Катин¹, Т.Ф. Степанова¹, Л.А. Нечипуренко², В.В. Харьков²

¹ФБУН Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, Тюмень; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ямало-Ненецком автономном округе», Салехард, Россия

Природная очаговость есть явление совместного существования в определенных биотопах данного географического ландшафта патогенных микроорганизмов («вируса»), их переносчиков и животных – доноров и реципиентов вируса, как естественных компонентов свойственных таким биотопам биоценозов [5]. Основными хозяевами возбудителей и прокормителями различных фаз развития переносчиков возбудителей инфекций (кровососущих насекомых и клещей) в природных очагах инфекций служат мелкие млекопитающие – грызуны (*Rodentia*) и насекомоядные (*Eulipotyphla*). Общеизвестна роль мелких млекопитающих в эпизоотологии природно-очаговых зоонозов: клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, омская геморрагическая лихорадка, туляремия, клещевой сыпной тиф, лептоспироз и т. д. [4].

Цель – изучение проявления природно-очаговых инфекций на территории стыка северной тайги и лесотундры в западной части Западной Сибири.

Материалы и методы

Сбор материала проведен в различных районах Ямало-Ненецкого АО в 2010 г. (окрестности п. Казым-Мыс), 2012 г. (окрестности г. Ноябрьск), 2015 г. (окрестности гг. Новый Уренгой и Тарко-Сале). В ходе исследований было отработано 4450 ловушко-суток и 175 капкано/суток. Всего было отловлено 169 особей мелких млекопитающих, представителей 9 видов. При учете кровососущих насекомых использовали стандартный энтомологический сачок, учеты проводили по стандартной методике на 100 взмахов сачком. Иксодовых клещей в исследуемых районах не обнаружено.

На обследуемой территории проводилось комплексное исследование материала на туляремию, ГЛПС, лихорадку Западного Нила, лептоспироз. Исследование внутренних органов и крови мелких млекопитающих на наличие РНК ЛЗН и лептоспир проводили методом ПЦР с наборами реагентов производства «Интерлабсервис», г. Москва. Антиген возбудителя *Francisella tularensis* выделяли методом ИФА (с помощью диагностической тест-системы ИФА-Тул-СтавНИИПЧИ), г. Ставрополь, ГЛПС – тест-системой «Хантагност», г. Москва.

Результаты и обсуждение

Териофауна Ямало-Ненецкого АО крайне бедна на севере и значительно обогащается с продвижением на юг.

В г. Новый Уренгой, согласно нашим исследованиям, доминантным видом является красная полевка, встречается бурозубка обыкновенная. С продвижением на юг (г. Тарко-Сале, г. Ноябрьск) доминантом оставалась полевка красная, встречались также полевка-экономка, бурозубка обыкновенная, бурозубка малая, ондатра, бурундук азиатский. В окрестностях п. Казым-Мыс доминантным видом была бурозубка средняя.

Индекс обилия мелких млекопитающих в г. Новый Уренгой составил 0,78, в г. Тарко-Сале – 4,57. При проведенных в 2010 г. в Шурышкарском районе исследованиях индекс обилия составил 3,66, а в г. Ноябрьск индекс обилия составил 5,22. Половая структура популяций грызунов характеризуется преобладанием самок в окрестностях г. Новый Уренгой. В г. Тарко-Сале процент отловленных самцов и самок одинаков (50,0%). В 2010, 2012 гг. при отловах мышевидных грызунов в Шурышкарском районе и г. Ноябрьск с незначительным превосходством преобладали самцы (самцы – 55,3%; самки – 44,7%).

Повидовая характеристика половой структуры представлена следующими соотношениями: у по-

левки красной в г. Новый Уренгой 90% самок, так же как и у бурозубки обыкновенной. В северной тайге (г. Тарко-Сале) в 2015 г. у доминантного вида соотношение самок и самцов составило соответственно 51,2 и 48,8%. В г. Ноябрьск наблюдалось преобладание самцов – 58,6%.

В Шурышкарском районе в 2010 году не встретилось ни одной беременной самки, в г. Новый Уренгой доля беременных самок составила 55,5, немного меньше показатели беременных самок в гг. Ноябрьск (43,0%) и Тарко-Сале (31,0%).

Доля сеголеток в г. Новый Уренгой составила лишь 9,0%, а в г. Тарко-Сале – 53,1%. В Шурышкарском районе все отловленные нами грызуны являлись сеголетками.

Численность мелких млекопитающих может значительно колебаться по годам. Причем эти колебания у разных видов могут не совпадать, и тогда состав доминантов по годам будет меняться [1]. В фауне млекопитающих отмечаются и сезонные изменения видового состава [2].

Туляремия

При исследовании внутренних органов мелких млекопитающих (печень, селезенка) из окрестностей п. Казым-Мыс (Шурышкарский район) антиген возбудителя туляремии не обнаружен. Из 81 животного, отловленного в окрестностях г. Ноябрьск, антиген возбудителя туляремии обнаружен у 2 мелких млекопитающих, составив $2,46 \pm 1,7\%$. Из внутренних органов грызунов, отловленных в окрестностях гг. Тарко-Сале и Новый Уренгой антиген туляремии выделен соответственно у $12,3 \pm 4,1\%$ и $11,11 \pm 10,4\%$ (табл. 1). При исследованиях, проводившихся в 1997 г. в Шурышкарском районе, туляремийный антиген из селезенки мелких млекопитающих не выявлен [6].

ГЛПС

Из 4 исследуемых нами районов, антиген возбудителей хантавирусов обнаружен только в Шурышкарском – $10,0 \pm 9,4\%$ и в Пуровском районах – $1,58 \pm 1,56\%$ (табл. 1). Ранее в Шурышкарском районе в легких красной полевки уже выделяли антиген хантавирусной инфекции [3]. В 2005 г. в тундрах Ямала выделен хантавирус в легких полевки Миддендорфа [6].

Таблица 1.

Выявление антигена возбудителей природно-очаговых заболеваний из внутренних органов, крови мелких млекопитающих

район		ГЛПС	Туляремия	лептоспироз	ЛЗН
п. Казым-Мыс	<i>Исслед.</i>	10	10	-	-
	<i>Полож.</i>	1	0	-	-
	<i>P±tr</i>	$10,0 \pm 9,4$			
г. Ноябрьск	<i>Исслед.</i>	83	81	-	-
	<i>Полож.</i>	0	2	-	-
	<i>P±tr</i>		$2,46 \pm 1,7$		
г. Тарко-Сале	<i>Исслед.</i>	63	65	63	63
	<i>Полож.</i>	1	8	7	20
	<i>P±tr</i>	$1,58 \pm 1,56$	$12,3 \pm 4,1$	$11,11 \pm 3,9$	$33,3 \pm 5,9$
г. Новый Уренгой	<i>Исслед.</i>	11	9	11	6
	<i>Полож.</i>	0	1	0	0
	<i>P±tr</i>		$11,11 \pm 10,4$		

Лептоспироз и лихорадка Западного Нила

Выявление РНК лептоспир и ЛЗН проводили из внутренних органов и крови мелких млекопитающих, отловленных в 2015 г. в гг. Тарко-Сале и Новый Уренгой. Из внутренних органов грызунов, отловленных в окрестностях г. Новый Уренгой, данных возбудителей не выявлено. В крови мелких млекопитающих, отловленных в окрестностях г. Тарко-Сале, РНК лихорадки Западного Нила была выявлена в 33,3%. РНК лептоспир выделялась как в крови, так и в органах мелких млекопитающих: $11,11 \pm 3,9$ (табл. 1).

Таким образом, в ходе проведенных исследований выявили, что доминантным видом и основным хозяином возбудителей природно-очаговых инфекций, является красная полевка. В большинстве случаев преобладали сеголетки.

Во всех районах исследования выявлен антиген возбудителя туляремии, а также РНК лептоспир и ЛЗН, что позволяет говорить о наличии природных очагов данных инфекций на исследованной территории.

Библиографический список

1. Гашев С.Н. Млекопитающие в системе экологического мониторинга (на примере Тюменской области). Тюмень: Издательство Тюменского государственного университета, 2000. - 220 с.
2. Лаптев Н.И. Некоторые аспекты влияния нефтегазодобывающего комплекса на наземных животных в северных районах Томской области // Биологическое разнообразие животных Сибири. – 1998. – С. 202–203.
3. Малькова М.Г., Богданов И.И., Танцев А.К. и др. Мелкие млекопитающие и их эктопаразиты в природных очагах трансмиссивных инфекций на территории Ямало-Ненецкого Автономного округа // Природно-очаговые инфекции в России: современная эпидемиология, диагностика, тактика защиты населения. – 1998. – С.62–64.
4. Никулина Н.А. Гамазовые клещи и их роль в циркуляции зооантропонозов // Современные проблемы и перспективы развития АПК: Материалы региональной научно-практической конференции с международным участием, Ч. 2. – Иркутск, 2014. – С.125–131.
5. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов / Е.Н. Павловский. - М.-Л.: Наука, 1964. - 210 с.
6. Якименко В.В., Гаранина С.Б., Малькова М.Г. и др. Итоги изучения хантавирусов в Западной Сибири // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2008. – № 2. – С. 20–26.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ ВИРУСНОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА В 2015 ГОДУ

Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Е.А. Манин

*ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия*

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) вирусной этиологии представляют серьезную угрозу для здоровья населения Северо-Кавказского федерального округа (СКФО). Регион эндемичен по Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ), случаи заболевания и маркеры вируса которой выявляются здесь ежегодно. Также результаты эпизоотологического мониторинга свидетельствуют о циркуляции на территории субъектов СКФО возбудителей таких опасных инфекционных вирусных заболеваний, как лихорадка Западного Нила (ЛЗН) и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС). Кроме того, в 2015 г. был зарегистрирован клинический случай тяжелой инфекционной болезни, практически всегда заканчивающейся летальным исходом – бешенства.

На протяжении последних лет в СКФО сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка по КГЛ, составившей 27,2% от всех зарегистрированных случаев заболевания ПОИ на территории региона в 2015 г. Всего было выявлено 46 больных КГЛ, что превысило данные предыдущего года в 1,6 раза (29 – в 2014 г.) [5]. Случаи заболевания регистрировали в 3 субъектах – Ставропольском крае, Республике Дагестан и Карачаево-Черкесской Республике. Наиболее высокий рост заболеваемости КГЛ относительно уровня предыдущего года и большинство зарегистрированных больных отмечены в Ставропольском крае (43, в 2014 г. – 27). В Республике Дагестан, где ежегодно регистрируются единичные случаи КГЛ, количество выявленных больных сохранилось на уровне предыдущего года (2 случая) [6]. На территории Карачаево-Черкесской Республики в прошлые годы регистрировали только заносные случаи КГЛ, в 2015 г. вновь выявлен больной, заражение которого произошло во время пребывания в Ставропольском крае.

Случаи заболевания регистрировали с мая по август, пик заболеваемости отмечен в июне, когда было выявлено 54,3% больных КГЛ. Заболевание регистрировалось у взрослых старше 19 лет с преобладанием лиц мужского пола (69,9%). Почти все случаи КГЛ (97,9%) были зарегистрированы среди сельских жителей. У большинства больных (65,2%) в анамнезе был выявлен укус клещом, на возможный контакт с ним во время выполнения сельскохозяйственных работ или ухода за животными указали 30,4% и 4,3% заболевших соответственно.

Благодаря раннему выявлению больных, 80,4% которых обратились за медицинской помощью в первые 3 сут появления первых симптомов заболевания, и своевременно начатому лечению 69,6% случаев КГЛ протекали без геморрагического синдрома и 76% – в клинической форме средней тяжести. Предварительный диагноз «КГЛ» при госпитализации был поставлен только больным в Ставропольском крае (80,4% больных). Лабораторно диагноз сочетанием методов ПЦР и ИФА был подтверждён в 93,5% случаев, только положительными результатами ИФА – в 6,5%.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя КГЛ в 2015 г. был проведен на территории 5 из 7 субъектов СКФО (за исключением Чеченской Республики и Республики Северная Осетия-Алания). Большинство положительных проб было получено при исследовании полевого материала, собранного на территории Ставропольского края. При исследовании методом ПЦР РНК вируса КГЛ выявлена в 28 пулах иксодовых клещей, в 1 пробе органов зайца-русака и 2 пробах органов птиц. Антиген возбудителя КГЛ выявлен в 32 пулах клещей. По сравнению с предыдущим годом инфицированность полевого материала вирусом КГЛ возросла в 1,7 раз.

Также циркуляция возбудителя КГЛ в 2015 г. обнаружена на территории Кабардино-Балкарской Республики (где инфицированность клещей составила 6,9%, что выше показателя 2014 г. в 7,7 раз), Республики Дагестан (где заражённость клещей по сравнению с предыдущим годом увеличилась в 6,7 раз) и Республики Ингушетия. В 2014 г. маркеры возбудителя КГЛ были выявлены на территории Карачаево-Черкесской Республики [2].

Случаи заболевания людей бешенством на территории СКФО не отмечались с 2011 г. В ноябре 2015 г. вновь выявлен случай бешенства у 33-летнего жителя Ставропольского края. Больной был госпитализирован на 3 сутки от начала заболевания, диагноз бешенства был подтверждён методом ПЦР (забор материала для исследования был проведён на 5-е сутки после госпитализации). Данные эпиданамнеза свидетельствуют, что заражение возникло в результате укуса домашней собакой. Заболевание закончилось летальным исходом.

На территории СКФО отмечали только завозные случаи заболевания ЛЗН – 2 случая в 2013 г. в Ставропольском крае из Волгоградской области), но при проведении эпизоотологического мониторинга в 2015 г. в Ставропольском крае и Кабардино-Балкарской Республике маркеры возбудителя ЛЗН обнаружены в Ставропольском крае. В прошлые годы положительные находки также имели место – в 2013 г. антиген вируса Западного Нила был обнаружен на территории Республики Дагестан у иксодовых клещей и комаров, и в 2014 г. – у иксодовых клещей, собранных на территории Республики Ингушетия [4].

Случаи заболевания людей ГЛПС в СКФО не регистрируются и долгое время регион считался неэндемичным по хантавирусам [1], но начиная с 2013 г. маркеры возбудителя ГЛПС ежегодно выявляются в полевом материале собранном на территории Ставропольского края, что свидетельствует о циркуляции хантавирусов.

Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом на территории СКФО не отмечается. При проведении эпизоотологического мониторинга антиген возбудителя клещевого вирусного энцефалита был обнаружен только в 2013 г. при исследовании проб суспензий клещей, собранных на территории Республики Дагестан и Ставропольского края [3]. В 2015 г. исследование полевого материала на наличие маркеров вируса клещевого энцефалита было проведено в Республике Северная Осетия-Алания, положительных результатов не было получено.

Таким образом, проблема природно-очаговых инфекций вирусной этиологии для СКФО имеет особую актуальность. Сохранение напряженной эпидемиологической обстановки по КГЛ, выявление случая заболевания человека бешенством и обнаружение маркеров возбудителей таких опасных вирусных инфекций, как ЛЗН и ГЛПС при исследовании полевого материала диктуют необходимость постоянного контроля профилактических и противоэпидемических мероприятий, а также ежегодного проведения эпизоотологического мониторинга на территории каждого субъекта региона.

Библиографический список

1. Варфоломеева Н.Г., Ермаков А.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым вирусным инфекциям на территории Ставропольского края. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – № 108. – С. 16–18.
2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2014 г. // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 1 (274). – С. 38–41.
3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2013 г. (Аналитическая справка). – Ставрополь, 2014. – 59 с.
4. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2014 г. (Аналитический обзор). – Ставрополь, 2015. – 76 с.
5. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г. (Аналитический обзор). – Ставрополь, 2016. – 96 с.
6. Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Таран Т.В. Особенности эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекционным болезням на Юге европейской части России в 2014 году // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 2 (275). – С. 28–31.

СЛЕПНИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЯ КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА

А.П. Савченко, Н.Л. Пичурина, М.В. Забашта., Л.В. Романова, И.В. Дворцова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,
Россия

Клещевые боррелиозы (КБ) – природно-очаговые трансмиссивные заболевания, вызываемые боррелиями группы *Borrelia burgdorferi s.l.* и передающиеся иксодовыми клещами. Это исторически сравнительно новая группа инфекционных болезней. КБ регистрируют на обширной территории Евразии, в том числе в лесной и лесостепной зонах России. Официальной регистрации органами здравоохранения случаев болезней, этиологически связанных с возбудителями КБ, на территории Ростовской области до 2012 г. не было в связи с отсутствием заболеваний. Тем не менее с 2009 г. отмечаются ежегодные выделения *B. burgdorferi s.l.* из полевого материала «1». Известно, что инфицирование людей происходит через укусы иксодовых клещей. В последнее время рядом авторов высказывается предположение о других путях и факторах передачи, посредством укусов двукрылых гематофагов, а также не трансмиссивным путем.

В результате лабораторного исследования проб слепней *Chrysops caecutiens*, отловленных на островах урочища Зеленков Сад (дельта Дона) была обнаружена ДНК *B. burgdorferi s.l.* геновид *B. afzelii*. Исследования проводились с использованием набора реагентов для выявления РНК/ДНК возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами TBEV, *Borellia burgdorferi sl*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi sl*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis/E. muris*-FL».

Остров урочища Зеленков Сад расположен в дельте Дона, и, несмотря на небольшую территорию, видовой состав фауны разнообразен. В урочище обитают 3 вида мелких грызунов, 6 видов крупных млекопитающих и 28 видов птиц. Иксодиды представлены двумя видами – *Dermacentor marginatus* и *Ixodes ricinus*. Высокая численность слепней *Chrysops caecutiens* в период спада активности иксодовых клещей (вторая половина августа – начало сентября) привлекла наше внимание и послужила причиной спонтанного сбора материала, не входящего в программу эпизоотологического исследования предусмотренного нормативными документами.

Основным резервуаром боррелий, как известно, являются млекопитающие и клещи, которые ещё выполняют роль и переносчиков возбудителя. Но слепни питаются на тех же видах животных, что и клещи, и занимают тот же ареал. Жизненный цикл слепней имеет много общего с жизненным циклом других кровососов. В пищевую цепь вовлекаются в первую очередь крупные животные: олени, лоси, косули и особенно домашний скот, мелкие животные – грызуны, птицы, что имеет огромное значение для распространения боррелий. Они часто нападают на людей, особенно во время купания, физической работы. Из-за болезненности укуса самка за одно кровососание редко получает необходимую для насыщения порцию крови, в результате она делает до пяти укусов, быстро перелетая от одного животного к другому.

Если учитывать, что слепни являются специфическими переносчиками инфекционных и инвазионных болезней: сибирской язвы, туляремии, некробактериоза северных оленей, трипаносомоза (Су-ару) лошадей и верблюдов, анаплазмоза, а также некоторых филяриозов, то вероятность того, что слепни могут быть механическими переносчиками боррелий, велика. Это предположение подтверждают наши данные. Необходимы исследования не только признанных резервуаров и переносчиков боррелий, но и потенциально вовлекаемых; так, имеются данные о связи заболеваемости КБ с факторами внеклещевого заражения [2].

Векторный компонент в трансмиссии возбудителя играет важнейшую роль, но необходимо учитывать, что стабильность природного очага в пространстве и времени поддерживается сложными механизмами взаимодействия его составляющих. Не исключается вовлечение нового механического переносчика – слепней *Chrysops caecutiens* – активного и многочисленного, который может выступать в роли дополнительного или резервного переносчика.

Библиографический список

1. Дворцова И.В., Романова Л.В., Пичурина Н.Л. и др. Иксодовые клещевые боррелиозы в Ростовской области: экологические, эпизоотологические и эпидемиологические проявления // Пест-менеджмент. – 2015. – № 4. – С. 5–10.
2. Мотеюнас Л.Ю. Случаи парентерального заражения боррелиозом Лайма // Журн. микробиол. – 1999. – № 6. – С. 115–117.
3. Балашов Ю.С. Роль кровососущих клещей и насекомых в природных очагах инфекций // Паразитология. – 1999. – Т. 33, № 3. – С. 210–222.

ОСОБО ОПАСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И ЗАДАЧИ СТАЦИОНАРА ООИ

Д.В. Селюнина

ФГБУЗ «Медико-санитарная часть №163 Федерального медико-биологического агентства»,
Кольцово Новосибирской обл., Россия

Периодическое обострение ситуации, потенциальная готовность к эпидемиологическому распространению после многолетнего благополучия – одно из основных свойств возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вернуться, в принципе, могут даже те инфекции, которые были ликвидированы на территории России (натуральная оспа, полиомиелит), так как ликвидация заболевания не означает ликвидации вируса. Уникальность корпуса заключается в том, что при оптимальной эксплуатации инженерных систем биобезопасности полностью исключается выход заразного материала за его пределы, а также инфицирование персонала, если персоналом не нарушаются правила биобезопасности.

Чтобы избежать распространения инфекции, таких инфекционных больных необходимо госпитализировать в современные специализированные инфекционные стационары, оборудованные вентилируемыми Мельцеровскими боксами.

Планировка корпуса выполнена с учётом соблюдения поточности при движении персонала и зо-

нальности помещений. В крыльях корпуса – мельцеровские боксы. Кроме того, в корпусе развёрнуты вирусологическая и клиничко-биохимическая лаборатории, прозекторская.

При транспортировке больных с ООИ в специализированные стационары необходимо использовать специализированный медицинский транспорт либо санитарную авиацию, оснащенную переносными изолирующими боксами.

Каждые два года стационар ООИ посещают эксперты ВОЗ и оценивают безопасность работ в нем.

Выводы: инфекции не сдают своих позиций и входят в число ведущих причин заболеваемости и смертности населения Земли.

В связи с этим необходимо:

1. Внедрение новейших разработок в лечение и профилактику инфекционных заболеваний, а также новейших технологий при строительстве новых лечебных учреждений.

2. Обеспечение постоянной готовности стационара и лабораторий для проведения лабораторной диагностики и оказания медицинской помощи больным с опасными инфекционными заболеваниями.

3. Организация обязательной иммунизации сотрудников стационара и регулярная подготовка кадров по вопросам биологической безопасности.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ КОММЕРЧЕСКИХ АНТИСЕПТИКОВ НА ГОСПИТАЛЬНЫЕ ШТАММЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

П.В. Слукин¹, О.Н. Ершова², Н.К. Фурсова¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk Московской обл.; ²Федеральное государственное автономное учреждение «Научно-исследовательский институт нейрохирургии имени Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, Москва, Россия

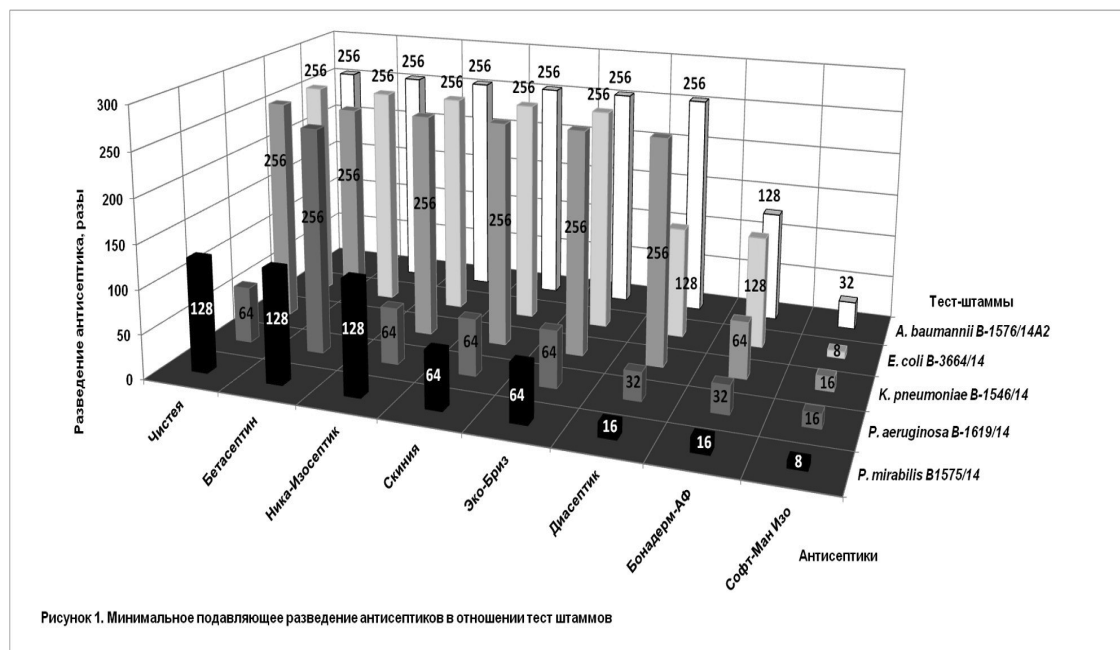
Одним из «краеугольных камней» современной медицины является использование антисептиков, которые широко применяются для обработки кожных покровов пациентов, а также рук медицинского персонала. Отмечаемый повсеместно рост устойчивости госпитальных патогенов к антибактериальным препаратам, а также появление на рынке новых коммерческих антисептиков вызывает необходимость оценки эффективности используемых антисептиков в отношении штаммов микроорганизмов, циркулирующих в конкретной госпитальной среде.

Целью данной работы является оценка эффективности шести спиртосодержащих и двух неспиртосодержащих коммерческих антисептиков на госпитальные штаммы грамотрицательных бактерий

Материалы и методы

В качестве тест-культур использовали госпитальные штаммы *Klebsiella pneumoniae* B-1546/14, *Escherichia coli* B-3664/14, *Proteus mirabilis* B1575/14, *Acinetobacter baumannii* B-1576/14A2 и *Pseudomonas aeruginosa* B-1619/14, выделенные из клинического материала (эндотрахеального аспирата, ликвора и мочи) пациентов нейрореанимации г. Москвы в 2014 г. Культивирование бактерий осуществляли на питательных средах Мюллер-Хинтон агар и Мюллер-Хинтон бульон (HiMedia, Индия). Чувствительность к антимикробным препаратам (бета-лактамам, аминогликозидам, хинолонам, тетрациклинам, сульфаниламидам, нитрофуранам, полимиксином) определяли на приборе Vitek-2 Compact (Biomérieux, Франция). Тестируемые спиртосодержащие антисептики: Чистей (МК Вита Пул, Россия), Софт-Ман Изо (Б. Браун Медикал А.Г., Швейцария), Ника-Изосептик (Геникс, Россия), Диасептик (Интерсэн-плюс, Россия), Скиния (Бозон, Россия), Эко-Бриз (Мир дезинфекции, Россия); неспиртосодержащие антисептики: Бонадерм-АФ (Новодез, Россия), Бетасептин (Медлэкспром, Россия). Бактерицидную эффективность антисептиков определяли, оценивая их минимальные подавляющие разведения (МПР). Эффективным разведением антисептика в отношении конкретного тест-штамма считали то, которое обеспечивало снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий до 0,01%

от инокулюма. Для этого клетки каждого тест-штамма культивировали в микропланшетах с рядами двукратных разведений антисептиков в питательной среде. Последняя лунка являлась контрольной и не содержала антисептик. Инокулят вносили в объеме 10 мкл до конечной концентрации в лунке 105 КОЕ/мл. Посевы культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °С, затем высевали по 10 мкл на чашки Петри с агаром для подсчета КОЕ.



Результаты

Показано, что все тест-штаммы, использованные в работе, характеризуются фенотипом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), поскольку одновременно устойчивы к антибактериальным препаратам трех и более функциональных классов. При этом отмечены различия в относительной эффективности изучаемых спиртосодержащих и неспиртосодержащих антисептиков в отношении конкретных штаммов. Штаммы *K. pneumoniae* B-1546/14 и *A. baumannii* B-1576/14A2 наиболее чувствительны к шести препаратам: Чистея, Ника-Изоцептик, Диасептик, Скиния, Эко-Бриз и Бетасептин. Штамм *P. aeruginosa* B-1619/14 наиболее чувствителен к одному препарату – Бетасептин. Штамм *E. coli* B-3664/14 – к пяти препаратам: Чистея, Ника-Изоцептик, Скиния, Эко-Бриз и Бетасептин. Штамм *P. mirabilis* B1575/14 – к трем препаратам Чистея, Ника-Изоцептик и Бетасептин (рис. 1). Тем не менее все изучаемые препараты антисептиков оценены как эффективные по отношению ко всем использованным тест-штаммам – они обеспечивали снижение количества КОЕ бактерий до 0,01% от инокулюма не только в виде цельного препарата (в соответствии с рекомендациями производителей), но и в разведениях до 1:8.

Выводы

Все изучаемые препараты антисептиков были эффективны против тест-штаммов клебсиелл, псевдомонад, эшерихий, протеев и ацинетобактеров и могут быть рекомендованы для использования в лечебных учреждениях, в том числе для снижения уровня контаминации биотических поверхностей от МЛУ патогенов. Относительно более эффективным препаратом оказался Бетасептин, который проявлял бактерицидное действие на все использованные тест-штаммы при разведении в 128 раз. Достаточно эффективными препаратами были Ника-Изоцептик, Скиния и Эко-Бриз, они сохраняли свою эффективность при разведении в 64 раза. Наименее эффективным против использованного набора тест-штаммов оказался антисептик Софт-Ман Изо, который сохранял свое бактерицидное действие при разведении до 8 раз.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СРОКИ ПЕРСИСТЕНЦИИ И СОСТОЯНИЕ СТХ- ГЕНА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ EL TOR РАЗЛИЧНОЙ ТОКСИГЕННОСТИ

С.В. Титова, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Л.К. Лысова, И.В. Архангельская, А.В. Миронова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Высокая устойчивость возбудителей во внешней среде ведет к характерной для настоящего времени эпидемической ситуации, когда вибрионы обнаруживаются в объектах окружающей среды даже при отсутствии больных. Места длительного существования авирулентных вибрионов El Tor можно рассматривать как благоприятные для накопления токсигенных холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями. [1, 4]. Анализ накопленных за период седьмой пандемии данных указывает также на значительный диапазон экологической толерантности водной популяции вибрионов El Tor в силу их адаптивной изменчивости к стрессорным факторам окружающей среды. Продолжительность персистенции зависит от многих факторов: температуры, pH, концентрации солей и углеводов, присутствия органических веществ (загрязненности мелких водоемов неочищенными сточными водами), степени бактериальной обсемененности [1 – 3, 5].

Целью исследования явилось изучение влияния пониженных температур на сроки персистенции и сохранность стх- гена холерных вибрионов El Tor.

Материалы и методы: в работе использовали 4 стх+ (P-5879, P-19613, P-19242 и P-19241) и 1 стх-штамм (P-19787) *V. cholerae* El Tor в исходной концентрации 104–106 микробных единиц/мл. В качестве среды культивирования использовали стерильную речную воду. В качестве контроля использовали дехлорированную стерильную водопроводную воду. Исследуемые штаммы инкубировали при температуре 5, 10 °С. Учет результатов проводили один раз в 2–4 дня. Наличие стх-гена определяли с помощью ПЦР со специфическим праймером стхАВ.

Результаты и обсуждения. Нами установлено, что при культивировании холерных вибрионов при 5°С на речной воде атоксигенный штамм перестал высеваться на 12, а в контроле на 10 сут культивирования, токсигенные штаммы на том же субстрате гибли на 15 сут, тогда как в контрольных пробах на водопроводной воде гибли на 2 сут инкубации. При 10°С на тех же субстратах сроки персистенции вибрионов значительно удлинялись по сравнению с 5°С инкубации. Все исследуемые штаммы, независимо от токсигенности, сохраняли жизнеспособность от 1 до 2 мес.

У токсигенных штаммов в контрольных пробах к четвертым суткам концентрация вибрионов снизилась до единичных клеток, у атоксигенного штамма в контрольной пробе вибрионы регистрировали в течение первого месяца. Отмечено размножение холерных вибрионов токсигенных и атоксигенных штаммов в речной воде после первой недели культивирования в новых условиях, возможно, это срок адаптации или переход на новый источник питания.

При увеличении исходной концентрации исследуемых штаммов на один – два порядка выживаемость холерных вибрионов в речной воде, независимо от токсигенности, продолжалась от 10–20 суток соответственно, в отличие от контрольной пробы, где холерные вибрионы не высевались уже с третьего дня. При исходной концентрации $n \times 10^6$ м.кл/мл стхА+тсрА+ и с стхА- тсрА- штаммы холерных вибрионов сохраняли жизнеспособность в течение месяца в речной и водопроводной воде. Надо отметить, что с первых суток наблюдалось снижение концентрации исследуемых штаммов холерных вибрионов на три порядка, и их концентрация оставалась такой же до конца эксперимента.

Для выявления изменений в структуре генома токсигенных штаммов холерных вибрионов под влиянием температуры и среды культивирования каждый высеv на агаровые пластины сопровождали постановкой ПЦР. Нами установлено, что токсигенные штаммы холерных вибрионов, независимо от среды и температуры культивирования, сохраняли в своем геноме стх-ген в течение всего срока наблюдения.

Таким образом, холерные вибрионы могут длительное время сохраняться и даже размножаться в условиях пониженной температуры (не менее 10°С) в эксперименте. Такая продолжительная пер-

систенция холерных вибрионов с сохранением stx-гена при низких температурах на минеральных субстратах может рассматриваться как возможность сохранения токсигенных штаммов холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями, что, в свою очередь, может создать угрозу использования водоемов для рекреационных целей в летний период и говорит о необходимости пристального внимания к мониторинговым исследованиям воды поверхностных водоемов.

Библиографический список

1. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры // Журн. микробиол. – 2006. – № 6. – С. 63–71.
2. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В. и др. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации // Журн. микробиол. – 2016. – № 1. – С. 89–101.
3. Сизова Ю.В., Черепихина И.Я., Бурлакова О.С. 2015 Роль температуры поверхностных водоемов в персистенции и биопленкообразовании холерных вибрионов различной эпидемиологической значимости // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – С. 12
4. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. – Пенза, 2002. – С. 232
5. Barua D. Принципы и практика борьбы с холерой. – М., 1971. – С. 27–30.

ТЕМАТИКА НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2016 ГОДУ В РАМКАХ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

С.В. Титова, И.А. Щипелева, Е.И. Марковская

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Россия*

Тематика всех противочумных институтов, выполняемая в рамках Проблемной комиссии 48.04. «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, в 2015 г. была скорректирована с целью повышения практической значимости, эффективности, комплексности и оптимизации сроков выполнения исследований. В результате проведенной работы было принято решение о межинститутской разработке 10 приоритетных направлений исследований по Проблеме «Холера». В комплексной разработке нижеперечисленных научных направлений принимают участие все противочумные институты и ряд других организаций.

С целью совершенствования эпидемиологического надзора за холерой осуществляется работа по научному обоснованию районирования административных территорий РФ по типам эпидемических проявлений холеры с определением соответствующей тактики надзора [5]. Запланирована переработка действующих СП по эпидемиологическому надзору за холерой на территории РФ.

Продолжается работа по научному обеспечению внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории РФ с целью предотвращения заноса возбудителя холеры и других патогенных для человека вибрионов. Планируется представить предложения к эпиднадзору за холерой в части, касающейся мониторинга воды поверхностных водоемов в акватории международных портов, и дополнения к СП «Профилактика холеры». Проводится эпидемиологическая оценка способов деконтаминации водяного балласта.

В ходе выполнения НИР, посвященных изучению экологии возбудителя холеры, предполагается определение возможного происхождения токсигенных культур, выяснение родственных связей между атоксигенными культурами, а также оценка роли природных популяций холерных вибрионов, циркулирующих в России, как резервуаров разных аллелей генов факторов патогенности и персистенции.

Получены сведения о характере взаимодействия и возможном конкурентном воздействии представителей аутохтонной вибриофлоры в отношении завозных токсигенных холерных вибрионов. Разработан способ оценки внутривидовой конкурентной активности вибрионов с помощью INDEL-маркеров [2]. Осуществляется работа по определению роли биопленки *Vibrio cholerae* в повышенной инфекциозности, в обеспечении персистенции холерных вибрионов во внешней среде, в противостоянии воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, дезинфектантов и антибиотиков [6]. Разработаны методы получения биопленок, отвечающие требованиям биологической безопасности при работе с возбудителями II группы патогенности [7].

В рамках совершенствования мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, продолжается сравнительное изучение свойств штаммов холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды, на разных территориях России. Осуществляется изучение стабильности отдельных генетических локусов разных групп штаммов *V. cholerae* в неблагоприятных условиях окружающей среды. Планируется дополнение системы мониторинга молекулярно-генетическим анализом основных генов патогенности, кодирующих биосинтез энтеротоксина Эль Тор или классического типов, с помощью разработанных ПЦР-тест-систем.

Осуществляется оптимизация алгоритма молекулярного типирования штаммов холерных вибрионов. Разработан новый комплексный метод VNTR-, INDEL-типирования штаммов [3].

Запланированы сравнительные испытания эффективности и диагностической ценности MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов в системе микробиологического мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды в сопоставлении с бактериологической генетической идентификацией изолируемых культур.

Осуществляется ретроспективный и оперативный анализ показателей высеваемости микроорганизмов рода *Vibrio* в стационарных точках отбора проб [1]. На основании данных ретроспективного анализа планируется разработка и внедрение алгоритма мониторинговых исследований вибриофлоры с учетом внутрисубъектовой дифференциации по степени риска сохранения и накопления в водных объектах микроорганизмов рода *Vibrio*.

В рамках Комплексного анализа механизмов изменения вирулентных, иммуногенных и адаптивных свойств природных штаммов возбудителя холеры разрабатываются молекулярно-генетические критерии оценки эпидемического и патогенетического потенциала возбудителей и вероятности их сохранения в объектах окружающей среды. Будет осуществлен анализ генетического разнообразия интегративных конъюгативных элементов штаммов *V. cholerae*, изолированных на территории РФ, оценка их роли в формировании комбинаций генов, расширяющих адаптационный потенциал микроорганизма. Создается электронная база данных нуклеотидных последовательностей ICE. Будут выработаны предложения по дополнению систем генодиагностики вирулентности у *V. cholerae* O1 серогруппы с учетом РНКомных данных.

Предполагается конструирование донорных штаммов, способных к переносу профага СТХф классического типа в типичные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, для последующего получения геновариантов, содержащих профаг СТХф классического типа.

Осуществляется полногеномное секвенирование токсигенных и потенциально-эпидемически опасных культур. Планируется разработка и государственная регистрация пакета программ для анализа полногеномных сиквенсов вибрионов.

Для анализа полногеномных сиквенсов разработана программа *SeqAnalyzer*. Программа и методические рекомендации по ее использованию находятся на официальном интернет-сайте Ростовского-на-Дону противочумного института ([http:// antiplague.ru/seqanalyzer/](http://antiplague.ru/seqanalyzer/)).

Будут сконструированы новые плазмиды, более эффективно экспрессирующие гены холерного токсина, гемолизина и нейраминидазы *V. cholerae* под контролем мощных промоторов, входящих в состав векторов нового поколения. Предполагается создание штаммов *Escherichia coli* – суперпродуцентов белков *V. cholerae*, необходимых для фундаментальных исследований и получения основ диагностических и вакцинных препаратов. В качестве продуцента В-субъединицы холерного токсина для изготовления иммунодиагностических препаратов, а также холерных химических вакцин может быть использован штамм, полученный на основе атоксигенного геноварианта *Vibrio cholerae* [8].

Получен диагностический холерный фаг для идентификации холерных вибрионов Эль Тор [4].

В рамках исследования, посвященного изучению механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиску высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности, с использованием ГИС-технологий будет создана пространственно-ориентированная база данных резистентности штаммов холерных вибрионов, выделенных на различных территориях РФ. Для преодоления антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* будут отобраны эффективные комбинации антибактериальных препаратов, а также комбинации антибиотиков с различными биологически активными веществами.

В направлении оптимизации специфической профилактики холеры предполагается изучение при экспериментальной холере возможности повышения иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бивалентной химической вакцины с помощью разных по происхождению иммуномодуляторов.

С целью оптимизации лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий разрабатывается целый ряд тест-систем для идентификации и дифференциации холерных вибрионов.

Библиографический список

1. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю. и др. Актуальные вопросы совершенствования мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов в системе эпидемиологического надзора за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. – С. 37–44.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П. и др. Разработка метода оценки внутривидовой конкуренции холерных вибрионов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. – С. 116–119.
3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. и др. Алгоритм анализа результатов полногеномного секвенирования на примере штаммов возбудителя холеры, выделенных на территории Российской Федерации // Молекулярная диагностика 2014. – Том 1. – С. 461–462.
4. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных для человека вибрионов // Клиническая диагностика. – 2015. – № 4. – С. 62–64.
5. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии: от общей тактики до дифференцированного объема мероприятий с учетом районирования страны по типам эпидемических проявлений холеры (Сообщение 1) // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 9. – С. 43–47.
6. Селянская Н.А., Титова С.В., Веркина Л.М. и др. Антибиотикорезистентность биопленок холерных вибрионов // Общие угрозы – совместные действия. Ответ гос-в БРИКС на вызовы опас. инф. болезней: Матер. международ. конф. – М., 2015. – С. 338 – 340.
7. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Использование нового метода изучения динамики образования биопленок холерными вибрионами в условиях, приближенных к естественным // Известия ВУЗ Сев.- Кав. Региона. – Естественные науки. – 2014. – № 5. – С. 73–77.
8. Щелканова Е.Ю., Кульшань Т.А., Заднова С.П. и др. Конструирование штамма-продуцента В-субъединицы холерного токсина на модели атоксигенного геноварианта *Vibrio cholerae* // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. – С. 144–146.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОСПРИИМЧИВОСТИ НАИВНЫХ CD8+ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ К CD95-ОПОСРЕДОВАННОМУ АПОПТОЗУ ПРИ МОНИТОРИНГЕ ОСТРОГО ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА У ДЕТЕЙ

Е.Н. Филатова¹, Е.В. Анисенкова¹, Н.Б. Преснякова¹, Т.Д. Сычева², Е.А. Кулова²,
О.В. Уткин^{1,2}

¹ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород;

² ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Нижний Новгород, Россия

Введение. Острый инфекционный мононуклеоз (ОИМ) – вирусное заболевание, наиболее часто проявляющееся в детском возрасте [1]. В период реактивации ОИМ у некоторых пациентов может наблюдаться снижение содержания общего пула CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом [2]. Поддержание достаточного количества зрелых Т-лимфоцитов в крови обеспечивается за счет пролиферации пула наивных Т-клеток [3].

Член белкового семейства «рецепторов смерти» – CD95 (Fas, APO-1) – экспрессируется на мембране CD8+ Т-лимфоцитов и участвует в регуляции Т-клеточного гомеостаза. Как правило, в норме наивные Т-клетки отвечают на стимуляцию данного рецептора усилением пролиферативной активности [4]. Ранее нами было показано, что развитие ОИМ у детей сопровождается снижением чувствительности наивных CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (нЦТЛ) к апоптозу, что может быть связано с активацией рецептора CD95 [5, 6].

Цель данной работы – изучение влияния активации рецептора CD95 на уровень апоптоза нЦТЛ у детей с ОИМ в острый период заболевания и после реконвалесценции.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились образцы периферической крови условно здоровых детей и детей с диагнозом ОИМ в период болезни и в период реконвалесценции. Выделение нЦТЛ проводили методом негативной магнитной иммуносепарации с помощью коммерческих наборов серии EasySep («Stemcell Technologies», Великобритания) согласно инструкции производителя. Специфическую активацию клеток проводили мышинными моноклональными антителами (МКА) против CD95 человека (изотип IgM, клон СН-11, «Beckman Coulter», США) в концентрации 200 нг/мл. Клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Живые и апоптотирующие клетки разделяли с помощью двойного окрашивания аннексином V-PE и 7-аминоактиномицином-D («BD Biosciences», США). Экспрессию CD95 на мембране лимфоцитов анализировали с помощью флуоресцентно меченных антител против CD95 (CD95-PE-Cy7, «eBioscience», США). Алгоритм статистического анализа был написан на языке R (версия 3.1.) в оболочке «RStudio 0.98.1098» [7, 8].

Результаты. В свежеизолированных нЦТЛ у детей с ОИМ процент живых клеток был повышен (ДИ=2,65–26,0%, $p=0,016$), а процент клеток в ранней и поздней стадии апоптоза понижен (ДИ=0,11–19,50%, $p=0,048$ и ДИ=2,41–11,28%, $p=0,046$ соответственно) по сравнению с условно здоровыми детьми. Количество живых нЦТЛ при ОИМ возрастало за счет увеличения содержания живых CD95+ клеток (ДИ=3,64–16,95%, $p=0,005$). Снижение процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза происходило за счет уменьшения процента раннеапоптотических CD95-клеток (ДИ=0,56–13,11%, $p=0,009$). При этом плотность экспрессии рецептора CD95 на поверхности клеток в ранней стадии апоптоза при заболевании повышалась (ДИ=31,63–622,29, $p=0,020$) по сравнению с группой сравнения.

После выздоровления исследуемые показатели свежеизолированных нЦТЛ детей не отличались от группы сравнения.

При культивировании нЦТЛ условно здоровых детей в контроле снижался процент живых и раннеапоптотических клеток (ДИ=3,90–26,64%, $p=0,022$ и ДИ=2,46–15,43%, $p=0,002$ соответственно) и увеличивался процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза (ДИ=6,83–38,87%, $p=0,001$) по сравнению со свежеизолированными клетками. При добавлении в культуру нЦТЛ анти-CD95 МКА наблюдали

аналогичные изменения: снижался процент живых и раннеапоптотических клеток (ДИ=0,27–30,83%, $p=0,045$ и ДИ=2,37–15,34%, $p=0,002$ соответственно) и возрастал процент нЦТЛ в поздней стадии апоптоза (ДИ=11,99–44,03%, $p<0,001$). Как в контроле, так и при активации CD95 снижение процента живых и раннеапоптотических нЦТЛ происходило за счет уменьшения процента CD95⁺ клеток (ДИ=3,42–20,28%, $p=0,002$ и ДИ=2,25–10,87%, $p<0,001$ соответственно в контроле и ДИ=1,31–18,70%, $p=0,012$ и ДИ=2,25–10,87%, $p<0,001$ соответственно при активации CD95).

У детей с ОИМ при культивировании нЦТЛ в контроле наблюдали снижение процента живых клеток (ДИ=4,22–34,34%, $p=0,027$) и возрастание процента нЦТЛ в поздней стадии апоптоза (ДИ=1,42–37,79%, $p=0,028$) по сравнению со свежеизолированными клетками. Снижение процента живых нЦТЛ происходило за счет уменьшения процента живых CD95⁺ клеток (ДИ=4,74–17,15%, $p<0,001$). У детей с ОИМ при добавлении анти-CD95 МКА процент живых и апоптотических нЦТЛ статистически значимо не изменялся по сравнению со свежеизолированными клетками. При этом снижался процент живых и раннеапоптотических CD95⁺ нЦТЛ (ДИ=10,49–22,89%, $p<0,001$ и ДИ=1,49–8,36%, $p=0,001$ соответственно), а также плотность экспрессии рецептора CD95 на их поверхности (ДИ=146,59–613,28, $p<0,001$ и ДИ=142,58–751,98, $p<0,001$ соответственно).

У детей после выздоровления при культивировании нЦТЛ как в контроле, так и при активации CD95 обнаружено снижение процента нЦТЛ в ранней стадии апоптоза (ДИ=4,57–18,47%, $p<0,001$ и ДИ=3,15–17,05%, $p<0,001$ соответственно) и возрастание процента клеток в поздней стадии апоптоза (ДИ=5,17–25,62%, $p<0,001$ и ДИ=4,83–25,29%, $p<0,001$ соответственно) по сравнению со свежеизолированными клетками. Добавление анти-CD95 МКА приводило к снижению плотности экспрессии рецептора CD95 на поверхности живых клеток (ДИ=20,67–198,63, $p=0,009$), тогда как в контроле данный показатель не изменялся. Среди раннеапоптотических нЦТЛ по сравнению со свежеизолированными клетками в контроле понижался процент как CD95[–], так и CD95⁺ клеток (ДИ=0,64–8,47%, $p=0,014$ и ДИ=3,65–10,30%, $p<0,001$). При активации CD95 снижался только процент раннеапоптотических CD95⁺ клеток (ДИ=3,57–10,22%, $p<0,001$).

Обсуждение. Нами обнаружено, что у условно здоровых детей при апоптозе нЦТЛ погибают преимущественно CD95⁺ клетки, в то время как CD95[–] клетки устойчивы к индукции апоптоза. Так же выявлено, что CD95 не является индуктором апоптоза изолированных нЦТЛ условно здоровых детей.

Развитие ОИМ сопровождалось снижением процента апоптотирующих нЦТЛ в крови и возрастанием процента живых CD95⁺ клеток. При этом живые CD95⁺ нЦТЛ сохраняли свою чувствительность к индукции спонтанного апоптоза в культуре. Активация рецептора CD95 на их поверхности приводила к снижению плотности его экспрессии и ингибированию апоптоза. Таким образом, регуляция плотности экспрессии рецептора CD95 на поверхности нЦТЛ может являться защитным механизмом ухода клеток от апоптоза при ОИМ.

Согласно нашим данным, снижение чувствительности CD95⁺ нЦТЛ к апоптозу при ОИМ наблюдается в период острой фазы заболевания и нивелируется при реконвалесценции. При этом активация рецептора CD95 сопровождается снижением плотности его экспрессии на поверхности клеток, но не оказывает влияния на восприимчивость нЦТЛ к апоптозу.

Библиографический список

1. Эпидемиологический атлас ПФО [Электронный ресурс]. URL: <http://epid-atlas.nniiem.ru> (дата обращения 08.05.2016).
2. Xing Y., Song H.M., Wei M. et al. Clinical significance of variations in levels of Epstein-Barr Virus (EBV) antigen and adaptive immune response during chronic active EBV infection in children // J. Immunotoxicol. – 2013. – Vol. 10, N 4 – P. 387–392.
3. Kimura M.Y., Pobezinsky L.A., Guinter T. et al. IL-7 signaling must be intermittent, not continuous, during CD8 T cell homeostasis to promote cell survival instead of cell death // Nat. Immunol. – 2013. – Vol. 14, N 2 – P. 143–151.
4. Alderson M.R., Armitage R.J., Maraskovsky E. et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes // J. Exp. Med. – 1993. – Vol. 178, N 6 – P. 2231–2235.
5. Филатова Е.Н., Уткин О.В., Анисенкова Е.В. и др. Оценка уровня апоптоза наивных CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с острым инфекционным мононуклеозом при активации рецепторов CD95 и DR3 // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 3 – С. 109–118.
6. Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Сычева Т.Д. и др. Роль рецепторов CD95 и DR3 в апоптозе наивных

CD8⁺ Т-лимфоцитов у детей с острым инфекционным мононуклеозом // Медицинская иммунология – 2015. – Т. 17, № 3 – С. 102–103.

7. R: A language and environment for statistical computing / R Development Core Team. – Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009. – 409 p.

8. RStudio: Integrated Development for R / RStudio Team. – Boston, MA: RStudio, Inc., 2015.

РАЗДЕЛ 2.

НОВЫЕ И ВНОВЬ ВОЗНИКАЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ

О РАСШИРЕНИИ АРЕАЛА *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse, 1895 НА ЧЕРНОМОРСКОМ ПОБЕРЕЖЬЕ РОССИИ

М.В. Забашта

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,
Россия

Aedes albopictus – кровососущий комар (Diptera: Culicidae), вид рода *Aedes*¹, или азиатский тигровый комар – переносчик возбудителей желтой лихорадки, лихорадок денге, Зика, Чикунгунья, Западного Нила и других. За последние три десятилетия вид проник в Европу, Африку, на Ближний Восток, Северную, Южную Америку и Карибский бассейн из первоначального ареала в западной части Тихого океана и Юго-Восточной Азии, в основном за счет завоза личинок и яиц морским транспортом [5-7, 9-13].

Впервые на юге России вид *A. albopictus* был обнаружен при энтомологическом мониторинге кровососущих комаров в районе Большого Сочи в п. Хоста в июле 2011 г. [3]. В том же году на северо-западе Турции и на границе с Грецией с помощью ловушек-контейнеров были собраны яйца кровососущих комаров, из которых в последующем были выведены имаго *A. albopictus*, вида, ранее здесь не отмеченного [12]. Можно высказать предположение, что появление вида на Черноморском побережье Кавказа связано с завозом преимагинальных стадий *A. albopictus* в результате регулярных морских грузоперевозок из Турции в Россию, в частности в Краснодарский край.

При дальнейшем обследовании в сентябре–октябре 2012 г. территории Черноморского побережья России и Абхазии от Анапы до Нового Афона найдены личинки и имаго *A. albopictus* в Адлерском, Хостинском, Лазаревском, Туапсинском районах Краснодарского края и в г. Пицунда, Абхазия. В районе городов Анапы, Новороссийска и Геленджика, а также на территории Крыма этот вид не был отмечен. Наиболее северное место обнаружения *A. albopictus* было в п. Джубга Краснодарского края [1].

Для оценки риска и прогнозирования распространения *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linneus, 1762 и *A. albopictus* Л.А. Ганушкиной с соавт. (2014) проанализированы данные климатических условий территории Черноморского побережья Кавказа и Крыма. При этом авторы допускают появление указанных

¹В настоящей публикации автор использует классификацию Эдвардса [8] и Вилкерсона с соавт. [14], согласно которой таксон *Stegomyia* Theobald, 1901 рассматривается в качестве подрода рода *Aedes* Meigen, 1818

видов в г. Геленджике и укоренение их в г. Ялте.

26 августа 2015 г. в частном секторе центральной части Геленджика (в 1 км от побережья) в жилом помещении были пойманы две активно нападающие самки *A. albopictus*. Отлов проводился при учете кровососущих комаров ловушкой Кришталя на себе. При обследовании других жилых и подсобных помещений, прилегающих к месту обнаружения, комаров данного вида выявить не удалось.

Определение наколотых экземпляров проведено по определительным таблицам [4, 5] и подтверждено к.б.н. Халиным А.В., научным сотрудником лаборатории паразитологии Зоологического института РАН. Отловленные экземпляры *A. albopictus* переданы в фонд коллекций Зоологического института.

Обнаружение *A. albopictus* в г. Геленджике свидетельствует о продолжающемся его распространении по Черноморскому побережью Кавказа и возможной угрозе возникновения «местных» случаев заболевания желтой лихорадки, денге, Зика и других при дальнейшем потеплении климата, наличии благоприятных природных условий и больных тропическими лихорадками, прибывших из стран Африки, Азии и Латинской Америки. Необходимо проведение энтомологических обследований территорий риска заселения и обитания видов *A. aegypti* и *A. albopictus* на юге России, направленных на выявление новых местообитаний, изучение экологических особенностей, численности с целью оптимизации эпидемиологического надзора и совершенствования санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

Автор благодарит к.б.н. А.В. Халина (ЗИН РАН, Санкт-Петербург) за ценные консультации и оказанную помощь в определении материала.

Библиографический список

1. Ганушкина Л.А., Безжонова О.В., Патраман И.В. и др. Распространение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на Черноморском побережье Кавказа // Мед. паразитол. и паразитар. бол. – 2013. – №. 1. – С. 45–46.
2. Ганушкина Л.А., Морозова Л.Ф., Патраман И.В., Сергиев В.П. Оценка риска расширения ареала комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на территории России // Мед. паразитол. и паразитар. бол. – 2014. – №. 4. – С. 8–10.
3. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на территории Российской Федерации // Мед. паразитол. и паразитар. бол. – 2012. – №. 1. – С. 3–4.
4. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары (Семейство Culicidae) // Фауна СССР. Насекомые двукрылые. – Л., 1970. – Т. 3, вып. 4. – 384 с.
5. Becker N., Petric D., Zgomba M. et al. Mosquitoes and their control. – Heidelberg, 2010. – 577 p.
6. Benedict M., Levine R., Hawley W., Lounibos L. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus* // Vector-Borne Zoonotic Dis. – 2007. – Vol. 7, N 1. – P. 76–85.
7. Caminade C., Medlock J.M., Ducheyne E., McIntyre K.M., Leach S., Baylis M., Morse A.P. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios // J. R. Soc. Interface. – 2012. – Vol. 9. – P. 2708–2717.
8. Edwards F.W. Diptera, fam. Culicidae. – Brussels: Desmet-Verteneuil, 1932. – 258 p. (Genera Insectorum, Fascicle. 194).
9. Gratz N.G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus* // Med. Vet. Entomol. – 2004. – Vol. 18, N 3. – P. 215–227.
10. Huang Y.-M. Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia. XIV. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in Southeast Asia. I – The scutellaris group of species // Contributions of the American Entomological Institute – 1972. – Vol. 9, N 1. – P. 1–109.
11. Knudsen A., Romi T., Majori C. Occurrence and spread in Italy of *Aedes albopictus* with implications for its introduction into other parts of Europe // J. Am. Mosq. Control. Assoc. – 1996. – Vol. 12, N 2. – P. 177–183.
12. Oter K., Gunay F., Tuzer E. et al. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding // Vector-Borne Zoonotic Dis. – 2013. – Vol. 13, N 10. – P. 753–761.
13. Sprenger D., Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas // J. Am. Mosq. Control. Assoc. – 1986. – N 2. – P. 217–219.
14. Wilkerson R.C., Linton Y.-M., Fonseca D.M. et al. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships (Diptera: Culicidae) // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 7. – e 0133602.

ВЕКТОРНЫЙ КОМПОНЕНТ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ОСТРОВАХ ДЕЛЬТЫ ДОНА

М.В. Забашта, Н.Л. Пичурина, А.П. Савченко, Л.В. Романова, А.В. Забашта

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,
Россия

Кровососущие членистоногие являются одним из основных компонентов природных очагов опасных инфекций, обеспечивая трансмиссию возбудителей бактериальной и вирусной природы и сохранение их в межэпизоотический период.

Эпизоотологический мониторинг проведен в 2015 г. с марта по декабрь и в феврале-апреле 2016 г. в пойменных лесах и редколесьях, заливных лугах, тростниковых зарослях островов, располагающиеся в приморской части дельты Дона: в урочищах Зеленков Сад, Борисов Сад (Азовский район) и в гнездовых колониях большого баклана, цапель, хохотуни в районе гирла Средняя Кутерьма на о-вах Большой и Малый Дворян (Неклиновский район). В период сильных ветров западных и юго-западных направлений понижения островов дельты подвергаются затоплению водой, в результате образуется большое количество временных водоемов, служащих местами массового выплода кровососущих комаров – основного компонента гнуса.

Имаго комаров учитывали ловушкой Кришталя «на себе» в течение 20 мин. Преимагинальные стадии комаров отлавливали из различных временных водоемов. Личинки и куколки кровососущих комаров для определения видовой принадлежности дорасщипывали до имаго. Правильность определения видового состава кровососущих комаров была подтверждена к. б.н. Халиным А. В., Зоологический институт РАН (г. Санкт-Петербург). Сбор иксодовых клещей проводили на флаг. Определение кровососущих членистоногих проводили в соответствии с определительными таблицами (Гуцевич и др., 1970., Олсуфьев, 1977; Филиппова, 1977, 1997). Лабораторные исследования кровососущих членистоногих проводили методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Иксодовые клещи. В результате эпизоотологического обследования островов дельты Дона было установлено обитание 2 видов клещей *Dermacentor marginatus* (Sulz.) и *Ixodes ricinus* (L.) в ур. Зеленков Сад и Борисов Сад. Ранее последний вид в дельте Дона не обнаруживали. Нами отловлены единичные экземпляры *I. ricinus* в травостое на опушке леса в ур. Зеленков Сад. На островную часть дельты *I. ricinus* мог быть занесен с такими видами птиц, как черный дрозд *Turdus merula* L., певчий дрозд *Turdus philomelos* C. L. Brehm, лесной конек *Anthus trivialis* L. и сойка *Garrulus glandarius* L. При осмотре птиц, отловленных в окрестностях Ростова-на-Дону в период пролета, с указанных видов были собраны нимфы и имаго *I. ricinus*.

Появление первых экземпляров *D. marginatus* отмечено в феврале, что, вероятно, связано с мягкой, теплой зимой и с высокими для этого месяца температурами воздуха. Максимальной численности достигает в марте – 144 экз. и апреле 108 экз. на флаго-км. В мае происходит уменьшение численности – 64 экз. на флаго-км, затем – спад численности, единичные экземпляры встречаются ежемесячно до декабря. Несмотря на постоянные затопления островов при нагонных явлениях, вид не погибает в теплое время года и успешно перезимовывает. Основные места сбора клещей приурочены к тропам и лежкам пятнистых оленей *Cervus nippon* Temm., изначально завезенных в ур. Зеленков Сад. В настоящее время олени свободно перемещаются по островной части дельты и разносят клещей с острова на остров. Разносу клещей также способствуют пасущиеся на островах табуны лошадей и небольшие стада крупного рогатого скота. Кроме того, существенную роль в этом процессе играют и обитающие на островах лисы *Vulpes vulpes* L. Они неоднократно наблюдались в ур. Зеленков Сад, а на прирусловых буграх в ур. Борисов Сад и на колонии больших бакланов возле гирла Средняя Кутерьма были обнаружены жилые выводковые норы.

При лабораторном исследовании *D. marginatus* молекулярно-генетическим методом были получены две положительные пробы на туляремию.

Кровососущие комары. Установлено обитание 12 видов р. *Anopheles* (*A. hyrcanus* Pall.), р. *Coquillettidia* (*C. richiardii* Fic.), р. *Aedes*² (*A. caspius* Pall., *A. dorsalis*, *A. cantans* Mg., *A. riparius* D.K., *A. excrucians* Walk., *A. annulipes* Mg., *A. flavescens* Mull., *A. cataphylla* Dyar., *A. sticticus* Mg., *A. vexans* Mg., *A. cinereus* Mg.), р. *Culex* (*C. modestus* Fic.). При анализе материалов публикаций установлено, что *A. sticticus* и *A. riparius* в Ростовской области отловлены впервые. Кроме дельты Дона эти виды встречались в пойменных и плакорных искусственных лесах на юго-западе области.

Появление первых имаго выявлено в конце апреля – мая, лет комаров продолжался до октября. Массовыми в луговых и тростниковых биотопах являются *A. cinereus*, *A. vexans*; многочисленными в пойменных лесах – *A. vexans* и представители группы «*cantans*» *A. cantans*, *A. annulipes*. Ранее в дельте Дона *A. annulipes* не обнаруживали. На островах дельты Дона в результате весеннего подтопления и образования большого числа водоемов, подходящих для развития личинок, в начале мая произошел дружный, массовый вылет и, как следствие, быстрый рост численности *A. cinereus*. Основным местом выплода послужили водоемы с невысоким травостоем на заливаемом лугу, на опушке леса в ур. Зеленков Сад и открытые прогреваемые водоемы, образовавшиеся на месте выжженного осенью тростника и окруженные прирусловыми валами острова с гнездовой колонией больших бакланов. Численность личинок в таких водоемах доходила до 300–350 экз. на 1 кв. м. При учетах имаго максимальная численность *A. cinereus* установлена в июне в гнездовой колонии (626 экз. за 20 мин. учета), в тростнике (542 экз.), на лугу (516 экз.) и на опушке леса (428 экз.). Для *A. vexans* установлены рост численности в первой половине июня (80–110 экз.) и повторный пик численности во второй половине июля с максимумом на лугу (330 экз.) и в пойменном лесу (403 экз.) ур. Зеленков Сад. Всплеск численности связан с образованием временных водоемов, в результате нагона воды умеренным ветром 6–8 м/с юго-западного направления в начале июля 2015 г., вызвавшим подтопление практически всех островов. Через несколько дней в небольших понижениях в белотопольном лесу, в луговых и тростниковых биотопах ур. Зеленков Сад в оставшихся водоемах, уже успевших уменьшиться в размерах в результате высоких дневных температур (30–32 °С), было обнаружено большое число личинок II–III возраста. Численность личинок в маленьких лужицах размером около 100 кв. см могла достигать до 100–150 экз. Из собранных здесь личинок были выведены имаго самок и самцов *A. vexans*.

Общая численность комаров группы «*cantans*» достигла максимума в июне, в ясеневом и белотопольном лесах ур. Зеленков сад – 118,0 экз. и 192,0 экз. соответственно. Личинки *A. cantans* и *A. annulipes* совместно *A. cataphylla*, *A. vexans* были отловлены во временных водоемах среди тростника, в травостое, в белотопольном и ясеневом лесу. Численность остальных видов кровососущих комаров была невысокой 0,5–24,3 экз., некоторые виды встречены единично.

Следует отметить, что приведенные количественные значения массовых видов оценивают интенсивность нападения комаров на человека, но не являются абсолютными и не могут отразить реальную численность кровососущих комаров, которая визуальна в данных станциях была выше.

При исследовании проб кровососущих комаров в ИФА выявлены маркеры вируса Западного Нила (ЗН) в трех пробах *A. cinereus*, отловленных в гнездовой колонии больших бакланов, в пробе от которых также был обнаружен антиген вируса ЗН. Антиген вируса Синдбис выявлен в пробе *A. excrucians*. При исследовании методом ПЦР получены положительные результаты на иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) в пробе *A. vexans* и на моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) в пробе *A. cinereus*.

Слепни.

Слепни тесно связаны с пойменными влажными биотопами. Наличие большого числа разнообразных водоемов в дельте способствует благоприятному развитию личинок и обеспечивает влажность, необходимую для взрослых особей.

Нами отловлено два вида слепней *Chrysops relictus* Mg. и *Tabanus bromius* L., последний вид редок, собраны единичные экземпляры. Первые особи *C. relictus* отмечены в начале июля в ур. Зеленков Сад и на гнездовой колонии больших бакланов. Пика численность достигает в конце августа–начале сентября. При визуальной оценке вокруг человека летало 45–50 активно нападающих особей. Лёт *C. relictus*

² В настоящей публикации авторы используют классификацию Эдвардса (1932) и Вилкерсона с соавт. (2015), согласно которой таксон *Stegomyia Theobald*, 1901 рассматривается в качестве подрода рода *Aedes* Meigen, 1818.

длился до конца сентября, после чего численность заметно снизилась. Основными прокормителями слепней здесь являются крупные млекопитающие и, возможно, колониальные виды птиц.

При исследовании слепней на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций получены положительные результаты: серологическим методом в пробе *T. bromius* получен антиген вируса клещевого энцефалита (КЭ), а методом ПЦР в трех пробах *C. relictus* выявлена ДНК *Borrelia burgdorferi* и в одной пробе – ДНК возбудителя туляремии. Данные результаты лабораторных исследований могут свидетельствовать об участии слепней в циркуляции указанных инфекционных агентов. При этом слепни и кровососущие комары могут служить механическими переносчиками возбудителей ИКБ, МЭЧ и туляремии.

Таким образом, в результате проведенных эпизоотологических и лабораторных исследований установлена современная фауна кровососущих членистоногих, получены данные о сезонной динамике численности, экологических особенностях и биотопической приуроченности, а также об их участии в циркуляции возбудителей вирусной и бактериальной природы в природных очагах трансмиссивных инфекций в дельте Дона – ЛЗН, Синдбис, КЭ, ИКБ, МЭЧ и туляремии.

Библиографический список

1. Гудевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары (Семейство Culicidae) // Фауна СССР. Насекомые двукрылые. – Л., 1970. – Т. 3, вып. 4. – 384 с.
2. Олсуфьев Н.Г. Слепни. Семейство Tabanidae // Фауна СССР. Насекомые двукрылые. – Л., 1977. – Т. 7, вып. 2. – 435 с.
3. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae* // Фауна СССР. Паукообразные. – Л., 1977. – Т. IV, Вып. 4. – 481 с.
4. Филиппова, Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Amblyomminae* // Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. – СПб, 1997. – Т. IV, Вып. 5. – 436 с.
5. Edwards F.W. Diptera, fam. Culicidae. – Brussels: Desmet-Verteneuil, 1932. – 258 p. (Genera Insectorum, Fascicle 194).
6. Wilkerson R.C., Linton Y.-M., Fonseca D.M. et al. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships (Diptera: Culicidae) // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 7. – e 0133602.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ПОЯВЛЕНИЯ НОВЫХ МИКОЗОВ

Т.В. Теплякова

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

За последние 3–4 десятилетия в медицине большую актуальность приобрели грибы, способные вызывать различные заболевания человека. Смертность от микозов в США к 2000 г. по сравнению с 1979 г. возросла на 200% [1]. Среди опасных микозов хорошо известны гистоплазмоз, бластомироз, кокцидиоидомикоз, паракокцидиоидомикоз, эндемические очаги которых находятся, в основном, на американском континенте. Ежегодно в мире регистрируется более 500 тыс. этих микозов [2].

В России также растет число заболеваний, причинами которых являются разные виды микроскопических грибов, ранее не считавшихся патогенными. Группа несовершенных грибов (*Fungi imperfecti*, *Deuteromycetes*) включает в себя большинство возбудителей микозов человека. Среди них наиболее широко распространены представители родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* [3]. Многие из них поражают людей с ослабленным иммунитетом, вызывая заболевания кожи, глаз, легких, суставов. С каждым годом увеличивается список потенциальных возбудителей микозов.

Одним из опасных микозов, появившимся еще в СССР, является заминеллез. Впервые об этой загадочной болезни я узнала лично от д. м. н., профессора из Узбекистана Назимы Абдуллаевны Дехкан-Ходжаевой во время нашей встречи в Москве в 1973 г. Ее интерес вызвала моя статья по полиморфизму

спороношения хищных грибов, в которой она увидела круглые грибные образования, похожие на те, которые, по ее словам, она находила в легочной ткани детей, умерших в Узбекистане от неизвестной болезни. Более детальными исследованиями было установлено, что в нашем случае был не полиморфизм спороношения, а смешанные культуры, в которых нематофаговые грибы содержали в своем мицелии грибы-микофилы. Они часто проявлялись в культурах при выделении нематофаговых грибов из почвы. Это были разные виды, в том числе из списка потенциальных патогенов, приведенного выше. Многие виды микофилов относились к энтомопатогенным грибам из родов *Cephalosporium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*. В природе они могут существовать за счет мицелия и конидий грибов, содержащих в клеточной стенке хитин [4].

Позднее стало известно, что идентификация культур гриба, выделенного из крови больных – жителей Узбекистана, с использованием молекулярно-биологических исследований позволила отнести его к новой разновидности гриба *Paecilomyces variotii* Bainier (1907), которая была обозначена как *Paecilomyces variotii* Bainier var. *Zaaminella* Dechkan (1974), по наименованию города Заамин в Узбекистане, из крови жителей которого он впервые был выявлен в 1974 г. Зааминеллез – глубокий микоз с поражением крови, кроветворных органов, органов дыхания, кожи, мочеполовой системы, аллергическими проявлениями разного характера и т.д., в основе которых лежит поражение иммунитета человека [5].

Вид *Paecilomyces variotii*, впоследствии оказавшийся причиной болезни, был давно известен по литературе как несовершенный гриб, который можно найти повсеместно в почве, чаще на насекомых в подстилке. Он относится к энтомофильным, так как связан с насекомыми, как субстратом [6].

Анализ литературных данных свидетельствует о возможности появления новых штаммов и даже видов микромицетов с патогенными свойствами под влиянием мутагенных факторов окружающей среды. У грибов, не имеющих полового размножения, эволюция основана на появлении мутаций. Открытие индуцированного мутагенеза у грибов под действием радиации и химических веществ сделало грибы, как эукариотные организмы, важным объектом генетических исследований [7]. В изменяющейся экологической обстановке усилить микроэволюционные процессы может также радиационный фактор [8].

Из 440 пестицидов, проверенных на мутагенный, канцерогенный, тератогенный и эмбриотоксический эффекты, 73,9% имели положительный эффект в одной или нескольких тест-системах [9]. Факты свидетельствуют, что под влиянием не только сильных ядов и радиации могут возникать штаммы с повышенной токсичностью для растений, животных и человека. Установлено, что под влиянием многолетних культур лекарственных растений, продуцирующих в почву через корневые выделения различные метаболиты (гликозиды, фитоэстрогены, флавоноиды и др.), снижалось разнообразие комплекса почвенных грибов. Среди доминирующих в почве оставались представители токсигенных видов из родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, которые представляют опасность для растений, животных и человека [10, 11].

Любое изменение в популяции микроорганизмов обязательно отразится на его экологической стратегии, человек при этом может не предполагать, к каким последствиям может это привести. Например, с переходом легионелл из природы в новые местообитания (душевые установки) произошло внедрение патогена в организм человека [12].

70-е годы 20 века считались в сельском хозяйстве СССР эрой комплексной химизации, когда началось массированное применение на разных культурах минеральных удобрений, пестицидов, регуляторов роста. Известно, что раньше при разработке многих химических средств защиты растений использовали соединения, относящиеся к группе боевых отравляющих веществ времен первой мировой войны. Они обладали токсичностью не только для вредных организмов, но и человека, животных и окружающей среды [13].

«Родиной» зааминеллеза мог стать именно Узбекистан с важной технической и стратегической культурой хлопчатника. По масштабам использования ядохимикатов Узбекистан занимал одно из первых мест в Советском Союзе: в течение многих лет до 50–54 кг и более ядохимикатов (средств защиты растений, дефолиантов) вносилось на гектар посевов хлопчатника (их использование превышало общесоюзный уровень в 15–20 раз). До развала СССР Республика Узбекистан по заболеваемости занимала первое место в стране. Детская смертность превышала 32%. Особую тревогу до сих пор вызывают

локальные загрязнения почв, особенно вблизи бывших сельскохозяйственных аэродромов и складов хранения ядохимикатов. Экологическая ситуация в Узбекистане, особенно в сельскохозяйственных районах, продолжает оставаться сложной [14].

Патогенный вид, вызывающий заминеллез, мог возникнуть под влиянием постоянного действия применяемых на культуре хлопчатника ядохимикатов. Важно отметить, что *Raecilomyces variotii* имеет относительно мелкие одноклеточные конидии 4–5×2–3 мкм с одним ядром, что повышает вероятность воздействия химических соединений на геном гриба.

Патоген мог распространиться и за пределы Узбекистана в аэрозолях, включающих пыль с хлопковых полей. Возможно, под влиянием одних и тех же мутагенных факторов патогенные штаммы *Raecilomyces variotii* могли появиться и в других местах земного шара, так как этот вид известен повсеместно, а экологические условия на планете пока только ухудшаются.

Библиографический список

1. Диагностика и лечение микозов / под ред. Д.Р. Хоспентала, М.Дж. Риналди; пер. с англ. Ю.В. Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 448 с.
2. Особо опасные микозы / под ред. В.В. Малеева. – Волгоград: Волга-Паблицер, 2013. – 193 с.
3. Daves H. Larone. Medically important fungi. A guide to identification. American Society for Microbiology, 5-th edition. – Washington DC: ASM Press, 2011. – 485 p.
4. Теплякова Т.В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов. – Новосибирск, 1999. – 252 с.
5. <http://www.zaaminella.com/index.html>.
6. Коваль Э.З. Определитель энтомофильных грибов СССР. – Киев: Наукова думка, 1974. – 260 с.
7. Мутационный процесс у грибов / И.А. Захаров, С.В. Ковальцова, Т.Н. Кожина, И.В. Федорова, Б.Ф. Яровой. – Л.: Наука, 1980. – 287 с.
8. Андросов Г.К., Симонов В.Ю. Распространение патогенных грибов в агробиоценозах различной степени радионуклидного загрязнения в Брянской области // Сельскохозяйственная биология. – 2010. – № 5. – С. 118–122.
9. Мажарова И.В. Отдаленные последствия пестицидов и комплексный подход к их изучению в природной среде // Сб. научн. трудов ВНИИ природа. – М.: 1986. – С. 17–24.
10. Кувшинова Н.М., Свистова И.Д., Назаренко Н.Н. Накопление опасных для человека микромицетов в почве под лекарственными растениями // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии, 2014. – Т. 12. – С. 117–120.
11. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты). – М.: Медицина, 1985. – 320 с.
12. Кожевин П.А. Микробные популяции в природе. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 175 с.
13. Яблоков А.В. Ядовитая приправа. – М.: Мысль, 1990. – 125 с.
14. Алибеков Л.А., Алибекова С.Л. Социально-экономические последствия процесса опустынивания Центральной Азии // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77. – № 5. – С. 420–425.

МИКРОМИЦЕТЫ В АЭРОЗОЛЯХ ВОЗДУХА ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Т.В. Теплякова¹, И.Г. Воробьева^{1,2}, И.С. Андреева¹, А.С. Сафатов¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия

В настоящее время уровень антропогенного воздействия на окружающую среду способствует накоплению микроорганизмов, в частности, микроскопических грибов, способных вызывать заболевания человека. По воздействию на организм их условно можно разделить на две группы: потенциально патогенные и оппортунистические. И те и другие могут длительно сохраняться и развиваться во внешней среде. Отличие состоит в том, что оппортунистические грибы, как правило, не вызывают заболевания здоровых

организмов, но могут стать причиной болезни людей с ослабленным иммунитетом. По данным специалистов во всём мире отмечается рост числа заболеваний человека, вызванных именно оппортунистическими инфекциями. Из 80 000 видов известных на сегодняшний день грибов по разным оценкам до 800 видов представляют опасность для человека [1]. Одни виды становятся причиной аллергических заболеваний, другие приводят к серьёзным инфекционным микозам и микотоксикозам. Все большее распространение получают дрожжевые грибы рода *Candida* [2], которые способны вызывать широкий диапазон инфекций и поражать практически любой орган, нередко создавая при этом угрозу для жизни больных. Отмечаемый во всем мире рост заболеваемости связан, в первую очередь, с тем, что более половины населения Земли является носителем грибов этого рода. Только на коже грибы рода *Candida* присутствуют у 30–50% населения [3]. Данная инфекция прежде всего поражает людей, организм которых ослаблен воздействием различных неблагоприятных факторов, широким использованием химических средств в быту и на производстве, применением различных медикаментозных средств, особенно антибиотиков и иммунодепрессантов. Рост числа инвазивных методов лечения и обследования с длительным пребыванием различных инородных предметов в кровяном русле привело к тому, что за прошедшие два десятилетия грибы рода *Candida* стали одним из основных оппортунистических микроорганизмов, вызывающих внутрибольничные инфекции. Фактически грибы *Candida* находятся на четвертом месте по частоте среди выделяемых из крови микроорганизмов и на первом по смертности от внутрибольничных септических состояний в США [4].

Среди фитопатогенных грибов могут вызывать заболевания человека представители родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Stemphylium*. Для многих видов микромицетов характерна способность продуцировать микотоксины, например, для грибов родов *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и некоторых других.

Во всем мире списки видов потенциально патогенных грибов и оценка их опасности постоянно уточняются. Ученые предлагают выделить три группы уровней безопасности микроскопических грибов (biosafety levels – BSL) [1]:

- BSL1 – многочисленные, распространенные в природе виды, в принципе безопасные для здоровых людей – редко регистрируются как возбудители заболеваний;
- BSL2 – более ограниченная группа и более опасная. Попадая в организм здорового человека, эти виды могут сохраняться и вызывать локализованные микозы. Кроме того, они хорошо себя чувствуют и в окружающей среде;
- BSL3 – очень небольшая группа наиболее опасных системных патогенов. Ее представители если и могут сохраняться в природе, то в специфических условиях, как правило, в более жарком климате.

В плане массового распространения и возможного контакта с человеком на территориях с умеренным климатом наибольшее внимание привлекают грибы группы BSL2. В первую очередь, это почвообитающие грибы: *Absidia corymbifera*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Acremonium kiliense*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. verticilloides*, *Paecilomyces variotii*, *Scopulariopsis brevicaulis* и др.

Грибы, являющиеся основными «поставщиками» спор во внешнюю среду, находятся в воздухе изолировано или на частицах растительного и животного происхождения в виде так называемого биоаэрозоля.

Интерес к исследованию состава атмосферного воздуха городов, жилых помещений, больниц на предмет присутствия потенциально патогенных и оппортунистических грибов неуклонно растет [5, 6]. Это связано с тем, что наибольшую опасность они представляют для людей с нарушенным иммунитетом. Локальная инвазия может сопровождаться попаданием патогена в кровеносные сосуды и инфицированием различных органов. Описаны случаи диссеминированных фузариозов, аспергиллезов со смертельным исходом [7].

Проведенный в течение ряда лет (2008–2014 гг.) мониторинг микромицетов в аэрозолях воздуха юга Западной Сибири показал, что грибы в воздухе могут находиться в виде различных пропагул (конидий, спор, хламидоспор, гиф и др.). В ходе исследований были выделены грибы из 19 родов, относящихся к трем подотделам (*Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Deuteromycotina*) [8, 9]. Исследования динамики численности микромицетов показали, что определенной тенденции в их распределении в течение года не наблюдается. Численность микромицетов в наземных пробах воздуха варьировала в зависимости от времени года, суток и года отбора проб. В летние месяцы максимальное количество спор в пробах

наблюдали преимущественно в утренние часы (4–4³⁰), затем происходило постепенное снижение их численности к 16–16³⁰ и вновь увеличивалось к 22–22³⁰. В высотных пробах численность микроскопических грибов распределялась очень неравномерно.

В наземных пробах качественный состав микромицетов был более широкий и варьировал от 10 до 15 родов в зависимости от точки отбора проб, а в высотных – от 7 до 15 родов.

В высотных пробах воздуха преобладали пигментированные грибы, в частности, виды родов *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, что согласуется с общепринятым мнением, что наличие пигментов, особенно меланина, в клеточных оболочках грибов способствует защите их от неблагоприятных факторов, особенно УФ-лучей. Анализ высотных проб воздуха показал, что единичные пропагулы грибов могут встречаться и в зимние месяцы на высотах от 1500 до 7000 метров.

Анализ распределения грибов по высотам показал, что споры *Alternaria* встречались преимущественно на высоте 500 м, споры *Fusarium* достигали высоты 1000 м, а споры *Aspergillus*, *Penicillium* и *Cladosporium* регистрировали на всех высотах, начиная со 100 м.

Среди дрожжей и дрожжеподобных грибов, которые были особенно обильны в апреле 2014 г. в высотных пробах атмосферного воздуха (0,5–2,0 км), представлены виды родов *Microstoma*, *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Aureobasidium*, *Sporidiobolus*, *Saccharmyces*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula* [10].

К микромицетам, способность которых вызывать заболевания человека известна, относятся виды родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, среди дрожжей потенциально наиболее опасными являются виды рода *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Cryptococcus*, *Bullera* [4, 11–13].

Проведенные исследования позволили установить динамику количественного и качественного состава потенциально опасных микромицетов в приземном слое и высотных пробах аэрозолей воздуха юга Западной Сибири.

Библиографический список

1. Марфенина О.Е., Иванова А.Е., Кулько А.Б. и др. Особенности распространения оппортунистических грибов во внешней среде // Современная микология в России: Тезисы докладов Первого съезда микологов России. – М., 2002. – С. 67.
2. Сергиев В.П. Атлас клинической паразитологии и тропической медицины. – М.: Авторская академия; Товарищество научных знаний КМК, 2010. – 284 с.
3. Коробцова И.П., Сергеев В.Ю. Кандидоз кожи в 2016: что нового? // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия микологии, 2016. – Т. 15. – С. 296–301.
4. Larone D.H. Medically important fungi. A guide to identification. American Society for Microbiology, 5-th edition. – Washington DC: ASM Press, 2011. – 485 p.
5. Иванова А.М. Изучение формирования микобиоты жилых помещений // Современная микология в России: Тезисы докладов Первого съезда микологов России. – М., 2002. – С. 55.
6. Доршакова Е.В., Елинов Н.П., Павлова И.Э. и др. Микромицеты в естественной среде обитания и в помещениях – их потенциальная опасность для здоровья людей // Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, № 3. – С. 53–58.
7. Соколова Г.В. Грибы рода *Fusarium* как оппортунистические патогены человека // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия микологии, 2016. – Т. 15. – С. 40–43.
8. Сафатов А.С., Теплякова Т.В., Белан Б.Д. и др. Концентрация и изменчивость состава микромицетов в атмосферном аэрозоле юга Западной Сибири // Оптика атмосферы и океана. – 2009. – Т. 22, № 9. – С. 901–907.
9. Воробьева И.Г., Теплякова Т.В., Сафатов А.С., Буряк Г.А. Комплексы микроскопических грибов в аэрозолях воздуха юга Западной Сибири // Успехи медицинской микологии. – М.: Нац. академия микологии, 2014. – Т. 13. – С. 83–84.
10. Андреева И.С., Соловьянова Н.А., Вечканов В.А. и др. Психротолерантные дрожжи в атмосферных аэрозолях Западной Сибири // Ежемесячный научный медицинский журнал Inter-Medical. – 2015. – № 1 (7). – С. 105–111.
11. Tuon F.F., Costa S.F. *Rhodotorula* infection. A systemic review of 128 cases from literature // Rev. Iberoam. Micol. – 2008. – Vol. 25. – P. 135–140.
12. Bross, J.E; Manning, P; Kacian, D; Talbot, G.H. Pseudomeningitis caused by *Sporobolomyces salmonicolor*. // American J. Infection Control. – 1986. – Vol. 14, N 5. – P. 220–223.
13. Lee S.C., Dickson D.W., Casadevall A. Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications // Hum. Pathol. – 1996. – Vol. 27. – P. 839–847.

ХАНТАВИРУСЫ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ

**Л.Н. Яшина¹, Л.Д. Щучинова², М.Ю. Рукавишников³, М.П. Кондрушина³,
В.Н. Михеев¹**

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция Роспотребнадзора», Горно-Алтайск; ³ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово Новосибирской обл., Россия

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает одно из первых мест среди природно-очаговых заболеваний человека в России со средней ежегодной регистраций около 7 600 случаев. Большая часть случаев ГЛПС (97%) зарегистрирована на территории Европейской части России, где превалируют легкие клинические формы ГЛПС. Меньшее число случаев регистрируют на Дальнем Востоке, однако, в основном, это более тяжелые клинические формы ГЛПС. И лишь спорадические случаи ГЛПС зарегистрированы на территории Сибири. При этом присутствие специфических антител к хантавирусам у людей, свидетельствующее о наличии очагов ГЛПС и естественной иммунизации населения, выявлено в 5 административных регионах Сибири, включая Республику Алтай. **Целью** настоящей работы было проведение эпидемиологической разведки новых очагов ГЛПС и обуславливающих их хантавирусов на территории Республики Алтай.

Нами проведено исследование инфицированности природных носителей вируса, 191 грызуна и 41 насекомоядного. Выявить и идентифицировать вирусную РНК удалось у двух видов полевков и двух видов бурозубок. Показано, что на территории Республики Алтай среди красных и красно-серых полевков циркулирует хантавирус Пуумала (генотип Хоккайдо), а среди бурозубок рода *Sorex* – хантавирусы Сивис, Алтай и Артыбаш.

Поскольку в настоящий момент отсутствуют данные о значимости данных хантавирусов для людей, нами проведено выявление иммунной прослойки среди населения, проживающего на территории Республики Алтай.

Первым этапом явилось исследование 263 сывороток людей, собранных в 2012 г. на территории Республики Алтай. Было установлено, что 1,9% жителей имеют специфические антитела к хантавирусам, причем такие антитела присутствуют у жителей трех районов: Турочакского, Кош-Агачского и Чойского.

Далее проводилось исследование сывороток, собранных в 2013 г. преимущественно у жителей именно этих районов. Среди исследованных 270 сывороток у 13 (4,8%) человек выявлены антитела к хантавирусам. Из 13 положительных сывороток 9 выявлено у жителей Турочакского района, 2 – у жителей Кош-Агачского района и по одной из Усть-Канского и Улаганского районов.

Выявленное нами наличие инфицированных грызунов и насекомоядных в окрестностях пос. Артыбаш Турочакского района и присутствие специфических антител у жителей этого же района свидетельствует о наличии нового очага или очагов хантавирусной инфекции, расположенных в окрестностях поселков Артыбаш и Турочак Республики Алтай. Можно предполагать наличие очагов ГЛПС и на территориях Кош-Агачского, Чойского, Усть-Канского и Улаганского районов.

Вопрос о том, какой из выявленных хантавирусов является возбудителем заболевания человека, остается открытым и требует дальнейших исследований. Неоценимый вклад в такие исследования внесет нацеленность врачей на выявление больных ГЛПС среди жителей Республики Алтай.

РАЗДЕЛ 3.

ФЛАВИВИРУСЫ И ВИРУС ЛИХОРАДКИ ЗИКА

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ В 60-Е ГОДЫ ПРОШЛОГО ВЕКА И В СОВРЕМЕННЫЙ ПЕРИОД НА ТЕРРИТОРИИ ПРИБАЙКАЛЬЯ

Р.В. Адельшин, О.В. Мельникова, Т.И. Борисова, Е.А. Сидорова, Н.В. Якович,
Е.И. Андаев

*ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противо-
чумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Россия*

В основу работы положен анализ 64 штаммов и 10 изолятов РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенных в современный период (2006–2015 гг.), а также 24 штамма, реизолированных из коллекции Иркутского научно-исследовательского противочумного института (1959-1969 гг.). Штаммы были изолированы на территории Прибайкалья из различных источников: клещей *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor silvarum*; мозга мелких млекопитающих и птиц; крови и ликвора больных; мозга умерших людей. Четыре штамма выделены из нетипичных источников: эмбрион птицы, комары, клещи и блохи – паразиты птиц. Все исследованные штаммы были генотипированы методом секвенирования фрагмента гена E (1193 п.н.) ВКЭ, для 12 штаммов проведено полногеномное секвенирование.

В результате филогенетического анализа (рис.) нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E как современных, так и коллекционных штаммов и изолятов РНК было выявлено преобладание сибирского субтипа ВКЭ на территории Прибайкалья. Современные изоляты (2007 г.) из Усть-Ордынского Бурятского округа (УОБО), изученные нами, практически не отличаются от штамма Айна, выделенного на территории округа более полувека назад от больной с прогрессирующим течением клещевого энцефалита (КЭ) [1]. В эту же группу входят штаммы, выделенные из различных источников (птицы, мелкие млекопитающие) в Иркутской области в 60-е годы прошлого века. Штамм 518-66, изолированный от больной в 1966 г., кластеризовался с современными штаммами: BR1595-13 (*I. persulcatus*, 2013 г.) и Irkutsk-12 (кровь больного, 2010 г.). В пределах подгруппы «Заусаев» сформировался кластер идентичных последовательностей штаммов, выделенных из различных источников (клещи, птицы, мелкие млекопитающие, больные) в период с 1959 по 1969 гг., за исключением штамма 282-63, изолированного от трехпалого дятла в 1963 г., он не обнаруживает сходства ни с одним из прибайкальских штаммов.

В целом из 24 исследованных коллекционных штаммов ВКЭ к дальневосточному и европейскому субтипам относится по одному штамму, к сибирскому – 22 (92%). Среди штаммов сибирского субтипа

представителями подгруппы «Васильченко» являются 38% последовательностей, подгруппы «Заусаев» – 62%. Из 74 нуклеотидных последовательностей современных штаммов ВКЭ, четыре (5,4%) относятся к европейскому субтипу. К подгруппе «Васильченко» относится 81%, к подгруппе «Заусаев» – 19% последовательностей сибирского субтипа ВКЭ. Выявлен один штамм (Irkutsk-1861) дальневосточного субтипа ВКЭ, выделенный от умершего пациента в 2008 г. (укус клеща в Тункинском районе Республики Бурятия). Интересным является факт, что штаммы и изоляты дальневосточного субтипа не обнаруживаются с начала века в клещах на территории Прибайкалья, однако вирус этого субтипа выявляется у больных и умерших людей [2, собственные данные].



Рис. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена E штаммов ВКЭ, выделенных на территории Прибайкалья в 1959–1969 гг. и 2006–2015 гг.

Анализ полногеномной последовательности штамма 1020-69 (кровь больной, 1969 г.) выявил максимальную идентичность (99,7%) со штаммами 4072 (кровь больного, 1966 г., коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), Sofjin-Chumakov (мозг умершего, 1937 г., коллекция ФГБНУ Инсти-

туда полиомиелита и вирусных энцефалитов), а также с современным штаммом Irkutsk-1861, выделенным от умершего пациента в 2008 г. Полногеномная последовательность ВКЭ сибирского субтипа штамма 41-65 (1965 г.) относится к подгруппе «Заусаев» сибирского субтипа и является генетически близкой (98,9%) к штамму IR99-22f7, выделенным в Иркутской области в 1999 г. Штамм Konst-14, выделенный из крови больной в 2014 г., имеет 96,4–96,7% идентичности со штаммами подгруппы «Заусаев». Штамм Irkutsk-12, выделенный из крови больного в 2010 г. (укус клеща в Тункинском районе Республики Бурятия), входит в подгруппу «Васильченко» и наиболее близок к штаммам из Забайкалья, изолированным от умершего больного (Cht-22), красной полевки (Zabaikalye 68B-00) и клеща *I. persulcatus* (Zabaikalye 1-09) в 2002-2009 гг.

При сравнении четырех нуклеотидных последовательностей гена полипротеина штаммов ВКЭ европейского субтипа выявлено 34 переменных сайта и только девять из них приводят к аминокислотным заменам. Следует отметить, что штамм 172-68, выделенный из ликвора больной в 1968 г., имеет лишь четыре отличия в аминокислотном составе полипротеина по сравнению с современными штаммами, выделенными из клещей *I. persulcatus* и буроzubки. Европейский субтип ВКЭ на территории Прибайкалья находится под действием жесткого очищающего отбора ($K_a/K_s=0,14$).

Таким образом, в результате анализа нуклеотидных последовательностей ВКЭ выявлена тенденция замещения подгруппы «Заусаев» на подгруппу «Васильченко» среди штаммов сибирского субтипа, выделенных на территории Прибайкалья.

Библиографический список

1. Живоляпина Р.Р. Материалы к изучению штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в Иркутской области // Докл. Иркутского противочумного ин-та. – Иркутск, 1971. – Вып. 9. – С. 163–166.
2. Козлова И.В., Верховина М.М., Дорошенко Е.К. и др. Результаты генотипирования штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – №5 (87). – Ч. 1. – С. 231–235.

ФЛАВИВИРУСЫ, ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ИХ РАСПРОСТРАНЕНИЕ В СОВРЕМЕННОМ МИРЕ

В.Б. Локтев

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Вирусы семейства *Flaviviridae* представляют собой относительно просто устроенные РНК-содержащие сферические оболочечные вирусы размером 40–60 нм. Геном представлен одноцепочечной инфекционной РНК, которая имеет размеры от 9500 до 12500 нуклеотидов. Геномная РНК кодирует один полипротеин, подвергающийся процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием индивидуальных структурных и неструктурных вирусных белков. Согласно современной классификации вирусов семейство флавивирусов (*Flaviviridae*) разбивают на три рода: флавивирусы (*Flavivirus*), пестивирусы (*Pestivirus*) и гепацивирусы (*Hepacivirus*), которые включают в себя более 58 различных видов вирусов [http://www.ictvdb.org/Ictv/fs_flavi.htm]. Род флавивирусов – самый многочисленный, он включает в себя более 53 видов, объединяющих 74 различных флавивируса. Типовым вирусом семейства считается вирус желтой лихорадки, а название семейства получило от латинского слова «flavus» – желтый [10]. Этот вирус был изолирован в 1927 г., и одновременно была доказана роль комаров в его передаче в природных очагах желтой лихорадки. В период с 1931 по 1937 гг. были последовательно изолированы следующие вирусы: шотландского энцефаломиелита овец, энцефалита Сент-Луис, Японского энцефалита и клещевого энцефалита.

Исторически серологические тесты стали основой первых классификаций флавивирусов [2]. Одна из первых классификаций была предложена на основе реакции торможения гемагглютинации антиви-

русными антителами. Несколько позднее было обнаружено, что реакция нейтрализации более эффективна в идентификации различных представителей флавивирусов [3]. Более детальные исследования 69 флавивирусов с помощью реакции нейтрализации позволили выделить 8 антигенных комплексов флавивирусов [2]. Это комплексы: клещевого энцефалита, Рио Браво, Японского энцефалита, Тюлений, Нтайя, Уганда S, денге и Мокоток. Причем 17 флавивирусов не удалось классифицировать с использованием реакции нейтрализации.

Исследование эпидемиологии флавивирусов позволило установить, что флавивирусы способны инфицировать широкий круг организмов, которые включают в себя млекопитающих, насекомых, птиц и рептилий [4]. В большинстве случаев передача флавивирусной инфекции осуществляется вектором: через укус комара или клеща. Однако для некоторых флавивирусов вектор не известен. Это позволило условно разделить флавивирусы на клещевые и комариные инфекции, а также группу вирусов, для которых вектор не известен. Наиболее значимые для человека флавивирусные инфекции связаны с вирусами денге, желтой лихорадки, Японского энцефалита, Западного Нила и клещевого энцефалита. Для России наибольшую медицинскую значимость имеет вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) [7].

С развитием методов определения нуклеотидных последовательностей стало понятно, что принципы организации вирусного генома и анализ нуклеотидной последовательности вирусного генома могут стать основными таксономическими критериями для флавивирусов [4]. В настоящее время полная нуклеотидная последовательность геномов различных видов флавивирусов определена для большинства известных флавивирусов. Сегодня в базе данных GenBank депонировано более 6400 полногеномных последовательностей флавивирусов. Наибольшее количество последовательностей (полных и частичных) определено для вирусов Западного Нила (45142) и денге (20300). Для ВКЭ депонировано около 2360 последовательностей, а для вируса Зика всего 328 нуклеотидных последовательностей. Анализ нуклеотидных последовательностей позволил оценить скорость эволюции флавивирусов и время дивергенции основных генотипов некоторых видов флавивирусов на основе анализа скорости накопления синонимичных замен в геноме флавивирусов и соотношения синонимичных и несинонимичных замен. Как правило, комариные флавивирусы имели более высокую скорость эволюции в сравнении с клещевыми вирусами. Она оценивается в $1,62 \times 10^{-4}$ до $4,9 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год для ВКЭ и $8,4\text{--}10,7 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год для вирусов денге. Уровень генетических отличий внутри одного вида флавивирусов может колебаться очень сильно. Так, генетические различия для ВКЭ весьма высоки и могут достигать 17,3% для нуклеотидных и 9,0% для аминокислотных последовательностей. Как правило, филогенетический анализ флавивирусов позволяет выделить несколько генотипов внутри одного вида. Так, вирусы денге имеют различное количество генотипов внутри одного вида [13]. Вирус денге-1 объединяет 5 генотипов, денге-2 имеет 4 генотипа, денге-3—5 генотипов, денге-4—2 генотипа. Обычно определенный генотип привязан к определенному географическому региону. Однако в последнее время наблюдается необычное распространение вирусов денге в новых географических районах мира. Циркуляция вируса денге-3, генотип III была характерна для стран Юго-Восточной Азии в середине 70-х годов прошлого столетия, затем этот генотип вируса денге выявлен в странах Восточной Африки и Центральной Америки, а далее распространился практически по всей Южной Америке [9].

Другие широко распространенные флавивирусы также генетически весьма разнообразны. Так, вирус Западного Нила представлен 5 основными генотипами, причем в течение последних 10 лет глобальное распространение получил генотип Ia [1, 5]. Вирус Японского энцефалита имеет 5 основных генотипов, а ВКЭ — три генотипа [6, 14]. Генетическое разнообразие видов флавивирусов, циркулирующих в относительно небольших географических регионах, как правило, существенно ниже. Пока не опубликовано данных о наличии генотипов у вируса Кьясанурской лесной болезни, вируса Альхурма и многих других флавивирусов. Так, анализ генетического разнообразия вируса Кьясанурской лесной болезни показывает, что его генетическое разнообразие укладывается в вариабельность генома всего в 1,2% для 48 штаммов вируса, изолированных на протяжении последних 50 лет [8]. Вирус Кьясанурской лесной болезни был недавно изолирован на юго-западе Китая, что говорит о необычном характере распространения флавивирусов в современном мире [15]. Выделенные китайские штаммы имели уровень гомологии 99,8% с индийскими изолятами, что говорит о недавнем заносе этого вируса в этот район Китая. Интересно отметить, что даже Гималайские горы не стали препятствием для распространения вируса Кьясанурской лесной болезни в Азии.

В последние десятилетия было зарегистрировано появление новых инфекционных заболеваний, вызываемых различными инфекционными агентами [11]. Это позволило говорить о появлении проблемы новых и возвращающихся инфекций. Флавивирусные инфекционные заболевания не стали исключением, а современная ситуация, связанная с появлением новых флавивирусов, изменением их географического распространения и появлением новых генетических вариантов, постоянно изменяется. Так, в период с 1993 по 2016 гг. было зарегистрировано более 37 случаев появления новых генетических вариантов или открытия новых видов флавивирусов. Это позволяет говорить о том, что многие представители рода флавивирусов демонстрируют высокую генетическую изменчивость и способность адаптироваться к новым природно-климатическим условиям.

Это хорошо иллюстрируется примером распространения вируса Зика в последние годы [12]. Так, вирус Зика был описан в 1948 г., как новый вид флавивирусов, вызывающий болезнь у африканских обезьян. В 1968 г. вирус был впервые выделен от человека в Нигерии. Периодически случались заражения этим вирусом людей и в других странах Африки. С 1951 по 1981 гг. циркуляция вируса Зика подтверждалась на основании серологических исследований в странах Африки и Азии. Вспышка лихорадки Зика на острове Яп в 2007 г. показала, что болезнь стала распространяться за пределами Африки и Азии. После регистрации заболевания в Бразилии и обнаружения связи с микроцефалией у детей отношение к этому комариному флавивирусу кардинально изменилось. В 2015 г. было признано, что лихорадка Зика стала эндемичным заболеванием для Бразилии и ряда стран Южной и Центральной Америки. Заболевание обычно протекает в легкой форме, однако способность вируса Зика поражать эмбрион человека с развитием микроцефалии придает этой инфекции огромную медицинскую значимость и актуальность. Филогенетический анализ известных полногеномных последовательностей вируса Зика показывает наличие нескольких геногрупп вируса Зика. К сожалению, на настоящий момент времени отсутствует общепринятая классификация генотипов и субгенотипов вируса Зика, однако уже имеющиеся данные позволяют говорить об азиатском, африканском и американском генотипах вируса Зика. Генетическая неоднородность вируса Зика предполагает, что методы генетической диагностики вируса Зика нуждаются в постоянном совершенствовании на основе развития наших представлений по генетическому разнообразию вирусов Зика.

Таким образом, постоянное появление новых геновариантов флавивирусов и открытие новых флавивирусов показывает, что генетическая изменчивость и разнообразие этих РНК-содержащих вирусов еще не до конца изучены. Важно отметить, что знание особенностей генетической вариативности флавивирусов имеет принципиальное значение для дальнейшего развития и совершенствования методов профилактики, лечения и диагностики опасных флавивирусных инфекций человека.

Библиографический список

1. Bondre V.P., Jadi R.S., Mishra A.C. et al. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage // *J. Gen. Virol.* – 2007. – Vol. 88, Pt 3. – P. 875–884.
2. Calisher C. H., Karabatsos N., Dalrymple J.M. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera // *J. Gen. Virol.* – 1989. – Vol. 70, Pt 1. – P. 37–43.
3. De Madrid A.T., Porterfield J.S. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study // *J. Gen. Virol.* – 1974. – Vol. 23, N 1. – P. 91–96.
4. Grard G., Moureau G., Charrel R.N. et al. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy // *Virology.* – 2007. – Vol. 361, N 1. – P. 80–92.
5. Gubler D.J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere // *Clin. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 45, N 8. – P. 1039–1046.
6. Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., Gould E.A. Family Flaviviridae // *Virus Taxonomy 7th International committee for the Taxonomy of Viruses*, Eds. van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E. San Diego: Academic Press – 2000. – P. 859–878.
7. Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia // *Zentralbl. Bakteriол.* – 1999. – Vol. 289. – P. 525–539.
8. Mehla R., Kumar S.R., Yadav P. et al. Recent ancestry of Kyasanur Forest disease virus // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15, N 9. – P. 1431–1437.
9. Messer W.B., Gubler D.J., Harris E. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 9, N 7. – P. 800–809.
10. Monath T.P., Heinz F.X. Flaviviruses // *Fields Virology* Eds. Fields B.N., Knipe, Howley P.M., Lippincott-

Raven, PA-N.Y. – 1995. – Vol. 1. – P. 961–1034.

11. Morens, D.M., Folkers G.K., Fauci A.S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases // Nature. – 2004. – Vol. 430. – P. 242–249.

12. Musso D., Gubler D.J. Zika Virus. // Clin Microbiol Rev. – 2016 – Vol. 29, N 3. – P. 487–524.

13. Osman O., Fong M.Y., Sekaran S.D. Genetic characterization of dengue virus type 1 isolated in Brunei in 2005–2006 // J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90, Pt 3. – P. 678–686.

14. Solomon T., Ni H., Beasley D.W. et al. Origin and evolution of Japanese encephalitis virus in southeast Asia // J. Virol. – 2003. – Vol. 77, N 5. – P. 3091–3098.

15. Wang J., Zhang H., Fu S. et al. Isolation of Kyasanur Forest disease virus from febrile patient, Yunnan, China // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 326–328.

АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ ТЫВА

О.В. Мельникова¹, Р.В. Адельшин¹, Ю.С. Савинова², Е.И. Андаев¹

¹ФКУЗ «Иркутский орден Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск; ²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

По данным Роспотребнадзора (2009–2013 гг.) почти половина всех заболевших клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации приходится на Сибирский Федеральный округ. Заболеваемость в Республике Тыва составила $12,2 \pm 1,2 / 100000$, что в 5,6 раза выше показателя по Российской Федерации. В то же время публикации об исследовании природных очагов Тывы на трансмиссивные «клещевые» инфекции немногочисленны. С начала XXI века были проведены рекогносцировочные обследования природных биотопов Тывы на клещевой энцефалит [1], а также уточнен видовой состав и численность иксодид в районах, где регистрируется обращаемость населения в связи с присасыванием клещей [2].

В результате индивидуального исследования 1450 клещей *I. persulcatus*, собранных сотрудниками Тывинской ПЧС на территории шести районов Республики Тыва в 2011 г., антиген вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) был обнаружен в $2,5 \pm 0,82\%$, $1,9 \pm 0,72\%$ клещей (Тандинский и Улуг-Хемский кожууны соответственно), менее чем в 1% клещей (Каа-Хемский и Пий-Хемский кожууны). По отдельным локациям вирусофорность колебалась от нуля до 5,26% (Каа-Хемский кожуун, р. Сизим). В Чаа-Хольском и Дзун-Хемчикском кожуунах таежных клещей с антигеном ВКЭ выявить не удалось. В среднем по республике вирусофорность клещей *I. persulcatus* составила $1,5 \pm 0,31\%$.

Из положительных в ИФА клещей, отловленных в Тандинском, Улуг-Хемском и Каа-Хемском кожуунах, на биологической системе (новорожденные белые мыши) удалось изолировать семь штаммов ВКЭ. Определена вирулентность изолятов для молодых лабораторных мышей при разных способах заражения. Титр вируса при внутримозговом заражении составил от 8,0 до $10,3 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$, при периферическом – от 6,9 до $9,4 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$. Величина индекса инвазивности колебалась от 0,2 до $3,2 \lg \text{ЛД}_{50}/\text{мл}$, указывая на гетерогенность исследованных штаммов по исследованному признаку.

При анализе расшифрованных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена E (1290 п. н.) семи штаммов ВКЭ выявлено 89 полиморфных сайтов, 14 несинонимичных замен. Процент идентичности последовательностей штаммов между собой составил 95,3–99,5. В результате филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей определено, что все штаммы принадлежат к группе «Васильченко» сибирского субтипа ВКЭ. На дендограмме три штамма ВКЭ, выделенные на территории Республики Тыва, объединяются в общий кластер с последовательностями как современных штамма (Z6) от клеща *I. persulcatus*, так и штамма (YuK 4–13), выделенного от этого же вида клещей в 1969 г. Все штаммы выделены на территории Кемеровской области. Четыре штамма ВКЭ образуют отдельный подкластер внутри группы «Васильченко» и не объединяются с выбранными в GenBank последовательностями.

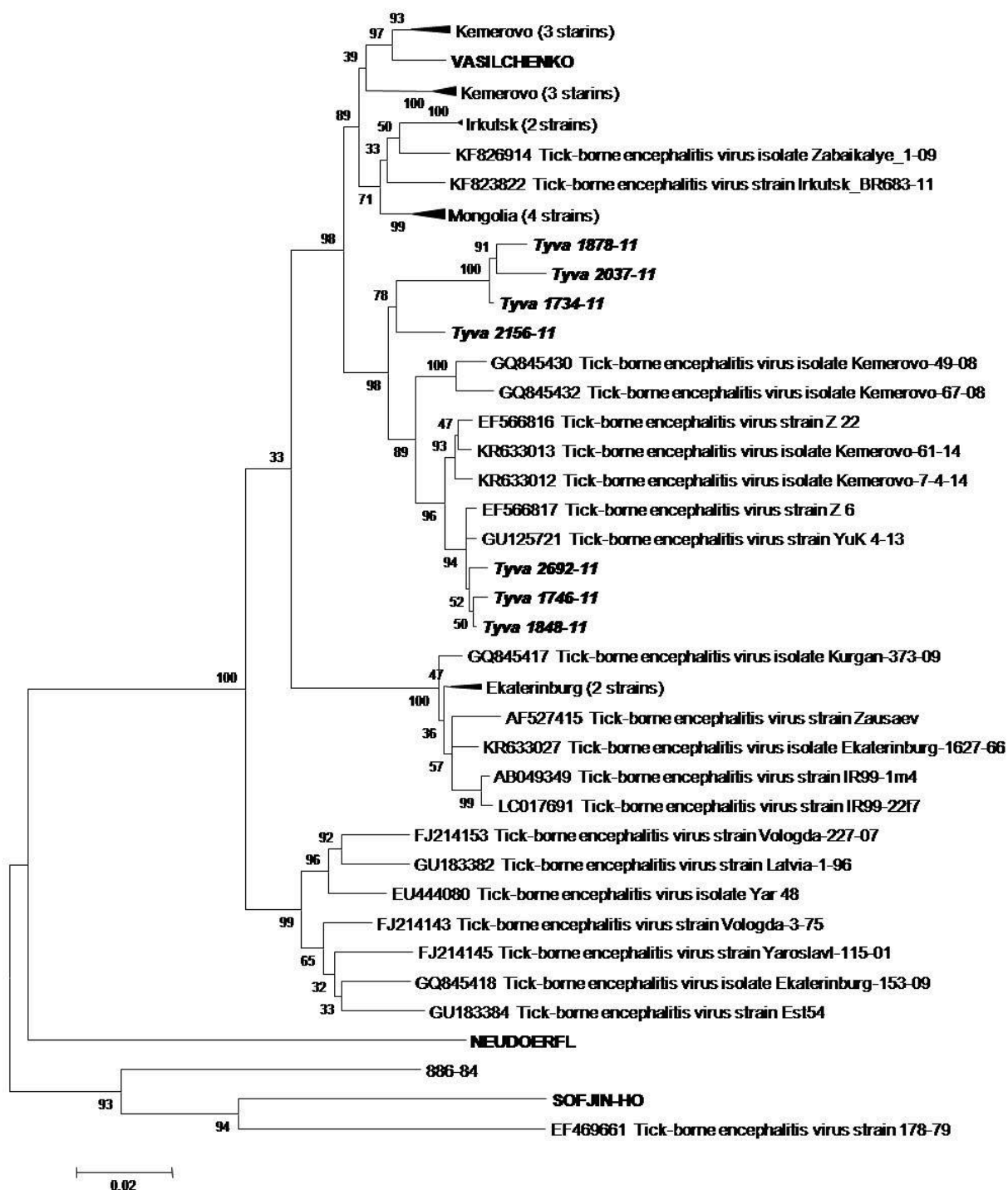


Рис. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена Е штаммов ВКЭ. Жирным курсивом выделены штаммы, изолированные на территории Республики Тыва в 2011 г.

Библиографический список

1. Галацевич Н.Ф., Чумаков А.В., Селезнева С.К., Чумакова Н.А. Опыт рекогносцировочного обследования природных биотопов Тувы на клещевой энцефалит // Состояние и освоение природных ресурсов Тувы и сопредельных регионов Центральной Азии: Научные труды Тув. ИКОПР СО РАН – Кызыл: Тув. ИКОПР СО РАН, 2003. – С. 131-135.
2. Буренкова Л.А., Коротков Ю.С., Белова О.А. и др. Фауна и экология иксодовых клещей – переносчиков клещевых инфекций человека в Республике Тыва // Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, – 2011. Т. XXV, С. 59-64.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ КЛЕЩЕВОГО ВИРУСНОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ЮГЕ РОССИИ

Д.А. Прислегина, Н.Ф. Василенко, О.В. Малецкая, Д.В. Ефременко

ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Хотя высокоэндемичными территориями по клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ) традиционно считаются Уральский, Сибирский и Дальневосточный регионы Российской Федерации, на юге нашей страны при проведении эпизоотологического мониторинга практически ежегодно обнаруживаются маркеры возбудителя КВЭ в полевом материале, собранном на территории ряда субъектов данного региона. Кроме того, в июне-июле 2015 г. было зарегистрировано 3 случая заболевания КВЭ в Республике Крым (2 – в Белогорском районе и 1 – в г. Ялте). Во всех случаях заболевание протекало в лихорадочной форме. Было отмечено позднее обращение за медицинской помощью 2 заболевших – на 8–9 день от появления первых симптомов КВЭ. При сборе эпиданамнеза установлено, что все больные отмечали укус клещом [4].

Эпизоотологический мониторинг возбудителя КВЭ в 2015 г. проводился на территории ряда субъектов Южного (в Ростовской, Волгоградской, Астраханской областях и Республике Адыгея) и Северо-Кавказского федерального округа (в Республике Северная Осетия-Алания).

В Ростовской области при исследовании полевого материала методом ИФА антиген вируса КВЭ выявлен в 19 пробах (из них клещей – 6 проб, грызунов – 5, птиц – 7 и слепней – 1). Наибольшее количество положительных проб (68,4%) обнаружено в г. Ростове-на-Дону, среди которых 4 составили пробы клещей *Dermacentor marginatus*, 4 пробы органов птиц, 4 – органов мышевидных грызунов и 1 – слепня серого большого. Положительные результаты были получены в Аксайском, Каменском и Мясниковском районах. Маркеры возбудителя КВЭ ежегодно выявляются на территории Ростовской области – в 2014 г. в г. Ростове-на-Дону (в Щепкинском урочище) антиген возбудителя КВЭ выявлен у полёвки обыкновенной, также РНК и антиген вируса клещевого энцефалита были обнаружены в 1 пробе клещей *D. marginatus*, собранных в Неклиновском районе, в 2013 г. – в 2 пулах клещей *D. marginatus* в г. Ростове-на-Дону (в Щепкинском урочище), а также в пробах этого вида клещей на территории Зерноградского, Дубовского и Аксайского районов [1, 3].

В Республике Адыгея маркеры возбудителя КВЭ в 2015 г. не были обнаружены, но в предыдущие годы в пробах клещей выявляли антиген вируса КВЭ: в 2010 г. – в г. Майкопе, в 2012 г. – в Гиагинском районе и в 2013 г. – на территории Майкопского района.

При исследовании клещей на территории Волгоградской области антиген возбудителя КВЭ обнаружен в 1 пробе клещей *Ixodes ricinus* (из 25 исследованных пулов этого вида), собранных в г. Волгограде. Впервые в 2013 г. антиген вируса КВЭ на территории Волгоградской области был выявлен при исследовании клеща *Ixodes persulcatus* в Городищенском районе, но по данным, представленным Управлением Роспотребнадзора по Волгоградской области, в данном случае имел место занос клеща из Новосибирской области.

При проведении эпизоотологического мониторинга на территории Астраханской области антиген возбудителя КВЭ выявлен в 2 из 182 пулов исследованных клещей *Hyalomma marginatum*, собранных в Приволжском районе.

В Республике Дагестан и Ставропольском крае эпизоотологический мониторинг в 2015 г. не проводился, но положительные находки на территории данных субъектов были выявлены в 2013 г. Так, на территории 4 административных районов Ставропольского края антиген возбудителя КВЭ обнаружен у 3 видов иксодовых клещей: *Haemaphysalis punctata* – 4 пробы в Степновском районе и 1 – в Курском; *I. ricinus* – 3 пробы в Курском районе, 5 – в Советском и 1 – в Георгиевском; *D. marginatus* – 1 проба в Советском районе. В Республике Дагестан антиген и РНК вируса КЭ были выявлены на территории 5 административных районов: Кизилюртовского (31 проба), Бабаюртовского (8), Казбековского (3), Кайтагского (13), Буйнакского (1) [2].

Таким образом, результаты эпизоотологического мониторинга последних лет свидетельствуют о циркуляции возбудителя клещевого вирусного энцефалита на территории юга России, что требует постоянного контроля за осуществлением ежегодного эпизоотологического обследования субъектов данного региона, так как недостаточный контроль эпизоотологической обстановки может привести к осложнению эпидемической ситуации по клещевому вирусному энцефалиту.

Библиографический список

1. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2014 г. // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 1 (274). – С. 38–41.
2. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2013 г. (Аналитическая справка). – Ставрополь, 2014. – 59 с.
3. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2014 г. (Аналитический обзор). – Ставрополь, 2015. – 76 с.
4. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г. (Аналитический обзор). – Ставрополь, 2016. – 96 с.

КЛЕЩЕВОЙ ВИРУСНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ В ЗАБАЙКАЛЬСКОМ КРАЕ. ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Е.А. Сидорова, Т.И. Борисова, Р.В. Адельшин, А.Г. Трухина, Е.И. Андаев

*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора, Иркутск, Россия*

Введение. Ситуация по клещевому вирусному энцефалиту (КВЭ) на территории Забайкальского края (до 2008 г. Читинская область) остается напряженной. Статистический учет заболеваемости КВЭ в крае ведется с середины 50-х годов прошлого века. С 1960 по 1984 гг. прослеживалась умеренная тенденция к снижению заболеваемости ($Y = -0,06 \text{ ‰}$), а с 1985 по 2015 гг. – напротив к увеличению ($Y = 0,1 \text{ ‰}$). Кроме того, с 1960 по 2000 гг. включительно показатели заболеваемости КВЭ по РФ превышали таковые по Забайкальскому краю в среднем в 1,5 раза; с 2001 г. заболеваемость превысила общероссийские в среднем в 1,8 раз [2].

С 2003 по 2015 гг. зарегистрировано 602 случая КВЭ, средний многолетний уровень заболеваемости составил $4,24 \pm 0,3 \text{ ‰}$, из них 34 случая тяжелого заболевания с летальным исходом (5,6%). В структуре заболеваемости преобладает лихорадочная форма КВЭ (67%), около 18% приходится на очаговые формы инфекции, 10% – менингеальные, и до 5% диагностируют как стертую форму КВЭ. Из 32 административных территорий эндемичными по КВЭ являются 23. До 50% заболевших КВЭ регистрируется в пяти административных районах (Петровск-Забайкальский, Красночикойский, Улетовский, Читинский, Оловянинский) и г. Чите [3]. Заболеваемость КВЭ в Забайкальском крае в большинстве своем связана с посещением очаговых территорий не привитым населением преимущественно с бытовыми целями (отдых, работа на приусадебных участках и сборы дикоросов). Наибольшему риску заражения подвергается трудоспособное население в возрасте 18–29 лет (до 30%) и 30–49 лет (до 20%), преимущественно мужского пола (более 85%). Из числа заболевших 42% приходится на неработающее население (включая лиц школьного и пенсионного возрастов). Одной из особенностей КВЭ в Забайкальском крае является преобладание в структуре заболевших жителей сельских районов (60%).

Ранее нами были показаны циркуляция в Забайкальском крае вируса КЭ двух субтипов – сибирского и дальневосточного и их участие в формировании очаговых форм КВЭ с летальным исходом. Кроме того, от умерших больных были изолированы политиповые штаммы, содержащие участки геномов дальневосточного и сибирского субтипов [1].

Цель данной работы – сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса КЭ, изолированных в Забайкальском крае от умерших больных, мелких млекопитающих, птиц и иксодовых клещей в 60-е годы XX века и на современном этапе.

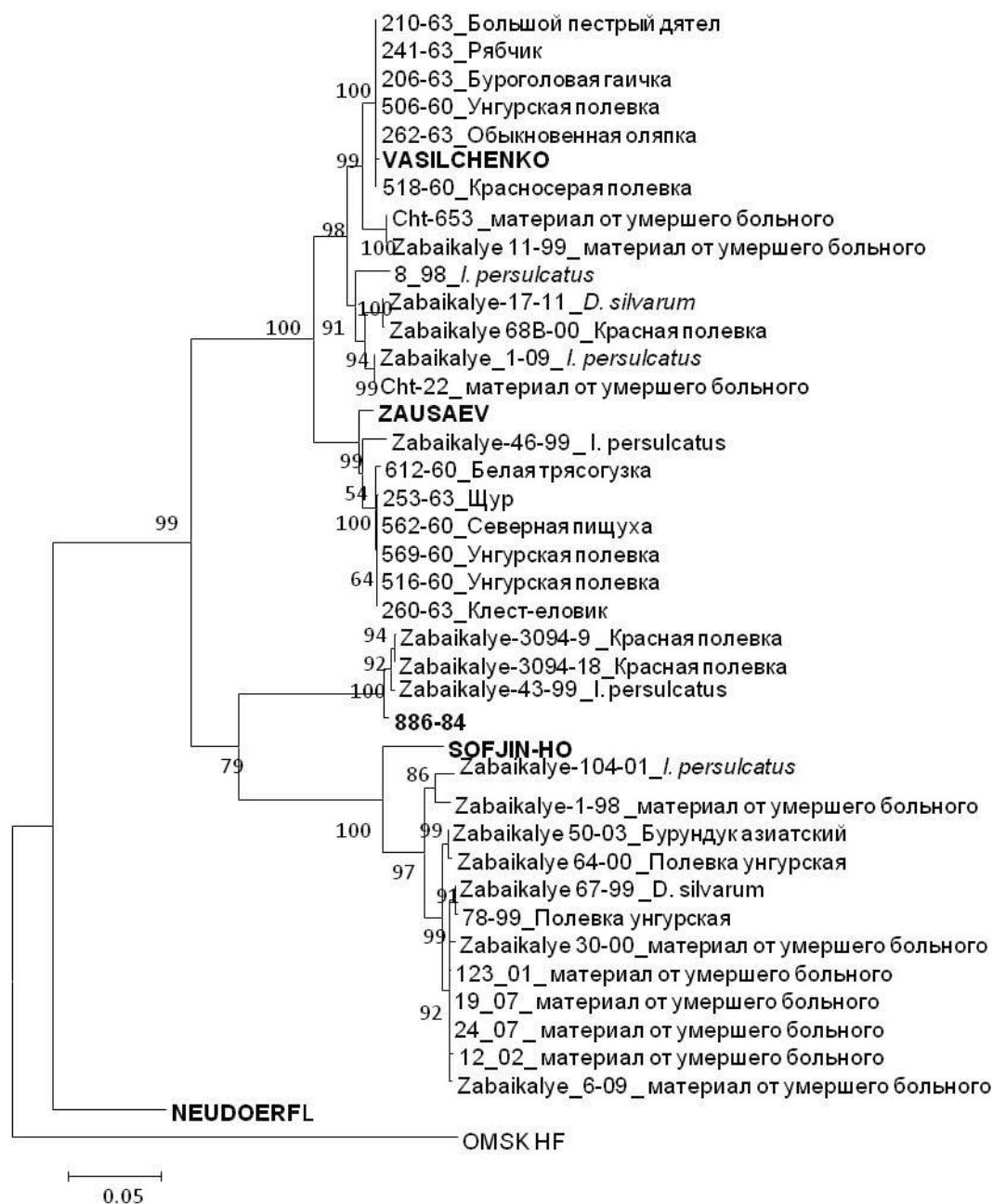


Рис. Дендрограмма фрагмента гена белка Е (1278 п.н.) штаммов вируса КЭ Забайкальского края, построенная с помощью метода максимального правдоподобия с использованием алгоритма General Time Reversible (GTR + G), с бутстреп поддержкой 1000.

Материалы и методы. В работе использованы 35 штаммов вируса КЭ из коллекции лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора из разных источников (от умерших людей – 10; мелких млекопитающих –

11; иксодовых клещей – 7 и птиц – 7), выделенных в 1960-х годах XX века и на современном этапе.

Изоляцию проводили на 2–3-суточных новорожденных белых мышах по общепринятой методике. РНК выделяли коммерческим набором «Рибо-преп» (ООО «Некст-Био», г. Москва), обратную транскрипцию – «Реверта-L-100» (ФБУН ЦНИИЭ, г. Москва). Получение ПЦР-продуктов и секвенирование проводили с помощью праймеров, фланкирующих участок гена белка Е длиной 1268 п. н. Нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программы BioEdit v.7.0.9.0., MEGA v.5.

Результаты и обсуждение. При секвенировании фрагмента гена белка Е вируса КЭ расшифрованы последовательности 23 штаммов, изолированных с 1995 по 2011 гг. от умерших больных, мелких млекопитающих и иксодовых клещей. Из них 12 штаммов – дальневосточного, восемь – сибирского субтипов и три «886–84» подобного варианта вируса КЭ (рис.). Штаммы дальневосточного субтипа образуют собственный кластер, внутри которого нуклеотидные различия между ними минимальные и составили 1,0–3,0% и 6,0% с прототипным «Sofjin-НО». Группа «886–84» подобных штаммов на 99,2% схожа с прототипом. Среди представителей сибирского субтипа семь штаммов азиатского топоварианта с прототипным штаммом «Васильченко». Данная группа штаммов оказалась наиболее вариабельной с отличием от прототипа на 2,0–6,0%. Один штамм, изолированный от клеща *I. persulcatus* отловленного в Дульдургинском районе, вошел в кластер «Заусаев» с идентичностью 97,7%.

Для изучения возможного изменения молекулярно-генетического пейзажа вируса КЭ были отобраны и проанализированы современными методами коллекционные штаммы вируса, изолированные на территории Читинской области в 1960 г. и 1963 г. Коллекционные штаммы были выделены от птиц семи видов отрядов дятлообразные, воробьиные и куриные (7 штаммов), от мелких млекопитающих трех видов отрядов зайцеобразные и грызуны (5 штаммов). Все изученные штаммы генотипированы как вирус КЭ сибирского субтипа азиатского топоварианта групп «Васильченко» и «Заусаев». Штаммы внутри каждой группы характеризуются выраженной однородностью (99,6–100%), что отличает их от современных изолятов. Среди штаммов, выделенных в 1960 г., 67% входят в группу «Заусаев» (4 штамма от белой трясогузки, полевки унградской, пищухи альпийской) и 33% – «Васильченко» (2 штамма от полевок унградской и красно-серой). Среди штаммов, выделенных в 1963 г., преобладали представители группы «Васильченко» – 67% (4 штамма от рябчика, оляпки обыкновенной, большого пестрого дятла, гаички буроголовой).

Таким образом, анализ эпидемиологической ситуации по КВЭ в Забайкальском крае с 1960 по 2015 гг. показал умеренную тенденцию к росту заболеваемости; среди больных преобладают лихорадочные формы болезни; группу риска составляют лица мужского пола в возрасте от 18 до 49 лет. На территории Забайкальского края изолированы штаммы дальневосточного и сибирского субтипов вируса КЭ, «886–84» подобные изоляты и политиповые. Современная группа штаммов сибирского субтипа преимущественно представлена группой «Васильченко» (87%), тогда как штаммы 1960-х годов – в равной степени подгруппами «Васильченко» и «Заусаев».

Для изучения молекулярно-генетического пейзажа вируса КЭ и его микроэволюции необходимо продолжить исследование представительной группы как современных изолятов вируса, так и коллекционных штаммов разных лет изоляции.

Библиографический список

1. Андаев Е.И., Трухина А.Г., Борисова Т.И. и др. Неоднородность популяции вируса клещевого энцефалита в природных очагах Читинской области // Sci. J. – Ulaanbaatar, 2008. – N 16. – P. 245–250.
2. Згуровец В.Е., Носков А.К. Анализ заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в Забайкальском крае за период с 1965 по 2009 годы // Сб. статей к 70-летию гос. сан.-эпид. службы Забайкальского края. – Чита, 2010. – С. 257–262.
3. Туранов А.О., Носков А.К., Трухина А.Г. и др. Особенности клещевого вирусного энцефалита в Забайкальском крае // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2015. – № 5 (105). – С. 47–51.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СИБИРСКОГО ГЕНОТИПА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ТЕРРИТОРИИ ЕВРАЗИИ

**С.Е. Ткачев¹, В.Н. Бахвалова², И.В. Козлова^{3,4}, Г.С. Чичерина², Т.В. Демина⁵,
М.М. Верховзина⁶, Ю.П. Джиоев^{3,7}, Е.К. Дорощенко³, О.В. Лисак³, А.Ю. Тикунов¹,
Н.В. Тикунова¹, В.И. Злобин^{4,7}.**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск; ³ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ⁴ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск; ⁵Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутск; ⁶ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск; ⁷НИИ биомедицинских технологий ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия

При разработке диагностических тест-систем, основанных на выявлении фрагментов генома возбудителя заболевания, необходимо учитывать генетическую вариабельность патогена. Сибирский генотип вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) широко распространен на всей территории Евразии и, вероятно, является наиболее генетически вариабельным [1, 6]. Так, для данного генотипа ранее были описаны субгенотипы Заусаев и Васильченко, а также “балтийская ветвь” и “европейский топовариант” [4, 5, 7, 8].

Целью нашей работы являлся сравнительный анализ генетического разнообразия субгенотипов ВКЭ сибирского генотипа, выявленных на территории Западной и Восточной Сибири, Урала, Европейской части России, а также Северо-Западной части Евразии (Скандинавия, Прибалтика, Северо-Западный федеральный округ России). Для анализа были определены последовательности фрагментов гена E 129 и 160 штаммов сибирского генотипа ВКЭ, выделенных на территории Западной и Восточной Сибири соответственно, а также взяты последовательности фрагментов гена E изолятов и штаммов сибирского генотипа ВКЭ, представленные в базе данных GenBank.

Для проведения анализа генетического разнообразия ВКЭ в Западной Сибири были определены последовательности гена E ВКЭ из коллекции ИСЭЖ СО РАН, г. Новосибирск, выделенных на территории лесопарковой зоны Новосибирского Академгородка и окрестностей г. Новосибирска в 1981-2002 гг. (n=124) и в 2014 г. (n=5), а также последовательности фрагментов геномов 14 штаммов ВКЭ из базы данных GenBank, выделенных на этих же территориях в 2007-2011 гг. Выравнивание последовательностей с последующим построением филограммы методом присоединения соседей (neighbor-joining) (NJ), показало, что внутри кластера сибирского генотипа можно выделить три субгенотипа – Васильченко (I), Заусаев (II), и третий, не описанный ранее субгенотип, получивший название “Академгородок”.

Для изучения генетического разнообразия ВКЭ на территории **Восточной Сибири** были определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов E-NS1 (длиной 341 н.о.) для 160 штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на территории Восточной Сибири, из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск, а также 12 последовательностей штаммов ВКЭ, выделенных на территории Восточной Сибири, из базы данных GenBank. Выравнивание последовательностей с последующим построением филограммы методом NJ, показало, что штаммы ВКЭ сибирского генотипа из Восточной Сибири разделяются на субгенотипы Васильченко и Заусаев, а к не описанному ранее субгенотипу Академгородок, который был широко представлен штаммами ВКЭ из Западной Сибири, не относился ни один из штаммов с Восточной Сибири.

Сибирский генотип ВКЭ также доминирует и на **территории Урала** [2]. Для сравнительного анализа были взяты последовательности штаммов и изолятов ВКЭ, выделенных на территории Урала

(Башкирия (n=1). Свердловская (n=167), Курганская (n=10), Челябинская (n=6) и Тюменская (n=20) области), представленные в базе данных GenBank. Анализ построенной филограммы на основании фрагмента гена E длиной 369 н.о. показал, что исследуемые штаммы и изоляты ВКЭ формируют 4 кластера внутри сибирского генотипа. В кластер I (субгенотип Васильченко) не вошли ни один из штаммов или изолятов ВКЭ с территории Урала. Кластеры II (Заусаев) и III (Академгородок) содержали 141 и 39 штаммов и изолятов ВКЭ с территории Урала соответственно. Кластер IV, получивший название “субгенотип Урал”, был сформирован 26 штаммами и изолятами, выделенными только на территории Уральского региона.

ВКЭ также выявляется в **европейской части России** [3]. Для анализа, из базы данных GenBank были отобраны последовательности штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на европейской части России (n=30). На основании последовательностей фрагмента гена E (длиной 196 н.о.) методом NJ была построена филограмма. Было показано, что исследуемые штаммы с территории европейской части России преимущественно (n=27) формируют отдельный кластер внутри сибирского генотипа ВКЭ (“европейский топовариант”) (кластер VI), один штамм относился к субгенотипу Заусаев, два к кластеру III (субгенотип Академгородок) штаммов Западной Сибири, и ни один не относится к субгенотипу Васильченко.

На территории Северо-Западной части Евразии (Скандинавия, Прибалтика, Северо-Западный федеральный округ России) помимо европейского генотипа ВКЭ выявляют и сибирский генотип [7, 8]. Для сравнительного анализа в базе данных GenBank были выбраны последовательности штаммов ВКЭ сибирского генотипа, выделенных на данных территориях (n=20). На основании последовательностей фрагмента гена E ВКЭ (длиной 192 н.о.) методом NJ была построена филограмма. Было показано, что среди исследуемых штаммов только один относился к субгенотипу Заусаев, остальные штаммы формировали отдельный кластер, описанный ранее как “балтийская ветвь” сибирского генотипа ВКЭ (кластер V) [7, 8]. Кластеры Васильченко и Академгородок формировали только штаммы из Западной Сибири.

Резюме

Несмотря на то что представленность штаммов ВКЭ сибирского генотипа с территорий европейской части России, Северо-Западного федерального округа России, стран Скандинавии и Прибалтики невелика по сравнению с выборкой штаммов ВКЭ с территорий Урала, Западной и Восточной Сибири, тем не менее полученные данные позволили установить, что сибирский генотип ВКЭ обладает высокой генетической вариабельностью. Распространенность разных субгенотипов была различной: на территории Западной Сибири впервые был выделен новый субгенотип, названный нами “Академгородок”; вирусы этого субгенотипа были найдены также на Урале и в европейской части России. На территории Урала впервые был описан субгенотип “Урал”. Представители субгенотипа Заусаев ВКЭ были найдены на всех исследуемых территориях; субгенотип Васильченко широко представлен на территории Восточной и Западной Сибири, и, по всей видимости, отсутствует западнее данных территорий. “Балтийская ветвь” и “европейский топовариант” сибирского генотипа ВКЭ были найдены только на территории Скандинавии и Прибалтики и европейской части России соответственно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки (проект VI.55.1.1) а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН №1 по стратегическим направлениям развития науки «Фундаментальные проблемы математического моделирования (Проект «Разработка комплекса программного обеспечения для моделирования физико-химических и биологических свойств антигенных эпитопов белков разных генотипов вируса клещевого энцефалита»).

Библиографический список

- 1) Злобин В.И., Беликов С.И., Джигоев Ю.П. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Иркутск: РИО ВСНЦ СО РАМН, 2003. – 272 с.
- 2) Ковалев С.Ю., Умпелева Т.В., Снитковская Т.Э. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вируса клещевого энцефалита на территории Свердловской области на основе генотипспецифической ОТ-ПЦР // Вопр. вирусол. – 2008. – № 2. – С. 27–31.
- 3) Лесникова М.В., Лесников И.Р., Филоненко И.В. и др. Особенности клещевого энцефалита на территории Вологодской области // Медицинская вирусология. Труды института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН. – М., 2007. – Т. XXIV. – С. 53–58.

4) Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С. и др. Сибирский и дальневосточный подтипы вируса клещевого энцефалита в европейских и азиатских регионах России: генетическая и антигенная характеристика штаммов // *Вопр. вирусол.* – 2004. – Т. 49, № 4. – С. 20–25.

5) Ткачев С.Е., Боргояков В.Ю., Ливанова Н.Н., Панов В.В. Встречаемость генетических типов и подтипов вируса клещевого энцефалита на территории Новосибирского научного центра // *Сибирский медицинский журнал.* – 2012. – № 4. – С. 41–44.

6) Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhovina M.M. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. // *J. Med. Virol.* – 2010. – V. 82, N 6. – P. 965–976.

7) Golovljova I., Katargina O., Gellera J. et al. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype // *International J. Med. Microbiol.* – 2008. – V. 298, Supl. 1. – P. 108–120.

8) Golovljova I., Vene S., Sjolander K.B. et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia // *J. Med. Virol.* – 2004. – V. 74. – P. 580–588.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО ГЕНОТИПА, ВЫЯВЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

**С.Е. Ткачев¹, Т.В. Демина², И.В. Козлова^{3,4}, Е.К. Дорощенко³, О.В. Лисак³,
О.В. Сунцова³, М.М. Верховина⁵, Ю.П. Джигоев^{3,6}, А.И. Парамонов³, А.Ю. Тикунов¹,
Ю.С. Савинова³, Н.В. Тикунова¹, В.И. Злобин^{4,6}, Д. Ружек^{7,8}**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутск; ³ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ⁴ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России, Иркутск; ⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск; ⁶НИИ биомедицинских технологий ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, Россия; ⁷Институт паразитологии биологического центра Академии наук Республики Чехия, Ческе-Будеевице, Республика Чехия; ⁸НИИ ветеринарии, Брно, Республика Чехия

В настоящее время выделяют три основных генотипа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ): 1) дальневосточный; 2) европейский; 3) сибирский [2]. Различия последовательностей геномов между разными генотипами вируса могут достигать 12–16%, что необходимо учитывать при конструировании диагностических тест-систем, основанных на выявлении фрагментов генома возбудителя заболевания. Каждый из генотипов вируса обладает собственным ареалом, в пределах которого отмечается его доминирование. В сибирском регионе доминирующим генотипом ВКЭ является сибирский; тем не менее было обнаружено, что крайней восточной границей ареала европейского генотипа ВКЭ на территории России является территория Восточной Сибири (Иркутская область) [1].

Целью данной работы являлось сравнение генетических и биологических характеристик штаммов вируса клещевого энцефалита европейского генотипа, выявленных на территории Западной и Восточной Сибири. В работе использовали 13 штаммов из коллекции ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск, выделенных на территории Западной (5 штаммов) и Восточной Сибири (8 штаммов). Штаммы из Западной Сибири (Республика Алтай) были выделены из клещей *Ixodes persulcatus* (штаммы Змеиногорск-1, Змеиногорск-3, Змеиногорск-5, Змеиногорск-7, Змеиногорск-9). Из Восточной Сибири (Иркутская область) три штамма были изолированы от клещей *I. persulcatus* (126-71; 163-74; 262-74), четыре штамма от мелких млекопитающих (118-71 и 134-71 из *Spermophilus undulatus*, 272-75 из *Microtus gregalis*, 898-

84 из *Myodes rutilus*) и один штамм (1G-98) из крови человека, переболевшего лихорадочной формой клещевого энцефалита.

Анализ расшифрованных последовательностей геномов показал, что штаммы, выделенные на территории Западной и Восточной Сибири, формируют отдельные кластеры на дендрограммах. Группа штаммов из Западной Сибири показала высокий уровень гомологии (99%) со штаммами Абсеттаров [GenBank KJ000002.1] (выделен в Карелии в 1951 г.), Kumlinge A52 [GU183380] (Финляндия, 1952), Kumlinge 25-03 [GU183379] (Финляндия, 2003), Est3476 [GU183383] (Эстония, 2000), Joutseno [GU183381] (Финляндия, 1960). Группа, содержащая штаммы из Восточной Сибири, демонстрировала высокий уровень гомологии (99%) со штаммом 84.2 [HM120875], выделенным ранее на территории Алтая (Западная Сибирь), и 98% гомологии с другими 17 штаммами ВКЭ, выделенными на территории Финляндии, Эстонии и других стран Европы. Следует отметить, что внутри каждой из групп штаммов ВКЭ наблюдался высокий уровень гомологии (>99%) нуклеотидных последовательностей, что, вероятно, свидетельствует о крайне высокой консервативности последовательностей геномов у ВКЭ европейского генотипа вне зависимости от источника выделения (клещи, мелкие млекопитающие, кровь человека). Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Так, при анализе последовательностей геномов штаммов ВКЭ, выделенных в Центральной Европе, была показана стабильность генома европейского генотипа [6]. Также при сравнительном анализе кодирующей части полногеномных последовательностей ВКЭ из GenBank было обнаружено, что штаммы европейского генотипа, по сравнению с представителями дальневосточного и сибирского генотипов, характеризуются наиболее высокими уровнями гомологии как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей внутри одного генотипа, т.е. наименьшим уровнем различий [1].

Анализ последовательностей полипротеина, полученных на основании определенных последовательностей кодирующих частей геномов исследуемых штаммов, и сравнение с последовательностями полипротеинов штаммов ВКЭ, относящимся к дальневосточному (n=75), сибирскому (n=24) и европейскому (n=26) генотипам из базы данных GenBank, показал, что по 10 позициям наблюдаются аминокислотные остатки, не характерные для европейского генотипа, но встречающиеся в других генотипах (сибирском и дальневосточном), а по 14 позициям обнаружены аминокислотные остатки, не описанные ранее ни для одного из генотипов.

Также была проведена оценка некоторых биологических свойств штаммов европейского генотипа ВКЭ, выявленных на территории Восточной Сибири. Было показано, что штаммы 1G-98 и 898-84 обладали высокой церебральной и периферической активностью. Так, титры вируса при интрацеребральном заражении составили 8,72 и 9,32 lg ЛД₅₀/мл соответственно, при подкожном заражении - 6,35 и 6,9 lg ЛД₅₀/мл. Штаммы обладали хорошими инвазивными свойствами, что свидетельствует об их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер. При заражении молодых белых мышей штаммами ВКЭ европейского субтипа в среднем процент летальности составил 95,9%, средняя продолжительность жизни - 5,5 дней. Определение размера бляшек в культуре клеток СПЭВ показало гетерогенность изученных штаммов по данному маркеру. Штаммы 134-71 и 272-75 формировали мелкие и среднего размера (d=1,5-2,0 мм) бляшки, в то время как штаммы 118-71 и 898-84 формировали крупные бляшки (d=3,5-5,0 мм). Для пяти штаммов были определены генетические маркеры rct37 и rct42. Четыре из изученных штаммов хорошо размножались на культуре клеток СПЭВ как при температуре 37 °С, так и при 42 °С, что свидетельствует об их хороших адаптивных способностях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №14-15-00615.

Библиографический список

- 1) Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Verkhovina M.M. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 82. – P. 965–976.
- 2) Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of TBEV from Europe and Asia // J. Gen. Virol. - 1999. - Vol. 80. – P. 179–185.
- 3) Kim S.Y., Yun S.M., Han M.G. et al. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea // Vector Borne Zoonotic Dis. - 2008. - Vol. 8, N 1. - P. 7–13.
- 4) Reed L., Muench H.A. A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints // Am. J. Hyg. – 1938. – N 27. – P. 493–497.

5) Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28, N 10. – P. 2731–2739.

6) Weidmann M., Frey S., Freire C.C. et al. Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe // *J. Gen. Virol.* – 2013. - Vol. 94, Pt. 9. - P. 2129–2139.

7) Yun S.M., Kim S.Y., Han M.G. et al. Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses isolated in South Korea // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2009. – Vol. 9, N 3. – P. 287–293.

РАЗДЕЛ 4.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ОСОБО ОПАСНЫХ И СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО РАСПРОСТРАНЕНИЮ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.М. Астахова¹, А.В. Тотменин¹, М.П. Гашникова¹, С.В. Петрова², О.А. Пунько²,
А.В. Попков², Н.М. Гашникова¹

*¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., ²ГБУЗ Тюменской области;
"Центр профилактики и борьбы со СПИД", Тюмень, Россия*

В 2015 г. среди граждан Российской Федерации было зарегистрировано продолжение роста заболеваемости ВИЧ-инфекцией. Высокая пораженность ВИЧ (более 0,5% среди всего населения) наблюдалась в 26 регионах, где проживает 41,5% населения страны. По показателю пораженности населения ВИЧ-инфекцией среди территорий Российской Федерации Тюменская область находится на 8 месте (1107,0), а по заболеваемости – на 13 (106,6 на 100 тыс. населения). За всю историю развития эпидемии ВИЧ-инфекции в Тюменской области наблюдалось два резких подъема заболеваемости: в 1999–2001 гг. (что было связано с активным ростом потребления ханки и героина, доля наркотического пути заражения составляла 98–78%). В 2003–2008 гг. наблюдались минимальные темпы прироста показателей заболеваемости (ниже 2% и отрицательные), увеличение доли женщин среди вновь выявленных ВИЧ-инфицированных, увеличивалась доля полового пути (50% в 2004 г.) заражения. Однако с 2008 г. на рынке наркотиков появляется множество препаратов и рецептов кустарного приготовления наркотических средств, а во второй половине 2009 г. в области, как следствие, отмечается подъем регистрации вновь выявленных случаев ВИЧ. В эпиданамнезе ВИЧ+ лиц Тюменской области все чаще значится употребление синтетических психостимуляторов, в последние 2–3 года наркозависимые указывают на употребление «солей» и «синтетики».

Целью данного исследования являлось изучение молекулярно-генетических особенностей вариантов ВИЧ-1, выделенных от лиц, инфицированных на территории Тюменской области.

Материалы и методы. В исследование вовлечены ВИЧ+ лица с диагнозом ВИЧ-инфекция, проживающие в Тюменской области. Образцы крови были связаны с демографическими и клиническими данными посредством анонимных кодированных номеров по требованиям этических норм России. Все пациенты на момент забора крови не принимали АРВТ. Характеристики пациентов–доноров крови включали пол и возраст, путь инфицирования и предполагаемый период заражения, наличие практики употребления наркотических препаратов и вид наркотиков, вирусную нагрузку и количество кле-

ток CD4 на момент постановки диагноза. Для каждого клинического образца выделяли РНК ВИЧ-1, получали и исследовали по три фрагмента генома вируса: два фрагмента гена *pol*, кодирующие область протеазы-ревертазы (PR-RT, протяженностью 1400 нт.), область интегразы (IN, 960 нт.) и фрагмент, кодирующий участок основного белка оболочки вируса – *env* (732 нт.).

Результаты

Исследуемая выборка включала 28 (41,8%) мужчин и 39 (58,2%) женщин, средний возраст пациентов составил 35 лет (23–60); 28 человек (41,8%) сообщили об употреблении инъекционных наркотиков (ПИН), 38 человек (56,7%) были инфицированы при гетеросексуальных контактах и один мужчина относился к МСМ (1,5%). Среди группы ПИН 28,6% лиц указали внутривенное потребление героина и/или ханки, в 46,4% случаев наряду с героином/ханкой использовали соли и/или синтетические психостимуляторы, 25% лиц употребляли синтетические психоактивные вещества. Для 59,7% лиц можно было достоверно определить предполагаемый период инфицирования, так как они ранее обследовались на ВИЧ. Анализ клинических данных позволил определить медиану показателей вирусной нагрузки и количества клеток CD4+: 2.2×10^4 (5.0×10^2 – 7.0×10^6) копий/мл и 332 (2–1240) клетки/мкл для общей выборки и 2.2×10^4 (5.0×10^2 – 3.4×10^5) копий/мл и 450 (46–1105) клеток/мкл для лиц, инфицированных в 2013–2015 гг. соответственно. Анализ клинико-эпидемических данных пациентов, вовлеченных в исследование, дает основания заключить, что настоящая выборка позволяет дать характеристику вариантам ВИЧ-1, распространившимся в период основной вспышки ВИЧ-инфекции 2000–2001 гг., а также описать особенности ВИЧ-1, определяющих современную эпидемию ВИЧ-инфекции в Тюменской области.

Для 67 лиц с диагнозом ВИЧ-инфекция из плазмы крови была выделена вирусная РНК, и для вариантов ВИЧ-1 изучены фрагменты, кодирующие протеазу-ревертазу, интегразу и основной белок оболочки ВИЧ-1. Генотипирование вирусов по области PR-RT показало, что один вариант ВИЧ-1 объединился с кластером субтипа В, один – с кластером CRF63_02A1, оставшиеся исследованные варианты вируса распределились среди ВИЧ-1 субтипа А. По области IN наблюдалось следующее распределение изученных ВИЧ-1: 1 вариант относился к субтипу В; Tumen31, относящийся к субтипу А по области PR-RT, сгруппировался с CRF63_02A1, тогда как Tumen33, генотипированный по области PR-RT, как CRF63_02A1, вместе с оставшимися вариантами ВИЧ-1 принадлежал кластеру субтипа А ВИЧ-1. По области *env* подтвердилась топология для ВИЧ-1 субтипа В, оставшиеся варианты вируса были генотипированы как субтип А ВИЧ-1.

Интересно отметить, что филогенетический анализ позволил выявить несколько эпидемических сетей распространения ВИЧ-1. В частности, были обнаружены 6 пар генетически близких вариантов ВИЧ-1, достоверно объединявшихся на филогенетическом дереве, построенном на основе анализа PR-RT ВИЧ-1.

Суммируя результаты генотипирования, можно сделать заключение, что в Тюменской области по-прежнему доминирующим, определяющим развитие современной эпидемии, остается субтип А ВИЧ-1, распространенность которого регистрируется на уровне 95,5%, в группе риска МСМ продолжается циркуляция субтипа В ВИЧ-1, который был выявлен в одном случае (1,5%), и в двух случаях (3%) были выявлены уникальные рекомбинантные формы URF63_A1 ВИЧ-1, мозаичный геном которых был частично идентичен субтипу А, частично – CRF63_02A1. Такие URF63_A1 ВИЧ-1, так называемые вторичные рекомбинантные формы ВИЧ-1, могли возникнуть в организме лиц при повторном заражении разными генетическими вариантами (субтипа А и CRF63_02A1) ВИЧ-1. Ни один из данных пациентов не выезжал за территорию Тюменской области, из чего можно сделать предположение о циркуляции в Тюменской области генетических вариантов CRF63_02A1 либо URF63_A1 ВИЧ-1.

Для всех нуклеотидных последовательностей, кодирующих протеазу, ревертазу и интегразу выделенных вариантов ВИЧ-1, был проведен анализ наличия мутаций, влияющих на чувствительность к ИП, НИОТ, ННИОТ и ИИ. Среди циркулирующих в Тюменской области вариантов ВИЧ-1 были найдены лишь единичные случаи основных мутаций (с распространенностью 1,5–1,6%), определяющих резистентность ВИЧ-1 к ИП, ННИОТ и ИИ, что может являться благоприятным признаком современной территориальной эпидемии ВИЧ-инфекции. Вместе с тем среди изученных вариантов ВИЧ-1 с достаточно высокой частотой (в основном среди лиц, инфицированных в 2010–2015 гг.) встречались мутации, способные улучшать репродуктивные характеристики ВИЧ-1 в присутствии ИП/снижать

чувствительность к ИП (K20R, L10V, I, K20I и, возможно, T74S).

Предсказание тропности исследуемых ВИЧ-1, использования вирусных ко-рецепторов CCR5/CXCR4, осуществляли с помощью анализа полученных аминокислотных последовательностей петли V3 гена env ВИЧ-1. При исследовании тропности ВИЧ-1 нами были получены неожиданные результаты – выявлена высокая распространенность CXCR4-тропных вариантов среди ВИЧ-1, выделенных от лиц, инфицированных 1–5 лет назад (16,6%).

Выводы

Доминирующим на территории Тюменской области был и остается субтип А ВИЧ-1. К особенностям ВИЧ-1, распространяющихся после 2010 г., можно отнести более высокую частоту встречаемости вторичных мутаций, влияющих на фитнес ВИЧ-1 и впервые выявленную высокую распространенность CXCR4-тропных ВИЧ-1 среди недавно инфицированных лиц. Выявление у лиц, не выезжавших за пределы области, URF63_A1 ВИЧ-1 указывает на вероятность заноса на данную территорию новых, не распространявшихся ранее рекомбинантных геновариантов ВИЧ-1 (CRF63_02A1 либо URF63_A1).

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ СИБИРСКИХ ИЗОЛЯТОВ ПАРЭХОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА

И.В. Бабкин, Е.В. Жираковская, А.Ю. Тикунов, Н.В. Тикунова

*ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия*

Наибольшее распространение среди детей, особенно раннего возраста, имеют острые кишечные инфекции вирусной этиологии. Спектр известных вирусов, являющихся причиной вирусных гастроэнтеритов, довольно широк. Однако вклад многих патогенных гастровирусов человека часто не оценивается. Одним из вирусов, чей вклад в вирусные гастроэнтериты мало изучен, является парэховирус А, принадлежащий к роду *Parechovirus* семейства *Picornaviridae*. Внутри этого вида на сегодняшний день выделяют 16 генотипов. Впервые открытые парэховирусы 1-го и 2-го генотипа первоначально были названы эховирусами 22 и 23 соответственно и отнесены к роду энтеровирусов.

Наше исследование было посвящено выявлению и определению первичной структуры геномов сибирских изолятов парэховируса А. На первом этапе была проведена детекция парэховирусов с использованием вирусспецифичных праймеров, описанных в литературе ранее [1]. Затем было проведено секвенирование кодирующих последовательностей трех изолятов парэховирусов человека из 8 выявленных в г. Новосибирске. Для выполнения этой задачи был рассчитан уникальный набор праймеров с использованием ранее построенного выравнивания полногеномных последовательностей данного вируса из базы данных GenBank, содержащий 23 олигонуклеотида. Проведенное с их использованием секвенирование позволило впервые в России определить полные нуклеотидные последовательности изолятов парэховируса человека №№ 3567, 3623 и 3863. Полученные полногеномные последовательности были выровнены в программе Clustal. Затем выполнили филогенетический анализ данных методом максимального правдоподобия (рис. 1) с использованием родственных последовательностей из базы данных GenBank в программе MEGA 6.0.

В настоящее время известно 16 генотипов парэховируса человека. Из анализа построенной филограммы видно, что два изученных российских изолята относятся к генотипу 1 парэховируса человека, а один изолят – к генотипу 5 этого вируса. Сибирские изоляты генотипа 1 парэховируса демонстрировали наибольшее сходство с изолятом, выявленным ранее в Нидерландах в 2007 г., в то время как изученный нами изолят генотипа 5 демонстрировал наибольшее сходство с изолятом из Китая, обнаруженным в 2011 г. Можно предположить, что в Новосибирске циркулируют как европейские, так и азиатские штаммы парэховируса человека, относящиеся к различным генотипам.

На сегодняшний день генотипирование парэховирусов человека основано на последовательности гена структурного белка VP1, и такое отнесение, как правило, совпадает с генотипированием на базе района P1 вирусного генома, включающего последовательности трех структурных белков – VP0, VP3 и VP1. Это объясняется тем, что на филогенетических деревьях, построенных на основе других районов вирусного генома: P2, содержащего гены трех неструктурных белков (2 A–2 C), и P3, включающего гены четырех других неструктурных белков (3 A–3D), штаммы парэховирусов не группируются в соответствии с их генотипами. Это свидетельствует о значительной роли рекомбинации в эволюции этих вирусов. Филогенетический анализ подтверждает отнесение российских изолятов к генотипам 1 и 5 на основе как гена структурного белка VP1, так и района P1 вирусного генома. Для проведения этого анализа были построены элайменты соответствующих районов вирусного генома, и построенные филогении оказались идентичны.

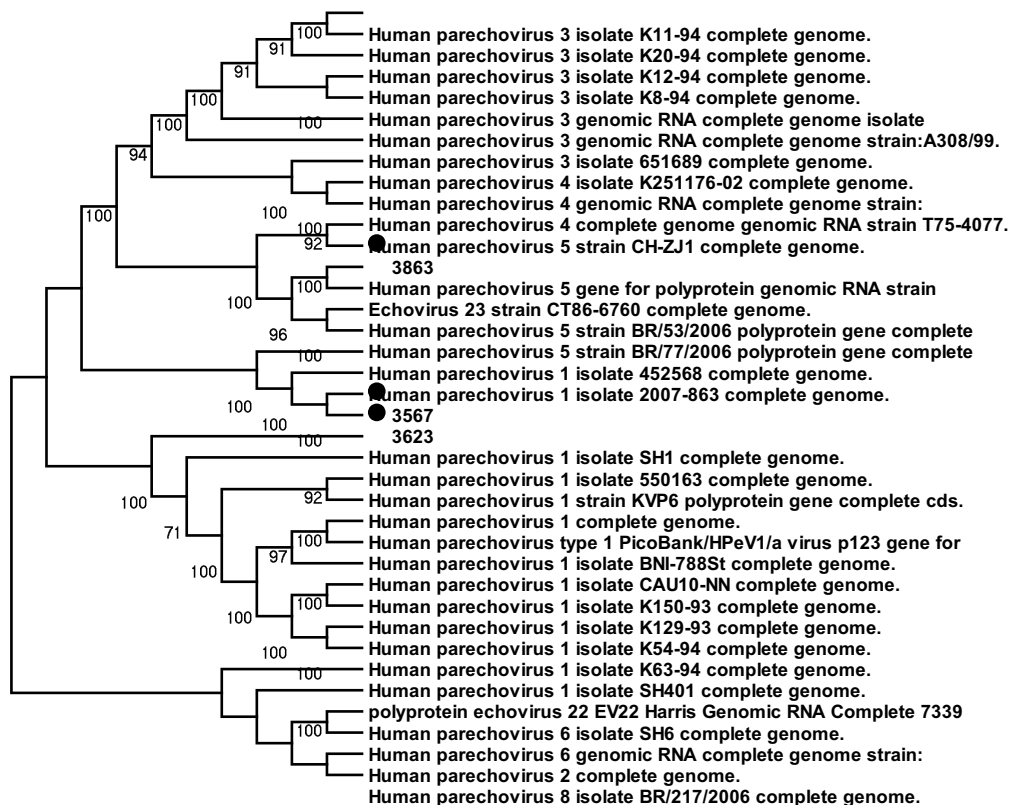
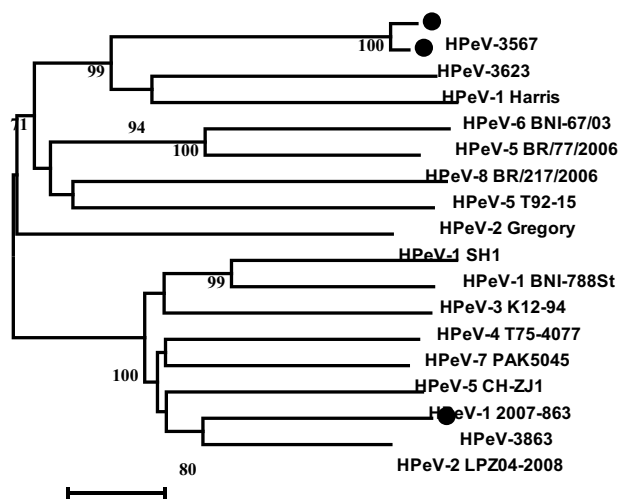


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании выравнивания нуклеотидных последовательностей полных геномов парэховируса человека. Последовательности изолятов, полученные в работе, выделены кружками. Статистическая значимость (значений, превышающих 70%) показана в узлах дерева.

Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия на основании выравнивания нуклеотидных последовательностей гена белка 3D парэховируса человека. Последовательности изолятов, полученные в работе, выделены кружками. Статистическая значимость (значений, превышающих 70%) показана в узлах дерева.



Для сравнительного изучения эволюции парэховирусов был выбран другой район вирусного генома, а именно ген белка вирусной полимеразы 3D (RdRp). Ген белка 3D относится к медленно и стабильно эволюционирующим под действием консервативной селекции генам и может служить маркером эволюционного развития вирусной популяции. На филогенетическом дереве гена RdRp (рис. 2) обнаруживается эволюционная близость новосибирских изолятов парэховируса 1 генотипа со штаммом Harris 1-го генотипа и штаммом BNI-67/03 6-го генотипа из Германии. При этом штамм Harris был открыт еще в 1956 г. и был первоначально классифицирован как вирус ЕСНО 22. Изолят 3863 парэховируса 5-го генотипа из Новосибирска наиболее близок к изоляту LPZ04-2008 парэховируса 2-го генотипа. Выявленные особенности кластеризации новосибирских изолятов парэховируса человека с использованием гена RdRp свидетельствуют о рекомбинационных событиях в эволюционной истории этих изолятов, при этом основная потенциальная точка рекомбинации находится между P1 и P2 районами вирусного генома.

В результате выполненного исследования впервые в России были получены и исследованы полные геномы трех новосибирских изолятов парэховируса человека, относящихся к двум различным генотипам. Установлено, что все изоляты произошли в результате рекомбинации и являются ранее не описанными рекомбинантными вариантами. Выявленные различия между новосибирскими изолятами, а также генетическая близость изолятов генотипа 1 к европейским штаммам, а изолята генотипа 5 к азиатским штаммам может свидетельствовать о том, что в перенос различных гастровирусов вносят вклад торговые связи, миграционные потоки и туризм.

Библиографический список

1.Зверев В.В., Голицына Л.Н., Фомина С.Г. и др. Генотипирование парэховирусов методом ПЦР // Медицинский альманах. – 2010. – № 2. – С. 260–262.

CRF63_02A1 ОПРЕДЕЛЯЕТ РАЗВИТИЕ ЭПИДЕМИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ

**Е.В. Власов¹, В.Р. Муранкина¹, В.В. Ивлев¹, А.В. Тотменин¹, М.П. Гашникова¹,
Л.В. Султанов², Н.М. Гашникова¹**

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²КГБУЗ «Алтайский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», Барнаул, Россия

По данным “Алтайского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями” на 01.01.2016 г. в Алтайском крае (АК) зарегистрировано 22 349 случаев ВИЧ-инфекции. По уровню пораженности ВИЧ-инфекцией из 12 территорий Сибирского федерального округа АК занимает четвертое рейтинговое место. Первый случай инфицирования был зарегистрирован в 1990 г., а в 2000–2001 гг. в АК произошел первый резкий скачок количества вновь выявленных случаев инфицирования. Второй период активизации эпидемии ВИЧ-инфекции был отмечен в 2008 г., связанный с распространением ВИЧ среди лиц, практикующих употребление наркотических средств. В 2014–2015 гг. на территории края также наблюдается рост заболеваемости, отчасти являющийся следствием более широкого охвата тестированием на ВИЧ-инфекцию ключевых групп населения.

Целью данной работы являлось изучить разнообразие генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории АК.

Материалом для данной работы послужили образцы плазмы крови от ВИЧ-положительных пациентов, впервые выявленных с ноября 2015 г. по январь 2016 г., собранные специалистами Алтайского краевого центра по профилактике и борьбе со СПИДом. Выделение РНК из отобранных образцов проводилось набором «ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» («Вектор-Бест», Россия), с использованием системы лабораторных праймеров и реагентов для постановки реакции ОТ и ПЦР («Биолабмикс», Россия) на-

рабатывались вирусспецифические фрагменты генома, кодирующие области гена pol (протеаза, ревертаза, интегразы) и область env (основной белок оболочки, env) ВИЧ-1. Расшифрованные нуклеотидные последовательности фрагментов генов pol и env сравнивали с референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamosHIV-1 database) с применением программ ClustalWMultiplealignment и BioEditsoftware 7.2.5. Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA 6.0.6., используя метод объединения ближайших соседей (neighbor-joining method, NJ) с бутстрепом 1,000 повторов на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов. Предсказание использования ко-рецепторов ВИЧ-1 проводили с помощью Position-SpecificScoringMatrix (PSSM) и geno2phenoco-receptor (g2p).

В исследование вовлечен 21 ВИЧ+ пациент с предполагаемым периодом инфицирования 2014–2015 гг, из них 52,4% женщин, 47,6% мужчин; 47,6% лиц инфицировано половым путем, 47,6% – при употреблении наркотических препаратов, для одного пути инфицирования не установлен. Средний возраст составил 33,5 лет (группа 23–55 лет), мужчин 10 (47,6%), женщин 11 (52,4%). Получены специфические фрагменты для 21 образца ВИЧ-1, в том числе: 19 для области протеазы-ревертазы, 20 – интегразы и 14 – env ВИЧ-1. Выявлено, что 17 (81%) образцов ВИЧ-1 относятся к циркулирующей рекомбинантной форме CRF63_02A1 ВИЧ-1, 14,3% вариантов ВИЧ-1 принадлежит к субтипу А и один вариант является уникальной рекомбинантной формой URF63_A1 ВИЧ-1 (4,8%) – частично геном этого вируса идентичен субтипу А, частично – CRF63_02A1. Анализ V-3 области гена env позволил определить, что абсолютное большинство ВИЧ-1 имеет CCR5 тропность, один из изученных вариантов ВИЧ-1 обладал двойной тропностью – CCR5/CXCR4. Анализ мутаций, связанных с резистентностью ВИЧ-1, выявил низкую распространенность первичной резистентности вируса – лишь один вариант ВИЧ-1 содержал основную мутацию K103N (4,8%). Важно отметить необычайно высокую распространенность мутации S153Y/F (вызывает снижение чувствительности вируса к EVG, DTG и RAL), которая была обнаружена в 23,8% исследованных вариантах ВИЧ-1.

Выводы. Эпидемиологическая ситуация в Алтайском крае соответствует общей для Сибирского федерального округа тенденции значительного увеличения среди циркулирующих вирусов доли CRF63_02A1 ВИЧ-1. К территориальной специфике эпидемии можно отнести высокую первичную распространенность вторичных мутаций устойчивости к ингибиторам интегразы ВИЧ-1.

ЭПИДЕМИЯ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В УЗБЕКИСТАНЕ – РАСПРОСТРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ И РЕЗИСТЕНТНЫХ ВИЧ-1

**Н.М. Гашникова¹, А.В. Тотменин¹, Е.М. Астахова¹, В.В. Ивлев¹, М.П. Гашникова¹,
Т.Р. Хегай², Ф.У. Шайимкулов², А.К. Байжано³, Т.У. Арипова²**

*¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²Институт иммунологии АН Республики
Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан; ³НИИ Вирусологии МЗ РУз, Ташкент,
Республика Узбекистан*

По данным Центра по борьбе со СПИД Республики Узбекистан на конец 2015 г. в стране было зарегистрировано 32 743 пациента с диагнозом ВИЧ, 57% из которых – мужчины. Большинство случаев заражения ВИЧ приходится на Ташкент, Ташкентскую, Андижанскую и Самаркандскую области. С 2010 г. в стране ежегодно выявляется около 4000 новых ВИЧ+ лиц, с каждым годом увеличивается число случаев регистрации ВИЧ-инфекции у трудовых мигрантов, вернувшихся из соседних стран: в 2012 г. среди мигрантов было зарегистрировано 272 новых случая ВИЧ, в 2013 г. таких случаев было 418, а за 10 месяцев 2014 г. среди вернувшихся на родину ВИЧ был выявлен у 531 человека. **Целью**

настоящего исследования явилось изучение современных молекулярно-эпидемических особенностей распространения ВИЧ-инфекции на территории Республики Узбекистан.

Материалы и методы. Клинические образцы крови от ВИЧ+ лиц были собраны специалистами Центра по борьбе со СПИД Республики Узбекистан в 2013 и 2015 гг. Для каждого образца отбирали плазму и выделяли фракцию периферических мононуклеарных клеток крови (МПК). В плазме крови определяли концентрацию РНК ВИЧ-1. В случае содержания вирусной РНК ниже 1000 копий/мл для выделения вирусных нуклеиновых кислот использовали МПК. Из плазмы/клеток крови по стандартным методикам выделяли РНК/ДНК ВИЧ-1. Генотипирование вариантов ВИЧ-1, филогенетический анализ и анализ наличия мутаций, связанных с резистентностью, проводили по трем областям вирусного генома: по областям гена *pol*, кодирующим протеазу и обратную транскриптазу (PRO-REV), интегразу (IN) и основной белок оболочки (ген *env*) ВИЧ-1.

Результаты. Проведен сбор образцов периферической крови и клинико-эпидемических данных для 65 ВИЧ-инфицированных жителей Ташкента, наиболее пораженной ВИЧ-1 территории Республики Узбекистан: 35 образцов в 2013 г., 30 – в 2015 г. Выборка вовлеченных в исследование пациентов включала 54,2% мужчин и 45,8% женщин. 7 человек (11,1%) сообщили о выездах за рубеж. Для 84,6% лиц был выявлен предполагаемый период инфицирования: в 2004 г. – 3,1%, в 2007–2009 гг. – 33,8%, в 2010–2015 гг. – 47,7%. Из 35 образцов 2013 г. 12 были получены от пациентов, получавших АРВТ (34,3%), 23 – от наивных пациентов (65,7%), а из 30 пациентов, вовлеченных в исследование в 2015 г., 20 (57,1%) получали АРВТ.

Анализ ВИЧ-1, выделенных в Узбекистане, показал, что на данной территории преимущественно циркулируют генетические варианты ВИЧ-1, входящие в филогенетический кластер среднеазиатской циркулирующей рекомбинантной формы CRF02_AG ВИЧ-1 (выявлены в 66,2% случаев). ВИЧ-1 субтипа А были выделены в 18,5%, а в 15,3% случаев регистрировалось инфицирование уникальными рекомбинантными формами ВИЧ-1. В том числе у 6-и пациентов (9,2%) была выделена URF02_A1 (вирусы имели мозаичный геном, частично идентичный последовательности CRF02_AG, частично субтипу А1 ВИЧ-1), у 3-х – URF63_A1 (4,6%, прародительские вирусы CRF63_02A1 и А1 ВИЧ-1), и в одном случае для ВИЧ-1 удалось проанализировать только область PR-RT, которая имела максимальную идентичность с последовательностью субтипов А1 и G ВИЧ-1 (1,5%). Среди 7 человек, выезжавших в течение предполагаемого периода заражения за территорию Республики Узбекистан, в одном случае был выделен ВИЧ-1 субтипа А, в остальных – вирусы CRF02_AG.

Анализ распределения геновариантов ВИЧ-1 в зависимости от времени инфицирования позволил выявить, что у 2-х лиц, инфицированных в 2004 г., была выявлена CRF02_AG ВИЧ-1; в группе лиц, инфицированных с 2007 по 2009 гг., в 68,2% выделена CRF02_AG ВИЧ-1, в 12,5% – субтип А, и в 16,7% ВИЧ-инфекция была вызвана заражением различными URF ВИЧ-1.

Для лиц, инфицированных в период с 2010 по 2015 гг., наблюдалось следующее распределение геновариантов ВИЧ-1: CRF02_AG – 71%, субтип А – 22,6%, URF ВИЧ-1 – 6,5%. Интересно отметить, что в одном случае от мужчины 31 года с впервые выявленной ВИЧ-инфекцией в 2015 г. была выделена URF02_A1, имеющая высокую степень идентичности по всем исследованным областям генома (PR-RT, IN, *env*) с URF02_AG ВИЧ-1, выделенной от человека, имеющего ВИЧ+ диагноз с 2012 г., что может указывать на развитие внутренних эпидемических сетей.

Среди лиц, принимающих АРВП, в 34,4% случаев были выявлены мутации, определяющие резистентность к антиретровирусным препаратам, в том числе в 25% случаев к ННИОТ, в 25% случаев к НИОТ, в двух случаях была обнаружена полирезистентность к НИОТ и ННИОТ. Среди лиц, принимавших АРВП, обследованных в 2015 г., мутации, связанные с резистентностью вируса к АРВП, были найдены лишь у 20% лиц, находящихся на терапии. Важно, что у наивных пациентов, включенных в исследование, не было выявлено резистентных к АРВП вариантов ВИЧ-1.

Выводы. Выполненный в данной работе анализ развития эпидемии ВИЧ-инфекции в Республике Узбекистан показывает, что для современной эпидемии характерно доминирование циркулирующей рекомбинантной формы CRF02_AG ВИЧ-1. Субтип А, определявший развитие эпидемии на её начальном этапе, продолжает распространяться и, возможно, эпизодически завозится из соседних территорий, в том числе и из России. Выявленные единичные случаи инфицирования жителей Ташкента вариантами URF63_A1 ВИЧ-1, специфическими для Сибирского региона России, подтверждают факт

циркуляции в Республике Узбекистан новых для данной территории генетических вариантов ВИЧ-1. Однако выделение в большинстве случаев у вернувшихся с других территорий трудовых мигрантов вариантов CRF02_AG ВИЧ-1 (этот вариант ВИЧ-1 широко распространен в государствах Средней Азии и лишь эпизодически выявляется в РФ) может говорить о том, что больше экспорт ВИЧ-инфекции осуществляется с территорий сопредельных стран. Высокая распространенность CRF02_AG и уникальных рекомбинантных форм вируса говорит о развитии собственного очага ВИЧ-инфекции, сформировавшегося в начале эпидемии в 2000-х. Выделение резистентных вариантов ВИЧ-1 от пациентов, находящихся на АРВТ, указывает на актуальность внедрения в клиническую практику методов генотипирования лекарственной устойчивости ВИЧ-1.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВИЧ-1, РАСПРОСТРАНЯЮЩИХСЯ В КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Д.П. Зырянова¹, А.В. Тотменин¹, Е.М. Астахова¹, В.В. Ивлева¹, М.П. Гашникова¹,
П.И. Поздняков¹, Н.В. Москалева², С.С. Айкин², Т.Н. Булатова², Н.М. Гашникова¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ГБУЗ Кемеровской области
«Кемеровский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными
заболеваниями», Кемерово, Россия

На протяжении последних пяти лет Кемеровская область (КО) не уступает лидирующую позицию – первое место среди регионов России по числу новых выявленных случаев ВИЧ-инфекции на 100 тысяч населения. На январь 2016 г. в КО общее число ВИЧ-инфицированных лиц достигло 49 517 человек. Основными путями распространения ВИЧ-инфекции в 2015 г. стали введение наркотиков внутривенно (49,6%) и половой путь (49,0%), передача вируса от матери к ребенку регистрировалась на уровне 1,4%. Распространенность ВИЧ-1 в КО на начало 2016 г. достигла 1402,7 на 100 тысяч населения, что значительно превышает средний показатель по России (541,8). Принимая во внимание высокие темпы распространения ВИЧ-1 и существенное изменение молекулярно-эпидемической ситуации по ВИЧ-инфекции в граничащих с КО Новосибирской и Томской областях, представлялось важным изучить вклад отдельных генетических вариантов ВИЧ-1 в развитие данной территориальной эпидемии.

Материалы и методы. В исследование были вовлечены 99 человек, проживающих в КО: 46 образцов периферической крови от ВИЧ-инфицированных лиц собрано в 2007–2009 гг., 53 клинических образца – от впервые выявленных в 2015 г. ВИЧ+ лиц. Демографические и эпидемиологические данные пациентов были получены при индивидуальной беседе с профессиональным эпидемиологом. Вирусная РНК была изолирована из плазмы. Амплификацию проводили с применением лиофилизированных наборов МастерМикс РТ (Вектор-Бест, Россия), содержащих компоненты РТ и ПЦР с добавлением разработанного лабораторного набора праймеров, позволяющих получить для каждого клинического образца два фрагмента гена *pol*, кодирующие область протеазы-ревертазы, область интегразы и фрагмент, кодирующий участок основного белка оболочки вируса – *env*. Собранные последовательности фрагментов *pol* (PR-RT, IN) и области гена *env* сравнивали с соответствующими референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamosHIV-1 database) с применением программ ClustalWMultiplealignment и BioEditsoftware 7.2.5. Новые рекомбинантные последовательности между субтипами или CRF были проанализированы с помощью программ идентификации рекомбинации (RIP <http://www.hiv.lanl.gov>), и SimPlot 3.5.1, используя окно 200 нуклеотидов и построением филогенетического дерева NJ, используя двухпараметрическую модель Кимуры. С помощью интернет-ресурса jPHMM (http://jphmm.gobics.de/submission_hiv.html) были исследованы возможные мозаичные последовательности и выявлены уникальные рекомбинантные (URF) вирусы.

Результаты. В период 2007–2009 гг. выполнены ограниченные исследования циркулирующих в КО ВИЧ-1, связанные с анализом резистентности вируса и проведением эпидемических исследований (46 исследований ВИЧ-1), по результатам которых варианты ВИЧ-1 в абсолютном большинстве были отнесены к субтипу А ВИЧ-1, в трех случаях выявлялся субтип В ВИЧ-1. Исследованные нами в 2007–2009 гг. варианты ВИЧ-1 субтипа А имели характерные полиморфные мутации, что указывало на развитие собственного очага территориальной эпидемии, отличной от эпидемий ВИЧ-инфекции, развивающихся в Новосибирской и Томской областях.

Из клинических образцов, собранных в 2015 г., были получены образцы ВИЧ-1 и проанализированы клинико-эпидемические данные 53 человек: 31 (55,6%) мужчины и 22 (44,4%) женщин, средний возраст пациентов был 34,1 (21–60 лет); 62,3% сообщили об употреблении инъекционных наркотиков (ПИН), 37,7% были инфицированы при гетеросексуальных контактах. Среди группы лиц ПИН в 44,1% случаев наряду с героином/ханкой использовались соли и/или синтетические психостимуляторы. Эпидемическое расследование позволило заключить, что для 36 (67,9%) пациентов предполагаемый период инфицирования включал 2012–2015 гг. Анализ клинических данных позволил определить медиану показателей вирусной нагрузки и количества клеток CD4+: 1.3×10^5 (1.2×10^2 – 2.6×10^6) копий/мл и 333.27 (81–731) клеток/мкл соответственно. Анализ эпидемических данных пациентов, вовлеченных в исследование, позволил заключить, что данная выборка достаточно корректно отражает характеристики современной эпидемии ВИЧ-инфекции в КО.

Филогенетический анализ выделенных из клинических образцов ВИЧ-1 выявил следующее. По области PR-RT 5 вариантов ВИЧ-1 объединились с кластером субтипа А, 38 – вошли в кластер CRF63_02A1 и 7 вариантов вируса располагались между данными кластерами. По области IN наблюдалось следующее распределение геновариантов: 8 ВИЧ-1 субтипа А, 39 – CRF63_02A1, 4 варианта вируса не идентифицировано, располагаются между кластерами; по области env – 9 ВИЧ-1 относится к субтипу А, 35 – CRF63_02A1 и 2 варианта ВИЧ-1 не идентифицировано. Для вариантов ВИЧ-1, находящихся между кластерами субтипа А и CRF63_02A1, дополнительно был выполнен рекомбинационный анализ.

В качестве референсных последовательностей сравнения были выбраны все основные субтипы и рекомбинантные формы ВИЧ-1, включая CRF63_02A1. Бутскан-анализ, проведенный для всех некластеризованных нуклеотидных последовательностей областей pol (PR-RT, IN) и env вариантов ВИЧ-1, выявил во всех случаях мозаичные структуры ВИЧ-1, частично идентичные субтипу А, частично – CRF63_02A1.

В итоге проведение филогенетического и рекомбинационного анализов для трех областей генома показало, что среди 53 исследованных ВИЧ-1 38 вариантов являлись недавно возникшей рекомбинантной формой CRF63_02A1 (71,7%), в 4-х образцах был выделен субтип А (7,5%) ВИЧ-1 и в 11 (20,8%) случаях обнаружены уникальные рекомбинантные формы вируса, обозначенные нами URF63_A1, так как геномы этих вирусных вариантов имели мозаичную структуру.

Определение тропности исследуемых ВИЧ-1 осуществляли с помощью анализа полученных последовательностей петли V3 гена env программами Geno2pheno 2.5 и WebPSSM. В 5-ти случаях среди исследованных вариантов CRF63_02A1 и у одного варианта URF63_A1 были обнаружены вирусы, имеющие CXCR4 тропность (9,4%), остальные варианты были определены как CCR5-тропные ВИЧ-1. В 4-х из пяти случаев CXCR4 ВИЧ-1 были выделены у женщин, инфицированных при гетеросексуальных контактах, не имеющих практики употребления наркотических препаратов, длительность заболевания составляла от 6 месяцев до 5 лет.

Суммарный анализ генотипа ВИЧ-1 и клинико-эпидемических данных пациентов показал, что CRF63_02A1 выявляется среди всех категорий населения КО, субтип А ВИЧ-1 в трех из четырех выявленных случаев выделен от лиц, инфицированных при гетеросексуальных контактах. URF63_A1 ВИЧ-1 выявлены в 81,8% случаев среди ПИН, 55,6% из которых практикуют употребление разных наркотических средств, включая синтетические психотропные препараты. Для лиц, инфицированных субтипом А ВИЧ-1, регистрировался более высокий уровень CD4+ клеток, а для группы лиц, где обнаружены CXCR4-тропные варианты, были характерны наиболее низкие показатели количества CD4+ клеток.

Выводы. Основные вспышки эпидемии 2001, 2008 и 2012 гг. сопровождалась резким ростом инфицирования в группе ПИН. Начиная с 2000-х эпидемия в КО постоянно подпитывалась от одной

из крупнейших российских вспышек распространения ВИЧ в Иркутске, в результате чего в КО получил широкое распространение в группе потребителей наркотиков субтип А ВИЧ-1. В 2006–2007 гг. наблюдалась некоторая стабилизация эпидпроцесса, преобладающим был половой путь передачи вируса. С 2008 и с 2012 гг. вновь в связи с ростом наркомании, с увеличением доступности наркотических препаратов вновь происходит активизация эпидемии среди ПИН. Вероятно, на изменение характера эпидемии в КО после 2010 г. повлияло и активное распространение в Новосибирской области нового геноварианта CRF63_02A1 ВИЧ-1, где после 2009 г. именно этот вариант ВИЧ стал почти полностью доминировать в группе ПИН. Параллельная циркуляция на территории КО разных генетических вариантов ВИЧ-1, высокая распространенность полинаркомании, пораженность потребителей наркотиков ВИЧ-1, активное распространение ВИЧ среди взрослого населения области половым путем – все это создало необходимые и достаточные условия для повторного заражения ВИЧ с последующей возможностью рекомбинационных событий среди генетических вариантов ВИЧ-1. Этим можно объяснить то, что в 2015 г. практически каждый пятый случай инфицирования ВИЧ-1 в КО произошел в результате заражения новым, уникальным вариантом ВИЧ-1 (который образовался при суперинфекции у выявленного ВИЧ+ лица либо был образован в организме донора ВИЧ). Труднее поддается объяснению смена доминирующего генетического варианта – почему вирус субтипа А, давно и активно распространявшийся среди ПИН, в течение короткого промежутка времени был замещен CRF63_02A1 ВИЧ-1. Нужно отметить, что вспышки распространения CRF63_02A1 ВИЧ-1 в 2007–2009 гг. в Новосибирской области, в 2013–2014 гг. в Томской области, в отличие от КО, начинались на фоне достаточно низкой пораженности населения ВИЧ-1 субтипа А. CRF63_02A1 ВИЧ-1 распространился среди населения всех исследованных областей буквально в течение двух-трех лет, вытеснив доминировавший ранее субтип А ВИЧ-1.

Выводы. КО – очередная территория Сибирского федерального округа (СФО), где развивается новая эпидемия ВИЧ-инфекции, основной чертой которой является доминирование CRF63_02A1 и возникновение уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1. Очень высокая частота появления новых генетических вариантов ВИЧ-1 может стать дополнительным фактором, «усугубляющим» как территориальную, так и общероссийскую эпидемию, поэтому необходимо периодически контролировать молекулярно-эпидемиологическую ситуацию по распространению ВИЧ-1 в КО. Активное распространение на территориях СФО CRF63_02A1 ВИЧ-1 и URF на основе этого генетического варианта указывает на необходимость углубленного исследования биологии данного вируса и патогенеза вызываемого им заболевания.

СУБТИП-СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ОБЛАСТИ ГЕНА *pol*, КОДИРУЮЩЕЙ ИНТЕГРАЗУ ВИЧ-1

**В.В. Ивлев, Е.М. Астахова, Д.П. Зырянова, Е.В. Власов, В.Р. Муранкина,
М.П. Гашникова, А.В. Тотменин, Н.М. Гашникова**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Одну из важнейших стадий репликации ВИЧ-1 – интеграцию ДНК-копии вируса в клеточную ДНК катализирует вирусный фермент интегразы. В то же время интегразы ВИЧ-1 не имеет гомологов в клетке и в силу этого служит привлекательной мишенью для создания антиретровирусных препаратов. Хотя известно, что все ретровирусные интегразы высоко консервативны и обладают гомологией между собой, все же присутствует определенная генетическая гетерогенность в этой области генома ВИЧ-1.

Целью данной работы было изучение генетической гетерогенности и натурального полиморфизма области генома ВИЧ-1, кодирующей интегразу вируса современных генетических вариантов ВИЧ-1, распространяющихся на территориях России.

Материалы и методы. Клинические образцы плазмы крови были собраны от лиц с ВИЧ-инфекцией, проживающих на территориях Сибирского и Уральского регионов России и в Республике Узбекистан, в 2014–2016 гг. Среди пациентов, привлеченных к исследованию, 98% не имели опыта применения в схемах антиретровирусной терапии ингибиторов интегразы ВИЧ-1. Из плазмы крови по стандартным методикам выделяли РНК ВИЧ-1. Генотипирование вариантов ВИЧ-1 проводили минимум по двум областям генома, кодирующим последовательности генов белков протеазы-ревертазы/интегразы/основного белка оболочки вируса. Определение нуклеотидной последовательности осуществлялось на автоматическом секвенаторе с последующей обработкой первичных данных секвенирования в программе Sequencher 4.1.4 (GeneCodes, США). Филогенетический анализ выполняли с помощью программы “MEGA”, версия 4.1, путем построения филогенетических деревьев методом ближайших соседей. Нуклеотидные дистанции рассчитывали по методу Кимуры. В качестве референс-последовательностей использовали ранее охарактеризованные последовательности субтипов и групп ВИЧ-1 из международной базы данных (GenBank). Выявление мутаций устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы проводили с помощью online-программы HIVdbProgram Стэнфордского университета (version 6.3.1, <http://hivdb.stanford.edu>).

Результаты. Проведен анализ 165 вариантов ВИЧ-1, выделенных из клинических образцов плазмы, собранных в 2014–2016 гг. от инфицированных пациентов РФ и Республики Узбекистан. На основании данных, полученных в результате секвенирования участка гена *pol*, кодирующего интегразу ВИЧ-1, осуществлен углубленный анализ, включающий выявление филогенетических отношений, мутаций, отвечающих за чувствительность ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы, изучены территориальные особенности и исследован субтип-специфический полиморфизм нуклеотидных и аминокислотных последовательностей интегразы вируса.

В результате работы выявлен натуральный полиморфизм области интегразы ВИЧ-1, специфичный для современных циркулирующих вариантов ВИЧ-1 субтипа А, CRF02_AG и CRF63_02A1. Показано, что характерными для CRF02_AG ВИЧ-1 являются мутации T206S, K136T, L101I, I135V, S283G, R269K и D288N, которые распространены среди данного генетического варианта более 90% и практически не выявляются среди ВИЧ-1 субтипа А. Среди вариантов ВИЧ-1 субтипа А более чем в 90% образцов были выявлены мутации D167E, L74I и I72V.

Субтип А и CRF02_AG ВИЧ-1 являются прародительскими вариантами для CRF63_02 A1, и соответственно по ряду специфических позиций в последовательности, кодирующей область интегразы вируса, эти генетические варианты ВИЧ-1 имеют аналогичные замены. Тем не менее большой массив изученных данных нуклеотидных последовательностей интегразы позволил обнаружить мутации, маркерные именно для CRF63_02A1 – E11D и S24N.

Несмотря на то что CRF63_02 A1 ВИЧ-1 возникла совсем недавно, этот генетический вариант ВИЧ-1 на отдельных территориях Сибирского региона является доминирующим на современном этапе развития эпидемии. Более того, именно этот вирус вызвал «вспышку» эпидемии в Томской, Новосибирской областях, им инфицирована большая часть ВИЧ+ лиц, проживающих на данных территориях. Возможно, заносом отдельных вариантов ВИЧ-1 и их быстрым распространением на ограниченных территориях можно объяснить выявляемую региональную специфику вируса. Например, только среди CRF63_02 A1 ВИЧ-1, циркулирующих в Томской области, регистрируются I208L и M50T. Важно отметить необычайно высокую распространенность мутации S153Y/F (вызывает снижение чувствительности вируса к EVG, DTG и RAL), которая была обнаружена в 23,8% исследованных вариантах ВИЧ-1, выделенных от жителей Алтайского края.

Интересно отметить, что в нашей случайной выборке присутствовали люди, инфицированные ВИЧ-1 субтипа В в Сибирском регионе, во Владивостоке и в Краснодарском крае. Никто из этих лиц, наивных или находящихся на терапии, ингибиторы интегразы не принимал. При этом ВИЧ-1, выделенные у данных лиц, в 50% случаев имели мутации, определяющие снижение уровня чувствительности к препаратам данного класса (G163R, E157Q, Y143S). Кроме мутаций, непосредственно определяющих пониженный уровень чувствительности ВИЧ-1 к ингибиторам интегразы, в большом количестве у исследованных вариантов ВИЧ-1 выявлялись вторичные, акцессорные мутации, способные опосредованно снижать эффективность действия анти-ВИЧ препаратов. Обращает на себя внимание замена L74I. Данная мутация относится к акцессорной группе мутаций, по информации интернет-ресурса

Стэнфордского университета, данная мутация может выявляться у 23% наивных пациентов, инфицированных субтипом А ВИЧ-1. В нашем исследовании L74I была выявлена в 100% случаев среди вариантов субтипа А и CRF63_02A1/A, область интегразы которых хотя бы частично была идентична консенсусной последовательности субтипа А ВИЧ-1. При этом среди вариантов CRF63_02A1 L74I встречалась лишь в единичных случаях.

Выводы. В связи с тем что доминирующим в ряде современных территориальных эпидемий является новый, недавно возникший вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1, полученные в работе данные по особенностям нуклеотидной последовательности генома таких вирусов являются новыми и актуальными. Интерес также представляет выявленный натуральный полиморфизм ВИЧ-1, специфичный для современных вариантов субтипа А и CRF02_AG ВИЧ-1. Особо значимыми для практической медицины представляются данные о зарегистрированной распространенности первичной лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к препаратам класса ингибиторов интегразы.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РИККЕТСИЙ, ПЕРЕНОСИМЫХ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ НА ТЕРРИТОРИИ ДАЛЬНОГО ВОСТОКА

**Я.П. Иголкина¹, В.А. Рар¹, Т.И. Епихин¹, А.Ю. Тикунов¹, Е.И. Бондаренко²,
Н.П. Высочина³, Н.М. Пуховская³, Л.И. Иванов³, Н.В. Тикунова¹**

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

²ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск; ³ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция»
Роспотребнадзора, Хабаровск, Россия

Клещевые риккетсиозы являются распространенными заболеваниями в ряде регионов России [1]. На Дальнем Востоке циркулируют два вида патогенных риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ): *Rickettsia sibirica* – этиологический агент сибирского клещевого тифа и *Rickettsia heilongjiangensis* – этиологический агент дальневосточного клещевого риккетсиоза [2]. Клинические проявления этих заболеваний включают лихорадку, головную и мышечную боль, сыпь, первичный аффект на месте укуса. Кроме того, на Дальнем Востоке выявляются и другие виды риккетсий группы КПЛ: *Rickettsia raoultii* и *Rickettsia helvetica*, а также *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* из группы *Rickettsia canadensis* [3, 4]. Вышеперечисленные виды риккетсий ранее считали непатогенными, однако в последнее время ДНК *R. raoultii*, *R. helvetica* и *Ca. R. tarasevichiae* была выявлена в образцах крови и первичных аффектов пациентов на территории Европы и Китая [5–7]. На территории России риккетсиозы, вызванные данными видами риккетсий, не были зарегистрированы. Помимо общепризнанных видов за последнее время молекулярно-генетическими методами был обнаружен ряд генетических вариантов риккетсий. Так, в Хабаровском крае в клещах *Haemaphysalis japonica* обнаружен новый геновариант риккетсий, названный *Candidatus Rickettsia principis* [8]. Кроме того, в клеще *Haemaphysalis concinna* с Дальнего Востока был выявлен новый геновариант риккетсий, названный *Candidatus Rickettsia rara* (GenBank DQ365805).

Цель данной работы – изучение распространения и генетического разнообразия переносимых иксодовыми клещами риккетсий в различных видах клещей, собранных на Дальнем Востоке.

Было проанализировано 1114 голодных клещей: *Dermacentor silvarum* (n=113), *Ixodes persulcatus* (n=604), *H. concinna* (n=236) и *H. japonica* (n=161), собранных в 2006–2011 гг. в смешанных лесах на восьми участках Дальнего Востока. Семь участков были расположены на материке (Хабаровский край и Амурская область) и один участок – на острове Сахалин. ДНК риккетсий выявляли методом ПЦР в реальном времени (набор «РеалБест ДНК *Rickettsia spp.*») и/или методом двухраундовой ПЦР с праймерами из области гена *gltA*. Определение видовой принадлежности выявленных риккетсий в случаях инфицирования как одним, так и несколькими видами одновременно проводили методом

двухраундовой ПЦР с видоспецифичными праймерами и секвенированием. В работе использовали праймеры из области гена *gltA* специфичные к *Ca. Rickettsia tarasevichiae* и специфичные к риккетсиям группы КПЛ; праймеры из области гена *ompB*, специфичные к *R. helvetica*; праймеры из области гена *ompA*, специфичные к *R. raoultii* (9).

В клещах *D. silvarum* был выявлен только вид *R. raoultii* с уровнем инфицирования 57,8–60,0% на разных участках (табл.). В клещах *H. japonica* были обнаружены *Ca. R. principis* (5,9%), *R. heilongjiangensis* (1,2–11,8%), *R. raoultii* (2,4–5,9%) и *Ca. R. tarasevichiae* (1,2–11,8%). В клещах *H. concinna* выявляли *R. heilongjiangensis* (1,2–33,3%), *Ca. R. rara* (3,6–8,0%), *Ca. R. tarasevichiae* (12,0%), а также в единичных случаях *R. raoultii* и *R. sibirica* (табл.).

Таблица.

Выявление ДНК риккетсий в клещах

Место сбора	Виды клещей	Число положительных /исследованных клещей	
		Всего риккетсий	Результаты генотипирования
Хабаровский край Бикинский район	<i>I. persulcatus</i> <i>H. concinna</i> <i>H. japonica</i> <i>D. silvarum</i>	78/100 1/3 1/42 18/30	78/100 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/3 <i>Ca. R. principis</i> 1/42 <i>R. heilongjiangensis</i> 18/30 <i>R. raoultii</i>
Хабаровский край с. Чичаговка	<i>I. persulcatus</i> <i>H. concinna</i> <i>H. japonica</i>	24/31 0/5 4/17	23/31 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/31 <i>R. helvetica</i> - 1/17 <i>Ca. R. principis</i> 1/17 <i>R. raoultii</i> 2/17 <i>Ca. R. tarasevichiae</i>
Хабаровский край с. Сарапульское	<i>I. persulcatus</i> <i>H. concinna</i> <i>H. japonica</i>	75/100 9/27 4/17	68/100 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/100 <i>R. heilongjiangensis</i> 6/100 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> + <i>R. heilongjiangensis</i> 9/27 <i>R. heilongjiangensis</i> 1/17 <i>Ca. R. principis</i> 2/17 <i>R. heilongjiangensis</i> 1/17 <i>Ca. R. tarasevichiae</i>
Хабаровский край Ванинский район	<i>I. persulcatus</i>	214/236	187/236 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/236 <i>R. helvetica</i> 8/236 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> + <i>R. helvetica</i> 18/236 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> + <i>R. heilongjiangensis</i>
Хабаровский край Большехехцирский заповедник	<i>H. concinna</i> <i>H. japonica</i> <i>D. silvarum</i>	8/25 9/85 48/83	3/25 <i>R. heilongjiangensis</i> 2/25 <i>Ca. R. rara</i> 2/25 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/25 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> + <i>R. raoultii</i> 5/85 <i>Ca. R. principis</i> 1/85 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 1/85 <i>R. heilongjiangensis</i> 2/85 <i>R. raoultii</i> 48/83 <i>R. raoultii</i>
Амурская область, Магдагачинский район	<i>H. concinna</i>	5/84	1/84 <i>R. heilongjiangensis</i> 3/84 <i>Ca. R. rara</i> 1/84 <i>R. sibirica</i>
Амурская область, Архаринский район	<i>H. concinna</i>	9/92	9/92 <i>R. heilongjiangensis</i>
Сахалинская область	<i>I. persulcatus</i>	93/137	6/137 <i>Ca. R. tarasevichiae</i> 87/137 <i>R. helvetica</i>

В клещах *I. persulcatus* на изученных участках материковой части Дальнего Востока преобладал вид *Ca. R. tarasevichiae* (74,0–85,1%), в то время как вид *R. helvetica* выявлялся в единичных случаях (табл.). Эти результаты подтверждают данные других авторов, исследовавших клещей *I. persulcatus* в

разных областях азиатской части России [3, 4]. Однако проведенное нами исследование показало, что на острове Сахалин в клещах *I. persulcatus* преобладающим видом риккетсий являлся вид *R. helvetica* (>60% исследованных клещей), а не *Ca. R. tarasevichiae*. Охарактеризованные по генам *gltA* и *ompB* образцы *Ca. R. tarasevichiae* и *R. helvetica* с острова и материковой части Дальнего Востока были идентичны между собой. Можно предположить, что наиболее вероятной причиной различия видовой структуры риккетсий на Сахалине по сравнению с другими территориями России является географическая изоляция острова.

Таким образом, было подтверждено, что на территории Дальнего Востока в клещах *Haemaphysalis* spp. циркулируют патогенные виды риккетсий *R. heilongjiangensis* и *R. sibirica*. Впервые в клещах *I. persulcatus* был выявлен вид *R. heilongjiangensis*. Был показан высокий уровень инфицирования клещей *D. silvarum* риккетсиями *R. raoultii*, а клещей *I. persulcatus* - *Ca. R. tarasevichiae* (на территории Хабаровского края и Амурской области) и *R. helvetica* (на острове Сахалин). Использование ПЦР с видоспецифичными праймерами позволило выявить случаи микстинфицирования клещей разными видами риккетсий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки (проект VI.55.1.1).

Библиографический список

1. Рудаков Н.В., Шпынов С.Н., Самойленко И.Е., Оберт А.С. Клещевой риккетсиоз и риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки в России.— Омск, 2011.
2. Mediannikov O.Y., Sidelnikov Y., Ivanov L. et al. Acute tick-borne rickettsiosis caused by *Rickettsia heilongjiangensis* in Russian Far East. // Emerg. Infect. Dis.— 2004. — Vol. 10.— P. 810–817.
3. Пуховская Н.М., Пар В.А., Иванов Л.И. и др. Выявление методом ПЦР возбудителей природно-очаговых инфекций, переносимых клещами, на полуострове Камчатке // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. —2010.— № 4.—С. 36–39.
4. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N. et al. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 2006.— Vol. 1078. — P. 378–383.
5. Nilsson K., Elfving K., Pahlson C. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006 // Emerg. Infect. Dis. —2010. — Vol. 16. —P. 490–492.
6. Jia N., Zheng Y.C., Ma L. et al. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China // Emerg. Infect. Dis. — 2014.— Vol. 20. —P. 866–868.
7. Jia N., Zheng Y.C., Jiang J.F., Cao W.C. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* // N. Engl. J. Med. —2013.— Vol. 369. — P. 1178–1180.
8. Mediannikov O., Sidelnikov Y., Ivanov L. et al. Far eastern tick-borne rickettsiosis: identification of two new cases and tick vector // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2006. Vol. 1078.— P. 80–88.
9. Igolkina Y.P., Rar V.A., Yakimenko V.V. et al. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Ixodes persulcatus*/*Ixodes trianguliceps* sympatric areas from Western Siberia, Russia: Identification of a new *Candidatus Rickettsia* species // Infect. Genet. Evol. —2015. — Vol. 34. —P. 88–93.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА

Д.А. Ковалев, И.В. Кузнецова, Ю.М. Евченко, Л.И. Шакирова, Н.М. Швецова,
Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Бруцеллез – инфекционно-аллергический зооноз, относящийся к особо опасным инфекциям и являющийся одним из наиболее распространенных в мире. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации продолжает оставаться неблагополучной в некоторых регионах. По данным Роспотребнадзора Северо-Кавказский федеральный округ является лидирующим субъектом не только по количеству случаев заболеваемости людей бруцеллезом, но и по количеству случаев регистрации бруцеллеза у животных [1].

В настоящее время в мировой практике для анализа геномного полиморфизма возбудителя бруцеллеза широкое применение получил многолокусный анализ вариабельных tandemных повторов (Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats Analysis – MLVA) как в качестве самостоятельного, так и в сочетании с другими методами генетического типирования [2].

Целью данной работы было изучение генетического разнообразия штаммов возбудителя бруцеллеза разных видов, изолированных от людей и мелких млекопитающих животных на территории Северо-Кавказского федерального округа методом MLVA-14, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем и объектом выделения.

В работе были использованы 64 штамма *B. suis*, выделенные от мелких млекопитающих (61 штамм) и сельскохозяйственных животных (3 штамма) и 27 штаммов (24 штамма *B. melitensis*, 2 – *B. abortus* и 1 – *B. suis*), изолированные от больных людей. Штаммы *B. suis* (биовары 1, 5) выделены из образцов полевого материала, собранного на территории Ставропольского края, Республики Северная Осетия–Алания (РСО), Чеченской, Ингушской и Кабардино-Балкарской Республик в 1959–1984 гг. Остальные штаммы бруцеллезного микроба были выделены из крови больных людей в 2011–2014 гг.: в Республике Дагестан – 21 культура *B. melitensis* (биовар 1,3), в Республике Калмыкия – 3 культуры *B. melitensis* (биовар 3) и 2 культуры *B. abortus* (биовар 3), в Чеченской Республике – 1 культура *B. suis* (биовар 5).

Бактерии выращивали на среде эритрит-агар при температуре 37 °С. Выделение ДНК *Brucella spp.* из двухсуточной агаровой культуры осуществляли в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием лицензированных коммерческих наборов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» («ИнтерЛабСервис», Россия) в соответствии с инструкцией к используемому набору.

MLVA проводили по схеме, предложенной Le Fleche et al. [3], учитывая размер 15 VNTR-локусов *Brucella spp.* В ходе исследования локус *Bruce 30* был исключен из схемы типирования, поскольку не амплифицировался в ПЦР с ДНК изучаемых штаммов. Обработку полученных данных осуществляли с помощью автоматизированной станции микрокапиллярного электрофореза «Experion System» («Bio-Rad Laboratories», США). Полученные последовательности сравнивали с базой MLVA Bank 5.0 tutorial version 1.6 [4].

На основании полученных данных, методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA), с помощью компьютерной программы START 2 [5], была построена дендрограмма штаммов возбудителя бруцеллеза. Оценка статистической значимости различий частот наблюдений проводилась по критерию Фишера [6].

На дендрограмме отображено филогенетическое родство изучаемых штаммов. При этом бруцеллы разных подвидов формируют отдельные кластеры: *A* – *B. suis*, *B* – *B. abortus*, *C* – *B. melitensis*. Данный факт свидетельствует о существенных генетических различиях подвидов и возможности использования данного метода для внутриродовой дифференциации возбудителя бруцеллеза.

Кластер В представлен двумя штаммами *B. abortus* C-550, C-551, изолированными от больных в Калмыкии.

В кластере С конечные ветви дендрограммы сформированы генетически однотипными штаммами. Поскольку данные эпидемиологического расследования заболеваний бруцеллезом отсутствуют,

в качестве критериев групповых случаев бруцеллеза нами использованы сведения о местах и времени изоляции культур. В кластере С насчитывается семь генетически однотипных групп штаммов бруцеллезной инфекции. Из них в пяти случаях имеют место совпадения мест и времени выделения культур бруцеллеза. В том числе 2 группы, состоящие из штаммов, выделенных в населенных пунктах, расположенных в 30–40 км друг от друга (Калмыкия, Целинный р-н, п. Аршан и п. Оргакин; Дагестан, Тарумовский р-н, с. Кочубей и кутан М. Горького). С учетом сроков выделения, укладывающихся в инкубационный период, штаммы указанных групп могут быть отнесены к групповым случаям заболеваний бруцеллезом. Другие 2 группы сформированы штаммами, изолированными на значительных расстояниях (более 200 км) друг от друга. Не исключено, что они тоже соответствуют случаям заболевания с общим источником заражения, однако формальных признаков такой общности не наблюдается. Тем не менее использование критерия Фишера ($\phi = 1,654$) позволяет заключить, что общий MLVA-14-тип чаще наблюдается у штаммов, выделенных в течение одного группового заболевания людей бруцеллезом.

В кластере А выделено четыре группы штаммов с разным количеством подгрупп в каждой. В первой группе – одна подгруппа, вторая группа представлена одним штаммом – 501. В третьей группе – 9 подгрупп, в четвертой – 3 подгруппы. При анализе данных с учетом времени выделения штаммов было установлено, что однотипные штаммы вызывают эпизоотии на определенных территориях, причем в разные годы эти территории меняются. Иными словами, генотипы кочуют в пределах рассматриваемого Ассино-Сунженского междуречья.

Так, в 1965 г. в Грозненском районе Чеченской Республики (ЧР) и Сунженском районе Республики Ингушетия (РИ) эпизоотии среди мелких млекопитающих были вызваны штаммами сразу пяти подгрупп: 1.1, 3.3, 3.6, 3.8 и 3.9. Однако в 1978 г. эпизоотии среди домашних мышей в Малгобекском районе РИ были обусловлены штаммами только подгруппы 3.1 MLVA-14 типа. В 1982 г. в том же Малгобекском районе эпизоотии среди обыкновенных полевых мышей вызвали штаммы 3.4 подгруппы. В 1984 г. этот генотип перекочевал на полевых и лесных мышей в Сунженском районе РИ.

В Назрановском районе РИ зимой 1975 г. эпизоотии среди домашних мышей были вызваны штаммами 4.2 типа, которые в 1981 году перешли на территорию Северной Осетии в Ирафский и Дигорский районы. Штаммы 4.1 типа послужили причиной эпизоотий среди обыкновенных полевых мышей весной 1969 г. в Правобережном районе Северной Осетии. Штаммы 4.3 типа летом 1978 г. вызвали эпизоотии среди лесных и домашних мышей в Сунженском районе РИ и Надтеречном районе ЧР.

Таким образом, в результате анализа полученного филогенетического дерева, построенного на основании MLVA-14 генотипирования 91 штамма рода *Brucella* разных видов, сформированы MLVA-14 генотипы трех уровней дискриминации. Штаммы разных подвигов бруцеллезной инфекции формируют отдельные кластеры филогенетического дерева. Одинаковые MLVA-14 типы имеют штаммы *B. melitensis*, выделенные во время групповых заболеваний людей бруцеллезом. Штаммы *B. suis* с одинаковыми MLVA-14 типами приурочены к эпизоотиям среди мелких млекопитающих, которые могут протекать на различных административных территориях.

Говоря о возможностях MLVA-14 необходимо отметить, что благодаря своей высокой дискриминирующей способности метод существенно расширяет возможности решения задач эпидемиологической направленности, в том числе при расследовании случаев групповых заболеваний бруцеллезом. Использование MLVA-14 при исследовании штаммов возбудителя бруцеллеза позволяет сравнить полученные результаты с информацией, содержащейся в международных базах данных MLVA-генотипов. Данный метод успешно применяется в работе Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза, так как одним из направлений его деятельности является проведение генетического типирования и анализ геномных портретов выделенных штаммов *Brucella spp.*

Библиографический список

1. Анализ эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 году и прогноз на 2016 год <http://www.snipchi.ru/>, (дата обращения 01.06.16 г.).
2. Ma J., Wang H., Zhang X. et al. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China // Infect. Dis. Poverty. – 2016. – N 5 (26). – P. 1–9.
3. Le Fleche P., Jacques I., Grayon M. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay // BMC Microbiol. – 2006. – Vol.6, N 9. – P. 1–14.

4. MLVA bank for Microbes Genotyping. Available from: <http://mlva.u-psud.fr>. (дата обращения 01.06.16 г.).
5. START v.2 [<http://pubmlst.org/software/analysis/start>] (дата обращения 01.06.16 г.).
6. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156 с.

КОМПЛЕКСНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УНИКАЛЬНОГО СОЧЕТАННОГО ОЧАГА ТРАНСМИССИВНЫХ КЛЕЩЕВЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

**И.В. Козлова^{1,2}, О.В. Лисак¹, Е.К. Дорощенко¹, О.В. Сунцова¹, М.М. Верхозина³,
Т.В. Демина⁴, В.А. Рар⁵, С.Е. Ткачев⁵, Ю.П. Джиев^{1,2}, О.О. Федулina¹,
А.И. Парамонов¹, Ю.С. Савинова¹, В.И. Злобин²**

¹ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск; ²ГБОУ «Иркутский государственный медицинский университет», Иркутск; ³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», Иркутск; ⁴Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского, Иркутск; ⁵Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

В последнее десятилетие все большее значение для многих регионов России, в том числе и для Восточной Сибири, приобретает проблема заболеваний, переносчиками которых являются иксодовые клещи. В настоящее время на территории Иркутской области обнаружены новые нозологические формы и патогены, роль которых в региональной инфекционной патологии еще не установлена, основные переносчики и резервуарные хозяева не выявлены. Очаги старых и новых клещевых инфекций часто территориально совпадают, формируя сочетанные очаги. Для получения новой, более полной характеристики очагов трансмиссивных клещевых инфекций необходим комплексный подход к их изучению с описанием всех структурных компонентов паразитарной системы – переносчиков, прокормителей и инфицирующих их возбудителей. Подходящей моделью для получения такой комплексной биоценотической характеристики, по нашему мнению, является сочетанный очаг клещевых инфекций на территории Эхирит-Булагатского района Иркутской области, отличающийся высоким уровнем заболеваемости, многообразием ландшафтов, переносчиков, резервуарных хозяев и возбудителей клещевых инфекций.

Цель исследования – получение комплексной биоценотической характеристики сочетанного очага трансмиссивных клещевых инфекций на примере Эхирит-Булагатского района Иркутской области, изучение видового и генетического разнообразия возбудителей, циркулирующих на его территории.

В ходе работы было исследовано более 2000 экз. иксодовых клещей (*Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor nuttalli*/*D. silvarum*), собранных с растительности на флаг на территории различных ландшафтных формаций района; 120 образцов печени мелких млекопитающих, а также 25 штаммов вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), изолированных из различных источников в период с 1963 по 1987 гг.

Эхирит-Булагатский район является одним из наиболее неблагополучных районов Иркутской области в отношении заболеваемости клещевыми инфекциями. Уровень заболеваемости в данном районе в отдельные годы в десятки раз превышает региональные показатели. Наиболее высокий показатель заболеваемости клещевым энцефалитом был зарегистрирован в 2005 г., (132,7), он превысил среднеобластной показатель в 19,5 раз. Аналогичная неблагополучная эпидемиологическая ситуация наблюдается и в отношении иксодовых клещевых боррелиозов. Чрезвычайно напряженная обстановка сложилась в Усть-Ордынском Бурятском округе и в отношении клещевого риккетсиоза (КР). Показатель заболеваемости КР в отдельные годы достигал 93,0 на 100 тыс. населения. Столь высокий уровень заболеваемости обеспечивался преимущественно за счет двух районов – Эхирит-Булагатского и Баяндаевского, в остальных районах округа регистрировались только единичные случаи КР.

Эхирит-Булагатский район интересен и с точки зрения оригинальности его биоценотической структуры, которая представляет собой сложное сочетание таежных ландшафтов с участками перехода от лесостепных к степным ландшафтам [1, 2], приуроченным к местам, нарушенным хозяйственной деятельностью человека. Многообразие ландшафтов (темнохвойные и смешанные леса, лесостепи и степи, заливные луга и болота) обуславливает постоянное обитание на территории Эхирит-Булагатского района 4-х видов иксодовых клещей (*I. persulcatus*, *D. silvarum*, *D. nuttalli* и *H. concinna*) – переносчиков возбудителей клещевых инфекций, а также их прокормителей (резервуаров патогенов).

Численность отдельных видов иксодовых клещей значительно варьирует в зависимости от года наблюдения и точек сбора материала. В степных стациях преобладают клещи рода *Dermacentor*, максимальная численность в годы проведения мониторинга достигала 89 экз. на флажок/час. В таежных ландшафтах обитают клещи *I. persulcatus*, численность которых варьировала от 2-х до 15,5 экз. фл./час. В некоторых локальных точках обнаруживается сразу нескольких видов клещей, причем численность клещей *H. concinna* в отдельные годы превышает численность клещей *I. persulcatus*. Одновременно с этими двумя видами клещей в этих точках обнаруживаются и единичные экземпляры клещей рода *Dermacentor*.

Фауна, обитающая на территории Эхирит-Булагатского района, характеризуется наличием биоценотических группировок, свойственных таежным, подтаежным, лесостепным и степным ландшафтам. Из таежного эколого-фаунистического комплекса здесь наиболее часто встречаются бурозубки, красно-серая и красная полевки, восточноазиатская мышь, лесная мышовка и др. Из степного эколого-фаунистического комплекса в отловах наиболее часто обнаруживались суслик длиннохвостый, даурский хомячок, полевая мышь и др. Агрозооценозы были представлены домовою мышью и серой крысой, обитающими вблизи огородов и полей в окрестностях населенных пунктов, полевкой-экономкой, узкочерепной полевкой, водяной полевкой, полевой мышью и др.

Разнообразие переносчиков возбудителей трансмиссивных клещевых инфекций, а также их прокормителей обуславливает циркуляцию на данной территории широкого спектра генетически различных возбудителей.

В ходе ежегодного мониторинга на территории Эхирит-Булагатского района выявлены ВКЭ, *Borrellia s. l.*, *B. myiamotoi*, *Rickettsia sibirica*, *R. raoultii* (DnS28), *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Babesia crassa*, *B. motasi*, *B. microti* Us-type.

Для данного района характерна не только видовая, но и генетическая вариабельность возбудителей. Исследование штаммов ВКЭ с помощью комплекса молекулярно-биологических методов показало, что на территории Эхирит-Булагатского района циркулирует вирус трех известных генотипов (дальневосточного, европейского, сибирского), обнаружены уникальные штаммы 178–79 и 886–84, а также так называемые «политиповые» штаммы.

Нами отмечено, что на сегодняшний момент территория Эхирит-Булагатского района является восточной границей распространения европейского генотипа ВКЭ в России. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена белка E длиной 1449 п. н. штаммов 118–71 и 134–71 и 13 штаммов европейского генотипа, изолированных в разных частях ареала, полные геномы которых представлены в GenBank, показал, что по своей структуре они наиболее близки со штаммами № 84.2. из Западной Сибири (Алтай) и *Kumlinge* 25–03 из Финляндии, а также со штаммом из Эстонии (Est 3476), гомология с которыми составила 98,6% и 98,5% соответственно.

Штаммы европейского генотипа были изолированы от сусликов длиннохвостых, таежных клещей, красной и узкочерепной полевки.

Из 25 исследованных штаммов 10 были отнесены к сибирскому генотипу, азиатскому топоварианту. Пять из них принадлежали к группе Васильченко, пять – к группе Заусаев. Штаммы группы Васильченко были изолированы из крови больной хронической формой КЭ, молока коровы, клещей *I. persulcatus*. Все штаммы группы Заусаев изолированы от таежных клещей.

Источниками изоляции для штаммов дальневосточного генотипа послужили молоко коровы и клещи *I. persulcatus*. «Политиповые» штаммы были изолированы от таежных клещей.

На территории Эхирит-Булагатского района ДНК *E. muris* (предполагаемый возбудитель моноцитарного эрлихиоза человека) выявлена нами в клещах *I. persulcatus* и *H. concinna*. Анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК длиной 1299 н. о. и *groESL* оперона длиной 1315 н. о. Е.

muris показал ее высокую консервативность, в том числе и на территории Эхирит-Булагатского района. Анализ последовательностей гена 16S рРНК *A. phagocytophilum*, распространенных на территории Урала, Сибири, Дальнего Востока, позволил В.А. Пар выявить 6 генетических вариантов анаплазм, расшифровка нуклеотидных последовательностей *groESL* оперона длиной 1246 н.о. – 3 генетических варианта [3]. На территории Эхирит-Булагатского района обнаружено 3 генетических варианта *A. phagocytophilum*, установленных при изучении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК и 2 генетических варианта при расшифровке последовательностей *groESL* оперона.

На территории Эхирит-Булагатского района Иркутской области ДНК *B. miyamotoi* была обнаружена в клещах *I. persulcatus* и *H. concinna*.

В иксодовых клещах, отловленных на территории района, выявлены *Babesia crassa*, *Babesia motasi*, являющиеся патогенами овец, а также *B. microti* Us-type.

Таким образом, описанный нами очаг характеризуется высоким уровнем заболеваемости известными клещевыми инфекциями, своеобразием биоценотической структуры и является уникальным с точки зрения генетической вариабельности выявленных патогенов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-01336_А.

Библиографический список

1. Верхожина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В. и др. Эколого-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита в Восточной Сибири // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – №4. – С. 53–59.
2. Данчинова Г.А. Очаги клещевого энцефалита в Предбайкалье в условиях антропогенной трансформации ландшафтов: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.09 / Ин-т мед. паразитол. и тропич. мед. – М., 1988. – 24 с.
3. Rar V.A., Epikhina T.I., Livanova N.N. et al. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia // Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2011. – V. 11. – P. 1013–1021.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА НА ТЕРРИТОРИИ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ В ЭПИДСЕЗОН 2015 – 2016 ГГ.

М.В. Кондратьев, А.В. Шихин, Л.М. Кондратьева

ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Томской области, Томск, Россия

Мониторинг и диагностика гриппа на территории Томской области в эпидсезон 2015 – 2016 гг. проводились на базе лаборатории вирусологических исследований (ЛВИ) разными методами: вирусологическим, иммунофлуоресцентным (МФА) и молекулярно-биологическим (метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно – флуоресцентной детекцией по «конечной точке» (FER)).

Молекулярно-биологические исследования проводились с помощью наборов производства ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», г. Москва. Выявление РНК вируса гриппа А и В проводилось с помощью набора «АмплиСенС Influenza virus A/B – FL», а в случаях обнаружения РНК вируса гриппа А типирование проводилось с использованием наборов «АмплиСенС Influenza virus A/H1 – swine – FL» и «АмплиСенС Influenza virus A – тип – FL».

Материал для исследования (мазки из носа и зева) поступал из учреждений здравоохранения г. Томска и Томской области.

Первый случай обнаружения вируса гриппа A(H1N1)pdm09 был выявлен 25.11.15 г., последний случай обнаружения вируса гриппа A(H1N1)pdm09 был выявлен 21.04.2016 г. Всего за этот период (с конца ноября 2015 г. по апрель 2016 г.) было обследовано 3095 человек, из них вирус гриппа был обнаружен у 677 лиц (21,87%). В результате типирования в 8 случаях обнаружен вирус гриппа A(H3N2), во всех остальных случаях (669 человек) подтвердился вирус гриппа A(H1N1)pdm09. Вирусов гриппа В за весь период наблюдения выявлено не было.

В декабре 2015 г. обследовано 117 человек, в 2 случаях обнаружен вирус гриппа A(H1N1)pdm09 (1,7%). В январе 2016 г. обследовано 160 человек, в 29 случаях обнаружен вирус гриппа A(H1N1)pdm09 (18,1%).

В феврале 2016 г. обследовано 1880 человек, в 503 случаях обнаружен вирус гриппа А (26,8%) (из них вирус гриппа A(H1N1)pdm09 составил 496 случаев, а вирус гриппа A(H3N2) 7 случаев).

В марте 2016 г. обследовано 761 человек, в 119 случаях обнаружен вирус гриппа А (15,6%) (из них вирус гриппа A(H1N1)pdm09 составил 118 случаев, а вирус гриппа A(H3N2) 1 случай).

В апреле 2016 г. обследовано 177 человек, в 24 случаях обнаружен вирус гриппа A(H1N1)pdm09 (13,6%).

В период с декабря 2015 г. по февраль 2016 г. в лабораторию также поступал секционный материал от умерших в стационаре или на дому больных с подозрением на грипп. Всего были исследованы секционные материалы от 12 лиц, в 6 случаях был обнаружен вирус гриппа A(H1N1)pdm09. Причем в феврале 2016 г. поступил секционный материал от 9 лиц, в 6 случаях был обнаружен вирус гриппа A(H1N1)pdm09.

Также были подготовлены и отправлены пробы и выделенные штаммы вирусов в Центр экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского». Направили 1 пробу ПЦР-позитивного клинического материала, из которого выделен штамм вируса гриппа A(H1N1)pdm09, в январе 2016 г. штамм направлен во Всемирный Крик Центр по гриппу, расположенный в лаборатории Милл Хилл, Лондон, Англия. Кроме того, было направлено 17 штаммов вирусов гриппа A(H1N1)pdm09, где была подтверждена их принадлежность к данному типу вируса.

На основании данных, полученных по результатам исследований проведенных в ЛВИ, можно сделать следующие выводы об особенностях эпидемии гриппа на территории Томской области в сезоне 2015 – 2016 гг.:

1. Появление заболеваемости гриппом – конец ноября – декабрь 2015 г. и окончание – апрель 2016 г. (в эпидсезоне 2014 – 2015 гг. с ноября 2014 г. по май 2015 г.)
2. Циркулировал преимущественно один тип вируса гриппа A(H1N1)pdm09, тип A(H3N2) единичные случаи, грипп В отсутствовал (в эпидсезоне 2014 – 2015 гг. циркулировали два типа вируса гриппа A(H3N2) и В).
3. Одноволновой характер течения эпидемии, связанный с циркуляцией преимущественно одного типа вируса (в эпидсезоне 2014 – 2015 гг. двухволновой характер течения).
4. Пик эпидемии пришелся на февраль 2016 г., что подтверждается количеством обследованных лиц, количеством положительных на грипп А, количеством поступившего секционного материала и выявленного в нем вируса гриппа.

ТЕКУЩАЯ СИТУАЦИЯ ПО ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

**В.Р. Муранкина¹, Е.В. Власов¹, В.В. Ивлев¹, А.В. Тотменин¹, М.П. Гашникова¹,
Ю.В. Соколов², Е.В. Казаева², Н.М. Гашникова¹**

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., ² ГБУЗ по Новосибирской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Новосибирск, Россия

Начиная с 2008 г. в Новосибирской области (НСО) регистрируется значительная активизация эпидемии ВИЧ-инфекции. При этом регистрируется не только стремительное увеличение числа новых случаев заражения ВИЧ в популяции потребителей наркотиков, вирус в настоящее время вышел из групп риска и начал свое распространение среди всего населения области. Последние годы НСО стабильно занимает 3-е–4-е места в общероссийском рейтинге по показателю заболеваемости ВИЧ-инфекцией, относясь к наиболее неблагоприятным регионам по скорости распространения эпидемии. Еще в 2013 г. после очередной регистрации подъема заболеваемости ВИЧ-инфекцией и роста коли-

чества ВИЧ+ лиц, зараженных половым путем, показатель распространенности среди беременных в НСО превысил 1%. В настоящее время в НСО продолжает развиваться генерализованная стадия эпидемии ВИЧ-инфекции. По данным Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями на середину 2016 г. в НСО зарегистрировано 30 039 случаев ВИЧ-инфекции. Нами с начала регистрации первых случаев ВИЧ в НСО проводится мониторинг за циркулирующими вариантами вируса. В 2015 г. — начале 2016 г. нами выполняется очередной срезовый анализ разнообразия циркулирующих на территории НСО генетических вариантов ВИЧ-1 с целью изучения молекулярно-генетических особенностей современной эпидемии.

Сбор образцов крови от ВИЧ-положительных пациентов, анкетирование доноров крови выполнялось совместно со специалистами Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Выделение РНК из отобранных образцов проводилось набором «ДельтаМаг ВГВ/ВГС/ВИЧ» («Вектор-Бест», Россия), с использованием системы лабораторных праймеров и реагентов для постановки реакции ОТ и ПЦР («Биолабмикс», Россия) нарабатывались вирус-специфические фрагменты генома, кодирующие области гена *pol* (протеаза, ревертаза, интеграз) и область *env* (основной белок оболочки, *env*) ВИЧ-1. Расшифрованные нуклеотидные последовательности фрагментов генов *pol* и *env* сравнивались с референс-последовательностями различных субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1 из международной базы данных (LosAlamosHIV-1 database) с применением программ ClustalWMultiplealignment и BioEditsoftware 7.2.5. Филогенетический анализ выполняли с помощью MEGA 6.0.6, используя метод объединения ближайших соседей (*neighbor-joining method*, NJ) с бутстрепом 1,000 повторов на основе двухпараметрической модели Кимуры. Статистическую значимость топологии филогенетического дерева оценивали с помощью анализа бутстрепов.

В исследование вовлечено 53 ВИЧ+ пациента, среди них 33 мужчины (62,3%) и 20 женщин (37,7%), 45,3% из них сообщили об употреблении инъекционных наркотических препаратов, 30,2% человек принимают антиретровирусную терапию (АРВТ). Из собранных клинических образцов крови были выделены нуклеиновые РНК/ДНК ВИЧ-1, получены и секвенированы вирус-специфические фрагменты для четырех областей генома, как описано ранее. Проведение филогенетического анализа для полученных нуклеотидных последовательностей позволяет заключить, что на территории НСО развитие эпидемии по-прежнему, начиная с 2009 г., определяет генетический вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1 (впервые выявленный нами в 2006 г., а описанный в 2011 г.), распространенность которого составила 83%. В 12,7% образцов выявлен субтип А ВИЧ-1, а в 4,3% случаев выявлены уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1 (URF), прародителями которых являлись ВИЧ-1 субтипа А и CRF63_02A1.

Молекулярно-эпидемическая ситуация в НСО является типичной для регионов СФО, характеризующихся высокими темпами развития эпидемии и преобладанием распространения вируса среди ПИН. Пожалуй, особенностью таких территориальных эпидемий в 2014–2015 гг. является лишь процент выявляемости уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 на основе CRF63_02A1, данный показатель варьирует от 4 до 21%. В случае с НСО сравнительно небольшое количество случаев регистрации новых генетических вариантов ВИЧ-1 объясняется не тем, что эпидемическая ситуация не способствует повторному заражению ВИЧ. Зарегистрировать такие события достаточно сложно, для этого необходимо проводить не только молекулярно-биологические исследования ВИЧ, но и эпидемическое расследование данного случая. Как показывают единичные случаи выявляемой суперинфекции (вторичное заражение ВИЧ-1), такие случаи в наших регионах встречаются примерно с равной частотой. Дело в том, что в отличие от соседних с НСО областей, где до недавнего времени параллельно циркулировали разные геноварианты вируса, большая часть ВИЧ+ лиц, проживающих в НСО, начиная с 2011 г., инфицирована генетическим вариантом CRF63_02A1 ВИЧ-1. Поэтому при суперинфекции в таких случаях (при повторном инфицировании человека вирусом одного и того же генетического варианта), даже после случившихся рекомбинационных событий между вариантами ВИЧ-1 в организме ВИЧ-инфицированного не возникают новые генетические варианты ВИЧ-1.

Кроме генотипирования ВИЧ-1 в работе проводится выявление и анализ встречаемости мутаций ВИЧ-1, связанных с резистентностью вируса к АРВП. Показано, что распространенность первичных мутаций резистентности в области находится на уровне 6,4%. Среди лиц с неэффективностью АРВТ резистентность/полирезистентность ВИЧ-1 была выявлена в 19,4%. Необходимо отметить, что в целом проводимая среди ВИЧ+ лиц НСО АРВТ показывает очень высокую эффективность. Анализ данных

случаев выявленной резистентности ВИЧ-1 и результатов анкетирования этих пациентов позволяет заключить, что основной причиной развития резистентности явилась низкая приверженность ВИЧ-инфицированных к АРВТ.

Выводы. Характер эпидемической ситуации по распространению ВИЧ-1 в Новосибирской области, характеризовавшийся существенными изменениями по структуре циркулирующих вариантов вируса с 2006 по 2010 гг., стабилизировался. Возникший в начале 2000-х гг. генетический вариант CRF63_02A1 ВИЧ-1 сформировал на данной территории свой очаг, распространился не только среди разных слоев населения НСО, но и среди населения соседних территорий, и в настоящее время определяет развитие современной эпидемии на значительной части Сибирского федерального округа.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ SNP АНАЛИЗ БРУЦЕЛЛ. ФИЛОГЕОГРАФИЯ *BRUCELLA MELITENSIS*

С.В. Писаренко, Д.А. Ковалев, А.С. Волынкина, А.А. Хачатурова, Д.Г. Пономаренко,
А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Быстрая и точная идентификация бактериальных изолятов, а также определение источника их происхождения – важные задачи медицинской микробиологии, особенно в ситуациях, когда вспышки инфекционного заболевания представляют угрозу глобального распространения. Сегодня с развитием технологий высокопроизводительного секвенирования появилась возможность использовать данные о полных геномных последовательностях для точной идентификации и классификации организмов.

В отличие от других молекулярно-генетических методов, таких как SNP-типирование отдельных локусов, MLVA и др., которые предоставляют исследователю ограниченную информацию о нуклеотидных последовательностях фрагментов ДНК, анализ полных геномов позволяет использовать данные о структуре всего генома, что позволяет говорить о качественно новом уровне генетических исследований.

На основе анализа полногеномных последовательностей по локусам единичных полиморфных нуклеотидов (SNP), локализованных в ортологичных генах штаммов *Brucella melitensis*, Kim-Kee Tan *et al.* в 2015 г. описали глобальное генетическое разнообразие штаммов *B. melitensis*, изолированных на территории различных континентов [1]. Таким образом, положено начало исследованию генетического разнообразия штаммов *B. melitensis* из различных регионов мира – Азии, Европы, Африки, Северной и Южной Америки. Филогеографическое исследование штаммов, выделенных на территории России, не проводилось, не определено филогенетическое родство этих штаммов со штаммами *B. melitensis* из других регионов мира.

В то же время ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации остается напряженной. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, в Российской Федерации отмечается ежегодное увеличение количества больных сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота. Ежегодно в России регистрируется более 340 случаев впервые выявленного бруцеллеза у людей. В 2015 г. было отмечено увеличение заболеваемости бруцеллезом на 5,1% по сравнению с 2014 г. Основная часть выявляемых случаев, заболевания бруцеллезом в субъектах Российской Федерации (более 85%), приходится на долю Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов [2].

В нашей работе были использованы геномные последовательности 56 штаммов возбудителя бруцеллеза:

- полногеномные последовательности 11 штаммов *B. melitensis*, выделенных на территории Российской Федерации (Саратовская область, Ставропольский край, Республика Дагестан, Республика Калмыкия), полученные нами в ходе выполнения настоящей работы;

- 5 полных геномов и 38 геномных проектов *B. melitensis*, находящихся в свободном доступе в меж-

дународных базах данных;

– 2 полных генома штаммов *B. abortus* использовали в качестве группы сравнения.

Геномные последовательности 11 изолятов *B. melitensis* были получены путем высокопроизводительного секвенирования с использованием платформы Ion Torrent PGM Life Technologies. Полученные чтения были собраны de novo в незавершенные проекты геномов. Геномная последовательность штамма *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1) была использована для оценки точности и эффективности сборки геномных проектов. Аннотацию геномных проектов проводили с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP), полученные геномные проекты были депонированы в базу данных DDBJ/EMBL/GenBank.

Разработанная нами схема биоинформационного анализа имеет принципиальное отличие от предложенной ранее – включение в анализ SNP, локализованных как в кодирующих, так и не кодирующих гомологичных участках исследуемых геномов.

Филогеографический анализ позволил установить эволюционные отношения между штаммами *B. melitensis*, выделенными в различных географических регионах планеты. Мы сравнили геномные последовательности 11 изолятов, полученные в нашей работе, с геномами 43 штаммов *B. melitensis* в доступных базах данных на момент проведения исследования. Поиск SNP в геномах осуществляли с помощью web-сервера REALPHY 1.10 [3], используя в качестве референсной последовательности геном штамма *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1).

Все штаммы *B. melitensis*, используемые в исследовании, представлены пятью генотипами, которые соответствуют вероятному географическому происхождению изолятов.

Изоляты, выделенные на территории России, были отнесены ко II генотипу, включающему 35 штаммов *B. melitensis* из 54 использовавшихся в исследовании. Российские изоляты и штаммы *B. melitensis* NI (Китай), *B. melitensis* F2/06–6 (Португалия), вероятно, имеют общее происхождение, образуя кластер, не описанный ранее, который мы обозначили как подгенотип IIh. Он включает 13 из исследуемых штаммов *B. melitensis*. В процессе анализа выявлены наборы SNP, специфичные для различных генотипов *B. melitensis*.

Таким образом, нами разработана и применена модифицированная методика SNP анализа полных геномов патогенных микроорганизмов на модели возбудителя бруцеллеза. Предложенная схема типирования, в отличие от альтернативных, включает анализ как кодирующих, так и не кодирующих участков генома, что позволяет повысить достоверность полученных результатов, а также выявить ранее не описанные полиморфизмы. На основании полногеномного SNP анализа установлено, что штаммы возбудителя бруцеллеза, циркулирующие на Юге России, принадлежат к ранее не описанному генотипу. Впервые описаны наборы единичных нуклеотидных замен, позволяющих дифференцировать разные генотипы возбудителя бруцеллеза. Сформулировано предположение о вероятном происхождении штаммов возбудителя бруцеллеза, циркулирующих на Юге России, из регионов Центральной Азии.

Метод SNP анализа полных геномов может быть применен для точного определения происхождения штаммов возбудителей инфекционных болезней. Учитывая уникальность набора SNP генома каждого штамма, дискриминирующая способность метода полногеномного SNP анализа, несомненно, выше по сравнению с методами SNP-типирования отдельных локусов, MLVA и др., и указанный подход может быть использован, в частности для установления происхождения штаммов в ходе эпидемиологических расследований.

Библиографический список

1. Tan K.K., Tan Y.C., Chang L.Y. et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. // BMC Genomics. – 2015. – Vol. 16. – P. 93–104.
2. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 2. – С. 22–24.
3. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M. et al. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads // Mol. Biol. Evol. – 2014. – Vol. 31, N 5. – P. 1077–1088.

МУЛЬТИЛОКУСНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ БОРРЕЛИЙ КОМПЛЕКСА *BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO*, ИЗОЛИРОВАННЫХ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

**Ю.В. Сабитова¹, Н.В. Фоменко^{1,2}, А.Ю. Тикунов¹, О.В. Стронин³, Н.А. Гольцова³,
Н.В. Тикунова¹**

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск; ³НПО «Вирион», филиал ФГПУ НПО «Микроген», Томск, Россия

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – мультисистемные заболевания с широким спектром клинических проявлений. Возбудители их – спирохеты комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*s.l.*), – передаются человеку при укусе клещами рода *Ixodes* [1]. К настоящему времени комплекс включает 18 видов, но не все из них обладают патогенным потенциалом [2]. Ранее для генотипирования боррелий комплекса *B. burgdorferi s.l.* широко использовали анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции ПЦР продуктов межгенного спейсера 5S–23S рПНК [3]. С его помощью было обнаружено, что в России преобладают два патогенных вида: *B. garinii* (группы 20047, NT29 и ChY13p) и *B. afzelii* (группы VS461 и NT28) [4, 5]. Позже была предложена схема мультилокусного типирования боррелий (*multilocus sequence typing*, MLST), основанная на анализе фрагментов 8 генов домашнего хозяйства: *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA* [6]. Информация об изолятах, исследованных данным методом, представлена в международной базе *Borrelia* MLST (<http://pubmlst.org/borrelia>). Благодаря этому подходу выделен новый вид *B. bavariensis* [7]. Ранее его представителей относили к 4 серотипу *OspA* вида *B. garinii*. В России применение метода MLST для генотипирования боррелий пока не получило широкого применения, хотя благодаря ему на территории страны обнаружен еще один патогенный вид – *B. bavariensis*, который во всех случаях соответствовал группе NT29 [8].

Цель работы – исследовать методом MLST генетическое разнообразие штаммов боррелий, изолированных в Томской области, и сравнить с результатами генотипирования по последовательности межгенного спейсера 5S–23S рПНК.

В работе использованы 55 штаммов боррелий, полученных путем посева внутренних органов клещей *Ixodes spp.*, собранных на территории Томской области в 2001–2007 гг. Всем штаммам (за исключением штамма *BgVir*, выделенного в 1999 г.) присвоены названия, где Том – Томская область, первые цифры – номер изолята, последние – год изоляции. Амплификацию 8 фрагментов генов домашнего хозяйства и последовательности межгенного спейсера 5S–23S рПНК проводили по стандартным методикам [3, 6].

Результаты MLST показали, что исследуемые штаммы относятся к четырем патогенным видам комплекса *B. burgdorferi s.l.*: *B. afzelii* (n=23), *B. bavariensis* (n=20), и *B. garinii* (n=11) и *B. valaisiana* (n=1) (табл.). Для штаммов вида *B. afzelii* было определено 12 сиквенс-типов (ST). При этом только 6 штаммов принадлежат ST432, обнаруженному ранее в России, остальные 17 штаммов принадлежат новым ST: ST649–659. Для штаммов вида *B. bavariensis* было определено 8 ST. Из них 17 штаммов принадлежат 5 известным ранее ST: ST125 (n=1), и ST379 (n=1), обнаруженным в Китае; ST128 (n=3), обнаруженному в Китае, Монголии, Японии и России; ST328 (n=11), обнаруженному в Китае, Монголии и России, и ST374 (n=1), обнаруженному в России. Остальные 3 штамма принадлежат новым ST: ST600–ST662. Из них штамм Tom1003 (ST660), имеет уникальные аллели по всем восьми локусам. Для штаммов вида *B. garinii* было определено 6 ST. Из них 6 штаммов принадлежат ST431 (n=4) и ST613 (n=2), обнаруженным ранее в России, остальные 5 штаммов принадлежат новым ST: ST663–666. Причем штаммы Tom5202 (ST663) и Tom2903 (ST664) имеют новые аллели по семи и четырем локусам соответственно. Штамм Tom4006 вида *B. valaisiana* принадлежит ST97, широко распространенному в Европе (Франция, Англия и Латвия). Таким образом, для 55 штаммов, изолированных в Томской области, были установлены 18 новых ST (11 – для вида *B. afzelii*, 3 – *B. bavariensis*, 4 – *B. garinii*), что свидетельствует о высоком генетическом разнообразии боррелий, циркулирующих на данной территории.

Генетическая характеристика исследуемых штаммов

Сиквенс-типы (ST) согласно MLST (штамм)	Группа по межгенному спейсеру
<i>Borrelia afzelii</i>	
ST432 (Tom3401, Tom4206, Tom7006, Tom7806, Tom3207, Tom4707); ST649 (Tom603, Tom2403, Tom2803); ST650 (Tom703, Tom2303); ST652 (Tom1303); ST653 (Tom1503, Tom6303); ST654 (Tom3103); ST655 (Tom3703, Tom4703); ST656 (Tom5403); ST657 (Tom806)	VS461
ST651 (Tom1103, Tom2504); ST658 (Tom4106); ST659 (Tom3107)	*
<i>Borrelia bavariensis</i>	
ST125 (BgVir); ST128 (Tom9305, Tom9805, Tom3506); ST328 (Tom5102, Tom3803, Tom7005, Tom1406, Tom1506, Tom2806, Tom3806, Tom4906, Tom6506, Tom6606, Tom6706); ST374 (Tom5306); ST662 (Tom5007)	NT29
ST379 (Tom3101); ST661 (Tom4606)	20047
ST660 (Tom1003)	**
<i>Borrelia garinii</i>	
ST431 (Tom203, Tom303, Tom9405, Tom1206); ST613 (Tom3005, Tom9105); ST663 (Tom5202), ST664 (Tom2903), ST665 (Tom1805, Tom7105); ST666 (Tom8705)	20047
<i>Borrelia valaisiana</i>	
ST97 (Tom4006)	VS116

Жирным выделены впервые определенные ST

*, ** – новые генетические варианты межгенного спейсера 5S–23S рПНК

Параллельно проводили генотипирование штаммов по последовательности межгенного спейсера 5S–23S рПНК. Из 55 проанализированных штаммов 50 относятся к четырем известным группам: VS461 (n=19), NT29 (n=17), 20047 (n=13) и VS116 (n=1) (табл.). Штаммы Tom1103, Tom2504, Tom4106 и Tom3107 вида *B. afzelii* имеют одинаковые последовательности межгенного спейсера (GenBankDQ469917) с генетическим вариантом, встречающимся в России в единичных случаях, но к настоящему времени не выделенным в отдельную группу. Штамм Tom1003 вида *B. bavariensis* имеет уникальный генетический вариант последовательности межгенного спейсера (GenBankDQ469901).

При сравнении результатов генотипирования двумя методами было обнаружено, что, виду *B. afzelii* соответствуют штаммы группы VS461 и 4 штамма, имеющие новый генетический вариант; виду *B. bavariensis* – штаммы группы NT29, штаммы Tom3101 и Tom4606 группы 20047 и штамм Tom1003, имеющий новый генетический вариант; виду *B. garinii* – все остальные штаммы группы 20047; виду *B. valaisiana* – штамм 4006 группы VS116 (табл.).

Таким образом, было показано, что на территории Томской области встречаются четыре патогенных вида комплекса *B. burgdorferi* s.l.: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii* и нетипичный для России вид *B. valaisiana*. Несмотря на то что ранее в России однозначно соотносили группу NT29 с видом *B. bavariensis*, а группу 20047 – с видом *B. garinii* [8], для штаммов из Томской области эта закономерность не подтвердилась. Было обнаружено, что штаммы группы 20047 соотносятся как с видом *B. bavariensis*, так и *B. garinii*. Следовательно, генотипирование боррелий по последовательности межгенного спейсера 5S–23S рПНК не всегда позволяет однозначно определить видовую принадлежность штаммов комплекса *B. burgdorferi* s.l.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки (проект VI.55.1.1).

Библиографический список

1. Wang, G., van Dam, A., Schwartz, I., Dankert, J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications // Clin. Microbiol. Rev. – 1999. – Vol. 12, N 4. – P. 633–653.
2. Margos, G., Vollmer, S.A., Ogden, N.H., Fish, D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato // Infect. Genet. Evol. – 2011. – Vol. 11, N 7. – P. 1545–1563.
3. Postic, D., Assous, M., Grimon, P., Baranton, G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenc by

restriction fragment length polymorphism of rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer amplicons // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44, N 4. – P. 743–752.

4. Коренберг, Э.И., Горелова, Н.Б., Ковалевский, Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов России // Паразитол. – 2002. – № 3. – С. 177–191.

5. Фоменко, Н.В., Ливанова, Н.Н., Романова, Е.В. и др. Выявление ДНК боррелий, циркулирующих в Новосибирской области // Журн. микробиол. – 2006. – № 7. – С. 22–28.

6. Margos, G., Gatewood, A.G., Aanensen, D.M. et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2008. – Vol. 105, N 25. – P. 8730–8735.

7. Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M. et al. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – P. 5410–5416.

8. Mukhacheva, T.A., Kovalev, S.Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Russia // Ticks Tick Borne Dis. – 2013. – V. 4. – P. 275–279.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КОНТРОЛЬНЫХ КАРТ В ПРОЦЕССЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА КОНТАМИНАЦИИ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Т.Ф. Степанова¹, А.П. Ребешенко¹, В.В. Мазуркевич², И.В. Бакштановская¹,
Е.А. Зматракова¹, И.В. Ожирельева¹

¹ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень; ²ГБУЗ ТО Областное бюро судебно-медицинской экспертизы, Тюмень, Россия

Введение

В разработанной системе обеспечения биологической безопасности персонала бюро судебно-медицинской экспертизы важным элементом является мониторинг загрязнения производственной среды микобактериями туберкулеза (МБТ) с применением молекулярно-генетических методов [2, 3].

Ключевым моментом анализа итогов мониторинга служит процедура формирования эпидемиологического диагноза о причинах недостаточной продуктивности мер, направленных на минимизацию активности эпидемического процесса. Если причины не установлены, то результативность профилактики профессионального заражения сотрудников бюро возбудителями инфекционных заболеваний (в первую очередь МБТ) будет недостаточной. Все причины вариации или нежелательных отклонений ключевых и поддерживающих процессов делятся на две большие группы: системные причины и особые причины.

Наиболее эффективным статистическим методом представления информации для оценки производственных процессов являются контрольные карты. Контрольные карты – это графический способ представления и сопоставления информации [1]. Их применение позволяет выявлять и дифференцировать случайные и особые причины нежелательных отклонений. Всякая контрольная карта состоит из центральной линии, пары контрольных пределов, по одному над и под центральной линией, и значенной характеристики (показателя), нанесенных на карту для представления состояния процесса.

Если все эти значения оказываются внутри контрольных пределов, не проявляя каких бы то ни было тенденций, то процесс рассматривается как находящийся в контролируемом состоянии. Такой процесс предсказуем, так как будет стабильно выдавать одинаковую результативность. В этом случае колебания значений исследуемой характеристики определяются **системными причинами**.

Если же, напротив, значения исследуемой характеристики попадают за контрольные пределы или принимают какую-нибудь необычную форму, то процесс считается вышедшим из-под контроля. Такие колебания называются нежелательными отклонениями, и они обусловлены действием особых причин. Это требует постановки эпидемиологического диагноза и проведения корректирующих действий.

Цель исследования – использование контрольных карт и их анализ для выявления особых причин в ходе молекулярно-генетического мониторинга контаминации рабочей среды бюро судебно-медицинской экспертизы ДНК МБТ.

Материалы и методы

При выполнении исследования использован системный подход, который объединяет статистические методы исследования, молекулярно-генетические и эпидемиологические. Объектом исследования являлось Тюменское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, где в течение 2015 г. в ежеквартальном режиме было отобрано 400 смывов для оценки уровня контаминации персонала и объектов производственной среды микобактериями туберкулеза. Смывы отбирали во время выполнения производственных процессов в секционных залах, лабораториях и помещениях административно-хозяйственной части (АХЧ). Применяли метод ПЦР для обнаружения в отобранных смывах ДНК МБТ.

Статистический анализ данных осуществляли с помощью лицензированного программного обеспечения SPSS Base 14.0. В процессе статистического анализа дискретных значений, в нашем случае это частота обнаружения ДНК МБТ, использовалась р-карта (доля дефектов).

Результаты

На рис. 1 представлены результаты ПЦР-исследований смывов, отобранных с объектов производственной среды, обуви, спецодежды, обеденной посуды и с рук сотрудников в 1-4 кварталах 2015 г.

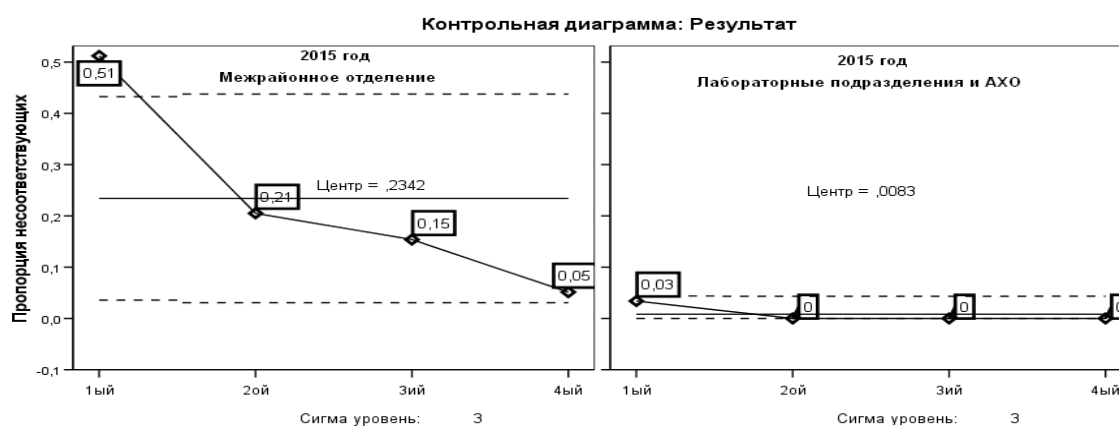


Рис.1. Р-карты, иллюстрирующие частоту обнаружения ДНК МБТ в смывах, отобранных с объектов производственной среды, обуви, спецодежды, обеденной посуды и с рук сотрудников в разрезе групп подразделений ТО ОБСМЭ в 2015 г. поквартально

В 1 квартале 2015 г. ДНК микобактерий были обнаружены как в межрайонном подразделении, так и в лабораторных подразделениях и АХО. Во 2, 3 и 4 кварталах 2015 г. все находки ДНК МБТ были только в межрайонном отделении, но и здесь частота встречаемости МБТ сократилась с 51% до 5%.

В ходе первого периода мониторинга было установлено, что процессы, обеспечивающие снижение угрозы контаминации МБТ объектов производственной среды межрайонного отделения, вышли за верхний контрольный предел. ДНК МБТ обнаруживали не только в секционных залах, где отбор смывов осуществляли в период их работы, следовательно, положительные находки там неизбежны, а их количество зависит от вероятности встречаемости на вскрытии лиц с туберкулезом, но и в лабораторных подразделениях, где частота встречаемости зависит от соблюдения техники безопасности при работе с патогенными биологическими агентами.

Во второй период мониторинга, осуществленного после постановки эпидемиологического диагноза и проведения корректирующих действий, направленных на выявление и устранение особых причин, ситуация изменилась.

На рис. 2 показаны результаты ПЦР-исследований смывов в разрезе отдельных помещений межрайонного отделения, так как в данных помещениях было обнаружено большинство ДНК МБТ. При проведении первого сеанса мониторинга положительные результаты отмечали как в секционных залах, так и в подсобных помещениях. По результатам рекомендаций и выполненных персоналом бюро корректирующих действий угроза контаминации межрайонного отделения микобактериями туберкулеза снизилась как в секционных залах, так и в прочих помещениях (ординаторские, комнаты для лаборантов и санитаров, комнаты для приема пищи). В секционных залах все мониторируемые процессы

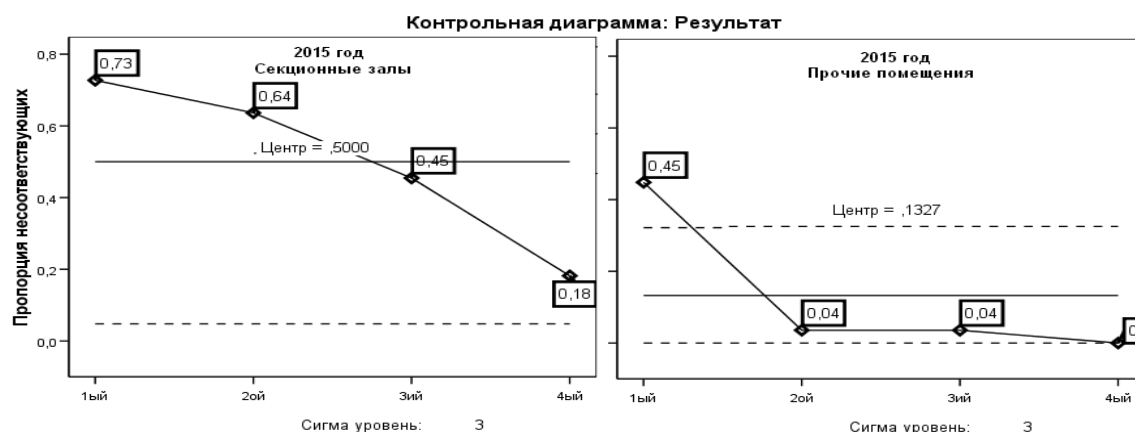


Рис. 2. Р-карты, иллюстрирующие частоту обнаружения ДНК МБТ в смывах, отобранных с объектов производственной среды, обуви, спецодежды, обеденной посуды и с рук сотрудников в разрезе групп подразделений межрайонного отделения в 2015 г.

располагались внутри своих контрольных пределов и частота встречаемости МБТ сократилась с 73% до 18%.

Прочие помещения (кабинеты экспертов и лаборантов, комнаты для приема пищи и пр.) в 1 квартале выходили за верхний контрольный предел. Во второй период мониторинга ситуация изменилась – частота встречаемости ДНК МБТ уменьшилась с 45% до 4%. В четвертом периоде мониторинга положительных находок микобактерий в прочих помещениях межрайонного отделения не было.

Таким образом, метод контрольных карт помогает выявить нежелательные отклонения и с помощью своевременных корректирующих действий снизить негативную активность всех факторов риска и обеспечить стабильность ключевых и поддерживающих процессов.

Библиографический список

1. ГОСТ Р 50779.42-99 Статистические методы КОНТРОЛЬНЫЕ КАРТЫ ШУХАРТА.
2. Корначев А.С., Степанова Т.Ф., Бакштановская И.В. и др. Организация мониторинга биологической безопасности труда персонала бюро судебно-медицинской экспертизы и патологоанатомических отделений, в части профилактики внутрибольничного заражения микобактериями туберкулеза (Методические рекомендации) // Фтизиатрия и пульмонология. – 2012. – Т. 5. № 2. – С. 76–177.
3. Корначев А.С., Степанова Т.Ф., Бакштановская И.В. и др. Место молекулярно-генетических исследований в эпидемиологическом надзоре за нозокомиальным туберкулезом на примере бюро судебно-медицинской экспертизы // Молекулярная диагностика. Сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика -2014» / под ред. В.И. Покровского. – Т. 1 – М.: ООО "Издательство МБА", 2014. – С. 264–265.
4. Корначев А.С., Дмитриенко Ю.В., Семина Н.А. Анализ причин высокой активности эпидемического процесса туберкулеза среди сотрудников бюро судебно-медицинской экспертизы // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – № 3 (22). – С.15–20.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИ- И МОНОКЛОНАЛЬНЫХ МЕЛИОИДОЗНЫХ АНТИТЕЛ В СЕРОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ МЕЛИОИДОЗА КАК ОСОБО ОПАСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Ю.С. Татаренко, И.В. Новицкая, Е.В. Савина

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Волгоград, Россия

Опасные инфекционные заболевания отличаются высокой контагиозностью, тяжелым течением и большой вероятностью летального исхода в кратчайшие сроки от момента заражения [1].

Мелиоидоз носит эндемичный характер и получил распространение в странах с влажным субтропическим климатом (Юго-Восточная Азия). Тем не менее подтверждены случаи инфицирования в Австралии, странах Южной Америки и Западной Африки [1]. Заболевание спорадически выявляют во Вьетнаме, Таиланде, Китае, Иране, Турции. Развитие туризма и международных отношений увеличивает риск завоза возбудителя из эндемичных очагов на территорию Российской Федерации [2]. Также возможно применение *Burkholderia pseudomallei* в качестве агента биотерроризма, в связи с чем проблемы индикации микроорганизма и своевременная экспресс-диагностика мелиоидозной инфекции приобретают особую актуальность [3, 4].

B. pseudomallei относят к грамотрицательным микроорганизмам II группы патогенности [5]. Внутриклеточная локализация и способность к размножению в иммунокомпетентных клетках приводят к длительной персистенции возбудителя в макроорганизме. *B. pseudomallei* обладает высокой степенью вариабельности генной экспрессии и генетически обусловленной устойчивостью к большинству антибиотиков, что весьма затрудняет этиотропное лечение и ведет к летальному исходу в более чем 40% случаев [6].

Лабораторная диагностика особо опасных инфекций – неотъемлемая часть эпидемиологического надзора на территории Российской Федерации [1]. В рамках Таможенного союза [7] существует положение о порядке проведения санитарно-эпидемиологического контроля в отношении ряда инфекционных болезней, в том числе и мелиоидоза.

Одним из современных наиболее чувствительных иммунологических методов в настоящее время является иммуноферментный анализ (ИФА), который может быть направлен как на поиск специфических антигенных комплексов возбудителя мелиоидоза, так и определение мелиоидозных антител в сыворотках, ликворе или других биологических жидкостях.

Выявлять *B. pseudomallei* и в объектах окружающей среды и в пробах клинического материала позволяет сэндвич-вариант ИФА [8]. Чувствительность реакции во многом зависит от аналитических характеристик используемого в тест-системе конъюгата антител с ферментом пероксидазой хрена. В свою очередь, поликлональные иммуноглобулины повышают чувствительность анализа, но могут в некоторой степени снижать его специфичность, в то время как антитела моноклонального происхождения наиболее специфичны.

Нами было проведено конструирование иммунопероксидазных конъюгатов для сэндвич-варианта ИФА на основе как поли-, так и моноклональных антител.

В качестве поликлональных антител использовали полученные в ходе иммунизации иммуноглобулины козьих иммунных мелиоидозных сывороток. По результатам РИД в геле по Оухтерлони была отобрана сыворотка козья иммунная мелиоидозная с титром антител 1:32. Сывороточные иммуноглобулины выделяли каприловым методом.

Мелиоидозные моноклональные антитела получали путем гибридизации клеток миеломы X63-Ag14 и иммунных спленоцитов сингенных мышей BALB/c [9]. Эффективность слияния составила 86,7%, антитело-продуцирующие гибридомы отбирали по результатам непрямого ТИФМ и клонировали не менее чем 3-кратно методом лимитирующих разведений.

Моноклональные антитела накапливали в асцитической жидкости инбредных мышей после прай-

мирования последних пристаном (*Pristane, synthetic, Sigma*). По данным ИФА, титр мелиоидозных МКА, полученных из асцитической жидкости, составил 1:100 000 и выше. Высаливание моноклональных иммуноглобулинов проводили двукратно насыщенным раствором сульфата аммония.

Концентрация белка в пробах иммуноглобулинов после их осаждения при спектрофотометрическом измерении с использованием калибровки по БСА составила: ПКА = 26,1 мг/мл, МКА = 18,3 мг/мл.

Получение конъюгатов на основе поликлональных иммуноглобулинов и моноклональных антител с ферментом пероксидазой хрена (*Sigma, США*) проводили перйодатным методом (*Mathiesene, 1978*). Пероксидазу хрена активировали путем окисления углеводных фрагментов до альдегидных групп с применением перйодата натрия. Аминогруппы иммуноглобулинов взаимодействовали с образованными альдегидными группами фермента. Полученный комплекс восстанавливали боргидридом натрия до стабильных высокомолекулярных конъюгатов. Очистку осуществляли методом диализа против фосфатного буферного раствора в течение 48 ч.

Полученные иммунопероксидазные конъюгаты на основе как поли-, так и моноклональных антител изучали в ИФА в разведениях от 1:40 до 1:2560. Учет реакции осуществляли на микропланшетном ридере (*Anthos 2020*). Оптическая плотность лунок контролей конъюгата составляла 0,07–0,09. Аналитические характеристики ИПК определяли в сэндвич-варианте ИФА в разведениях 1:80–1:2560.

При оценке чувствительности на наборе штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, представленных в Коллекционном центре ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора, нами установлено, что тест-система с использованием конъюгатов на основе ПКА в рабочем разведении 1:1280 выявляет *B. pseudomallei* в концентрации $1 \cdot 10^4$ м. к./мл и выше. При этом с поликлональным конъюгатом взаимодействовали как возбудители мелиоидоза, так и близкородственные возбудители сапа.

Специфичность иммунопероксидазных конъюгатов была подтверждена отсутствием перекрестных реакций с гетерологичными микроорганизмами (*B. cepacia, P. aeruginosa, P. ovalis, P. fragi*и др.). Таким образом, иммуноферментная тест-система на основе поликлональных сывороточных мелиоидозных козьих антител позволяла одновременно идентифицировать как возбудителей мелиоидоза, так и возбудителей сапа.

Мелиоидозные моноклональные конъюгаты, в отличие от поликлональных, взаимодействовали только с возбудителем мелиоидоза, но чувствительность такого препарата не превышала 105 м. к./мл. Однако при использовании ИПК на основе МКА оптическая плотность контроля конъюгата в некоторых случаях даже превышала оптическую плотность лунок с внесенными образцами, что четко свидетельствовало о конкурентных взаимодействиях иммунопероксидазного моноклонального конъюгата и сорбированных на твердой фазе антител с исследуемым антигеном. По-видимому, это связано с эпитопной однонаправленностью антител I и II порядка. По-видимому, для совершенствования тест-системы требуется подбор комбинаций моноклональных иммуноглобулинов, направленных к различным антигенным детерминантам возбудителя мелиоидоза.

Таким образом, получение иммунопероксидазных конъюгатов с высокими аналитическими характеристиками позволит дополнить имеющиеся лабораторные схемы индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза методом иммуноферментного анализа.

Дальнейшее изучение ИПК на основе моноклональных антител открывает возможности усовершенствования современной лабораторной диагностики заболевания.

Библиографический список

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырёва. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
2. Limmathurotsakul D., Peacock S. J. Melioidosis: a clinical overview // British medical bulletin. – 2011. – Vol. 99. – P. 125–139.
3. Sarkar-Tyson M., Titball R.W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review // Clin. Ther. – 2010. – Vol. 32, N 8. – P. 1437–1445.
4. Anandan S., Augustine A., Mathai E. et al. Evaluation of IgMELISA using a sonicate and a lipopolysaccharide antigen for the serodiagnosis of melioidosis // Indian J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 28, N 2. – P. 158–161.
5. Супотницкий, М.В. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений: монография. – М.: «Кафедра», «Русская панорама», 2013. – 1136 с.

- 6.Новицкая И. В., Липницкий А. В., Храпова Н.П. и др. Иммунологическая диагностика мелиоидоза // Мелиоидоз. Сб. науч. тр. Под ред. Н.Г. Тихонова. - Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во. - 1955. – 224 с.
- 7.Положение о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) за лицами и транспортными средствами, пересекающими таможенную границу Таможенного союза, подконтрольными товарами, перемещаемыми через таможенную границу Таможенного союза и на таможенной территории Таможенного союза (утверждено решением Комиссии таможенного союза от 28 мая 2010 г. №299).
- 8.Schaeffer P. M. ELISA and immuno-polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of melioidosis // Diagn Microbiol Infect Dis.-2013.- Vol. 75, N 2.-P.135–138.
- 9.Shivanand P. Hybridomatechnology for production of monoclonal antibodies // Intern. J. Pharmac. Scien. Rev. & Res. – 2010 - Vol.1, N 2. – P. 88– 94.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИЧ-1 В УСЛОВИЯХ УВЕЛИЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА

**А.В. Тотменин, Е.М. Астахова, В.В. Ивлев, Д.П. Зырянова, М.П. Гашникова,
Е.В. Власов, В.Р. Муранкина, Н.М. Гашникова**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Характерной особенностью многих территориальных эпидемий в последние годы становится увеличение генетической гетерогенности циркулирующих вариантов ВИЧ-1.

Целью настоящей работы являлась оптимизация методических подходов к молекулярно-генетическому исследованию ВИЧ-1 для корректного анализа изменчивости популяции современных распространяющихся вариантов вируса.

Материалы и методы. Проведено исследование геновариантов ВИЧ-1, выделенных из 422 клинических образцов, собранных от ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих на отдельных территориях России (Новосибирской, Томской, Кемеровской, Свердловской, Тюменской областей, Алтайского края) и Республики Узбекистан. Из плазмы крови выделена РНК, для вариантов ВИЧ-1 с помощью лабораторной системы праймеров получены вирусные фрагменты, кодирующие протеазу-ревертазу, интегразу и основной белок оболочки (PRO-RT, IN, env) ВИЧ-1. Для фрагментов ВИЧ-1 определена нуклеотидная последовательность и проведен филогенетический и рекомбинационный анализы.

Результаты исследования. Обследованная группа включала 51,8% мужчин и 48,2% женщин, 64% относились к ПИН, 36% были инфицированы половым путем. Для 79% пациентов диагноз ВИЧ-инфекция был поставлен впервые. Среди ПИН 82% лиц имели практику употребления солевых/синтетических психостимуляторов, 18% ПИН, инфицированных более 7–10 лет назад, употребляли героин. Исследование генетической гетерогенности циркулирующих ВИЧ-1 выявило территориальную специфику их распространения. На всех территориях Сибири (Новосибирская, Томская, Кемеровская области, Алтайский край) преобладает CRF63_02A1 и вторичные рекомбинантные формы ВИЧ-1 на основе CRF63_02A1. Новые рекомбинантные последовательности между субтипами или CRF были проанализированы с помощью программ идентификации рекомбинации (RIPhttp: // www.hiv.lanl.gov), и SimPlot 3.5.1 используя окно 200 нуклеотидов и построением филогенетического дерева NJ, используя двухпараметрическую модель Кимуры. Показано, что в регионах Сибири регистрируются разнообразные уникальные рекомбинантные формы ВИЧ-1 (URF63_A1, URF63_02AG, URF63_B), распространенность которых варьирует от 5% до 20% от общего количества исследованных ВИЧ-1. В отличие от территорий Сибири в Уральском регионе (Тюменская, Свердловская области) доминирует субтип A1 ВИЧ-1 и в единичных случаях выделяются субтип B и URF63_A1 ВИЧ-1. В Республике Узбекистан современную эпидемию определяют специфические среднеазиатские варианты CRF02_AG ВИЧ-1, формирующие свой кластер на филогенетическом дереве. В связи с активными потоками трудовых мигрантов из Средней Азии в Россию и обратно в эти страны эпизодически происходят заносы неспецифических вариантов ВИЧ-1. На территории

ях, характеризующихся высокой активностью распространения ВИЧ-инфекции/распространением ВИЧ в группах лиц рискованного поведения, где одновременно циркулируют отличающиеся геноварианты вируса, как правило, со временем начинается регистрация случаев суперинфекции и появление уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1. Так как геномы URF ВИЧ-1 имеют мозаичную структуру, отличающуюся как по расположению сайтов рекомбинации, так и по их количеству, выявляемость URF ВИЧ-1 в значительной степени зависела от количества и размера исследуемых областей генома вируса. Разработанная нами схема анализа нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1, включающая области PRO-RT (1400–1800 нт), IN (900–1300 нт) и env (700–1500 нт) позволяла по большей части выявлять URF при генотипировании вирусов по отдельным областям их генома. Тем не менее дополнительное осуществление сравнительного ген-специфического определения генотипа вируса по областям PRO, RT, IN и env давало возможность значительно повысить выявляемость вторичных URF ВИЧ-1.

Выводы. Исследование характеристик отдельных территориальных эпидемий ВИЧ-инфекции позволяет заключить, что увеличение генетического разнообразия современных ВИЧ-1 связано как с эволюционными изменениями генома циркулирующих вариантов ВИЧ, так и с появлением большого количества новых рекомбинантных форм вируса, имеющих как повторяющуюся (CRF), так и уникальную (URF) мозаичную структуру генома. В регионах России со значительной распространенностью CRF63_02A1 ВИЧ-1 для корректного выявления URF вируса генотипирование рекомендуется осуществлять одновременно не менее чем по двум отдельным областям генома ВИЧ-1, вовлекая в исследование лиц с повышенными факторами рискованного поведения.

Высокая степень изменчивости ВИЧ-1 и стремительный рост распространенности отличающихся геновариантов вируса на территориях РФ должны быть учтены не только при разработке новых профилактических анти-ВИЧ-препаратов. Изменение в нуклеотидных последовательностях генов-мишеней для ПЦР-диагностики может влиять на качество (чувствительность, количественные характеристики) ПЦР-тестов, что обязано четко отслеживать фирмы-разработчики тест-систем на основе ПЦР.

КОЛЛЕКЦИЯ РОССИЙСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1, ВКЛЮЧАЮЩАЯ СОВРЕМЕННЫЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ ВИРУСА

**Н.В. Унагаева, Н.А. Бледных, П.Ю. Ачигечева, Е.Ф.Бочаров, А.В. Тотменин,
Н.М. Гашникова**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Введение. Выделение изолятов ВИЧ-1 и изучение их биологических свойств крайне важны для более глубокого понимания биологии вируса и мониторинга характеристик распространяющихся вариантов ВИЧ-1. Изучение биологических характеристик циркулирующих и появляющихся новых вариантов ВИЧ-1 представляется крайне актуальным в связи с тем, что генетические варианты вируса могут различаться по своим биологическим свойствам – по скорости эволюции вируса и прогрессирования заболевания, могут иметь преимущества при определенных путях трансмиссии [1].

Целью работы являлось создание коллекции современных изолятов ВИЧ-1, изучение репродуктивных и цитопатических особенностей генетических вариантов А, В и циркулирующей рекомбинантной формы (circulating recombinant forms) CRF63_02A1 ВИЧ-1 при культивировании вирусов на мононуклеарных периферических клетках крови (МПК) и сравнительный анализ биологических характеристик изолятов ВИЧ-1 различных субтипов, выделенных в период с 2009 по 2012 гг.

Материалы и методы. Выделение ВИЧ проводили путем сокультивирования мононуклеаров периферической крови (МПК) инфицированного ВИЧ-пациента и двух серонегативных доноров. Репликацию вируса оценивали иммуноферментным анализом количественного накопления белка р24 ВИЧ-1 в культуральной среде [3].

Результаты и обсуждение. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с 2009 г. на постоянной основе осуществляются работы по созданию репрезентативной коллекции ВИЧ-1. Коллекция содержит 65 современных изолятов ВИЧ-1, выделенных от пациентов, проживающих в Сибирском федеральном округе и других регионах России. Коллекция включает основные генетические варианты циркулирующих в стране ВИЧ-1: субтипы А, В и циркулирующие рекомбинантные формы CRF02_AG и активно распространяющуюся в Сибирском регионе CRF63_02A1.

С 2009 по 2012 гг. для выделения ВИЧ было отобрано 134 образца крови от ВИЧ-инфицированных пациентов в острой начальной стадии (70% образцов) и в стадии хронического течения инфекции (30% образцов). Выделено и описано 65 инфекционных ВИЧ-1: CRF63_02A1 (n=36), субтипа А (n=18), В (n=8) и CRF02_AG (n=3).

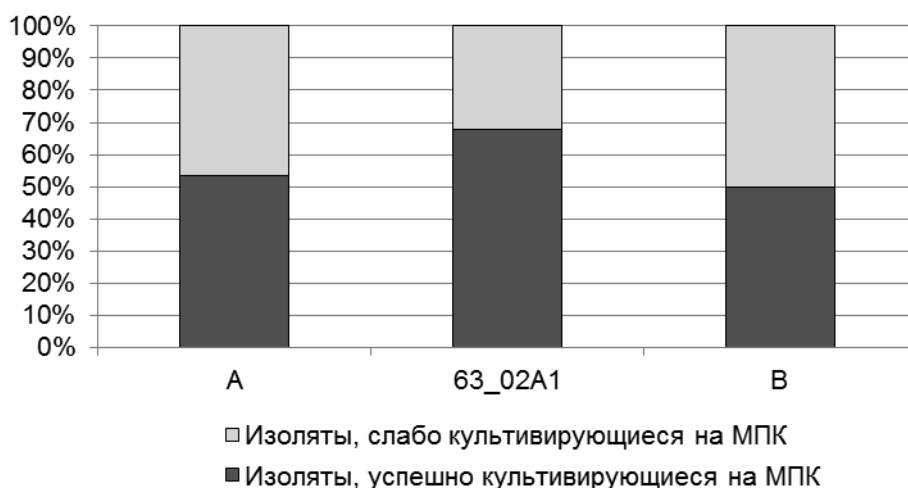


Рис. Эффективность выделения изолятов ВИЧ-1 из клинических образцов крови в 2009-2012 гг.

Эффективность выделения вируса из периферической крови – это процесс, показывающий его способность к воспроизводству, а также его инфекционность. Лучшими репродуктивными свойствами обладали CRF63_02 A1 ВИЧ-1, эффективность выделения которых составила 68%. Среди вирусов субтипа А чаще встречались изоляты, которые слабо культивировались на МПК (количество вируса недостаточно для инфицирования чистой культуры клеток, <20000 пкг в вирусном стоке) они были исключены из коллекции, эффективность выделения составила 53% (рис. 1). Лица, инфицированные субтипом В и CRF02_AG ВИЧ-1, встречались редко, поэтому данные генетические варианты в коллекции представлены в малом количестве. Эффективность выделения изолятов субтипа В составила 50% (рис.).

Нами отмечены следующие особенности динамики роста p24 для изолятов ВИЧ-1 представленных вариантов. Для изолятов CRF63_02 A1 максимальное накопление p24 происходило на 11–17 сутки культивирования, максимум накопления выходит за отметку 500000 пкг (у 8 изолятов из 30). Для субтипа А также характерны высокие темпы роста и концентрации p24, но по динамике накопления наблюдается широкий диапазон скорости выхода в логарифмическую фазу роста. Максимальное накопление белка p24 колеблется между 17 и 27 сутками культивирования. Наблюдая цитопатическое действие вируса на культуре МПК, мы также выявили отличия между субтипами ВИЧ-1. Цитопатическое действие вируса анализировали визуально при микроскопировании инфицированной культуры лимфоцитов периферической крови. Множественные синцитии чаще образовывались на культуре клеток с изолятами ВИЧ-1 субтипа А. При этом наблюдалась ЦПД среднего уровня (гибель клеток, пикноз, клеточный дебрис). На культуре клеток, инфицированной CRF63_02 A1, синцитии обнаруживались единично, эффект ЦПД у большинства изолятов был выражен слабо. Чрезмерное цитопатогенное действие вируса может быть неблагоприятным фактором, влияющим на его репродуктивные функции.

Клеточная культура быстро деградирует и вирус не успевает размножиться и накопиться. Чаще такая картина наблюдалась при изолировании ВИЧ-1, культивирование которых не закончилось успешным выделением вируса. Можно предположить, что умеренная цитодеструкция культуры клеток, напротив, способствует наибольшей репродукции и быстрому размножению ВИЧ-1. Изоляты CRF63_02 A1 показывали описанный выше фенотип. Подобная картина «мягкого» ЦПД и высокой скорости репродукции была замечена в схожих с нашими исследованиях с генетически близким рекомбинантом CRF02_AG [2]. Данное свойство вирусов может способствовать более быстрому распространению их в популяции, что дает им преимущество перед другими вариантами ВИЧ-1.

Выводы. Создана репрезентативная коллекция современных изолятов, включающая субтипы А, В и CRF63_02 A1, CRF02_AG ВИЧ-1, наиболее распространенные в России. Проведено изучение биологических и генетических особенностей первичных изолятов вируса, проанализированы отличия биологических свойств ВИЧ-1, выявленные при культивировании вирусов на МПК. Лучшими репродуктивными свойствами обладали изоляты CRF63_02 A1 ВИЧ-1, накопление вирусного белка р 24 в культуре клеток в высоких концентрациях отмечалось уже на 11–17 сутки культивирования. Новый вариант отличался и по воздействию на клеточную культуру, цитопатическое действие можно было описать как умеренное, без активной цитодеструкции. Для субтипа А ВИЧ-1 характерно выраженное цитопатическое воздействие на клеточную культуру. Субтип А ВИЧ-1 длительное время циркулирует на территории России. Ранее доминировавший в Сибирском регионе, в последние годы субтип А вытесняется новой циркулирующей рекомбинантной формой 63_02 A1 ВИЧ-1. Для изолятов субтипа В был характерен умеренный темп репродукции и средний уровень цитопатического воздействия на клеточную культуру.

Библиографический список

1. Easterbrook P.J., Smith M., Mullen J. et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy // J. Int. AIDS Soc. – 2010. – Vol. 13. doi: 10.1186/1758-2652-13-4
2. Fischetti L., Opare-Sem O., Candotti D. et al. Higher viral load may explain the dominance of CRF02_AG in the molecular epidemiology of HIV in Ghana // AIDS. – 2004. – Vol. 18. – P. 1208–1210.
3. WHO-UNAIDS Guidelines for Standard HIV Isolation and Characterization Procedures // Second Edition, Produced by WHO-UNAIDS HIV Vaccine Initiative. – 2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ЦИРКУЛЯЦИИ НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ НА ТЕРРИТОРИИ МЕГАПОЛИСА

А.В. Устюжанин, А.В. Алимов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев

*ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций»
Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия*

Ежегодные и средние многолетние уровни показателя заболеваемости энтеровирусным менингитом (ЭВМ) в г. Екатеринбурге и Свердловской области многократно превышают значения аналогичных показателей по Российской Федерации, и этому факту до настоящего времени нет достаточно убедительного объяснения.

В период с 2006 г. по 2015 г. в г. Екатеринбурге было отмечено два пика повышения показателей заболеваемости ЭВМ – в 2007 г. и 2013 г., (показатели заболеваемости на 100 тыс. населения 36,06 и 29,92 соответственно).

Целью настоящего исследования явилось определение спектра неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) по данным молекулярно-генетического мониторинга их циркуляции среди населения г. Екатеринбурга в 2006–2015 гг.

Материалы и методы. Всего за период наблюдения исследовано 429 образцов ликвора от больных

ЭВМ и 2 665 проб фекалий, полученных методом случайной выборки в период с июня 2010 г. по декабрь 2015 г. от клинически здоровых детей в возрасте 3–6 лет (индикаторная группа), проживающих на территории г. Екатеринбург.

Выделение вирусной РНК из исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием комплектов реагентов "РИБО-сорб", "РЕВЕРТА-L-100", "АмплиСенс Энтеровирус-207" производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Генотипирование обнаруженных энтеровирусов осуществляли методом прямого секвенирования последовательностей участков генома, кодирующих белки VP1 и VP2 на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по описанной ранее методике и дальнейшего их сравнения с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с последовательностями, депонированными в международном банке генетической информации NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) [1–3].

Результаты

В ликворе больных ЭВМ удалось идентифицировать 373 штамма НПЭВ, относящихся к 18 серотипам вида В, в том числе 7 серотипов, относящихся к плохо культивируемым или некультивируемым (Коксаки А9, ЕСНО2,5,9,14,25, EV97). Наибольшее разнообразие серотипов выявлено в 2012 г. и 2013 г. (13 и 11 серотипов соответственно). На протяжении периода наблюдения ежегодно обнаруживался вирус Коксаки А9, в течение четырех лет подряд – вирусы ЕСНО6 и ЕСНО18. По три года подряд среди этиологических агентов ЭВМ фигурировали вирусы Коксаки В4, В5, ЕСНО14 и ЕСНО30. 73% штаммов было представлено вирусами ЕСНО, что согласуется с данными литературы о преобладании вирусов этой группы в этиологической структуре ЭВМ [4, 5]. Среди вирусов группы ЕСНО ведущая роль принадлежала вирусам ЕСНО6 и ЕСНО30, доля каждого из которых составила 30,1 и 39,9% соответственно от количества обнаруженных в этой группе штаммов, а суммарная доля двух указанных серотипов среди всех идентифицированных штаммов равнялась 51,9%.

Высокая результативность генотипирования и достаточно большое количество идентифицированных штаммов НПЭВ, обнаруженных в ликворе больных ЭВМ позволили сделать заключение о полиэтиологичности ЭВМ в каждом эпидсезоне и выделить группу из четырех возбудителей (Коксаки А9, ЕСНО6,18,30), на долю которых в период наблюдения приходилось более 70% случаев заболевания ЭВМ.

Таким образом, расшифровка этиологической структуры инфекционных заболеваний, вызываемых НПЭВ как одна из задач программы эпидемиологического надзора может быть успешно решена путем широкого внедрения в практику вирусологических лабораторий современных методов молекулярно-генетического исследования. Однако решение основной задачи – прогнозирование развития эпидемического процесса по заболеваемости ЭВИ – остается весьма затруднительным без достаточно полного представления об интенсивности циркуляции и спектре циркулирующих серотипов НПЭВ на популяционном уровне.

Поскольку результаты вирусологического исследования сточных вод в этом отношении являются малоинформативными, единственным подходом к получению достоверной оперативной информации об особенностях развития эпидемического процесса, позволяющей приблизиться к решению вопроса прогнозирования уровня заболеваемости, является, по нашему мнению, мониторинг интенсивности циркуляции и спектра НПЭВ среди практически здорового населения.

Результаты длительного непрерывного мониторинга циркуляции НПЭВ среди здорового населения показали, что спектр серотипов НПЭВ, обнаруженных в фекалиях клинически здоровых детей индикаторной группы, отличается большим разнообразием (25 серотипов, относящихся к видам А, В и С) в основном за счет преобладания вирусов Коксаки группы А (12 из 25 серотипов).

Сравнительный анализ частоты обнаружения отдельных серотипов НПЭВ у больных ЭВМ и практически здоровых лиц показал, что в 2012 г. доминирующим серотипом, изолированным как от больных, так и от здоровых лиц практически в равном проценте случаев (41,1% и 41,6% соответственно) был геновариант «С» вируса ЕСНО6. В 2013 г. эпидемический подъем заболеваемости был связан с импортиацией и активным включением в циркуляцию ранее не встречавшегося на территории Свердловской области геноварианта «h» вируса ЕСНО30, на долю которого приходилось 58,5% случаев ЭВМ. В то же время у здоровых носителей данный серотип обнаруживался в 5 раз реже (12%). Такое существенное различие в частоте обнаружения штамма энтеровируса в группах больных и здоровых

лиц может свидетельствовать в пользу высокой вирулентности включившегося в циркуляцию штамма вируса ЕСНО30, генетически родственного штаммам, выделенным в 2012 г. во время крупной эпидемической вспышки ЭВМ в Китае.

Библиографический список

1. Устюжанин А.В., Резайкин А.В., Снитковская Т.Э. и др. Анализ филогенетических связей энтеровирусов, выделенных от больных серозным менингитом в г. Екатеринбурге и Свердловской области в 2008 г. // Уральский медицинский журнал. – 2011. – №13(91). – С. 19–24.
2. Arola A., Santti J., Ruuskanen O. et al. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34. – P. 313–318.
3. Casas I., Palacios G.F., Trallero G. et al. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products // J. Med. Virol. – 2002. – Vol. 65. – P. 138–148.
4. Кожевникова Н.В., Резник В.И., Воронкова Г.М. и др. Проявления эпидемического процесса энтеровирусных инфекций в Дальневосточном федеральном округе // Дальневост. журн. инф. патологии. – 2008. – № 13 – С. 9–17.
5. Троценко О.Е., Каравянская Т.Н., Отт В.А. и др. Многолетний анализ проявлений эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Хабаровском крае и основные факторы, определяющие ухудшение эпидемиологической ситуации в условиях наводнения // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – № 1. – С. 75–78.

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА: *EX VIVO* КУЛЬТУРЫ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ИЗ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЗАРАЖЕННОСТИ *Mycobacterium* *TUBERCULOSIS* КЛЕТОК–ХОЗЯЕВ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАТОГЕНА

Е.Г. Уфимцева^{1,2}, Н.И. Еремеева², М.А. Кравченко², С.Н. Скорняков²

¹ФГБНУ НИИ биохимии, Новосибирск; ²ФГБУ УНИИ фтизиопульмонологии Минздрава
России, Екатеринбург, Россия

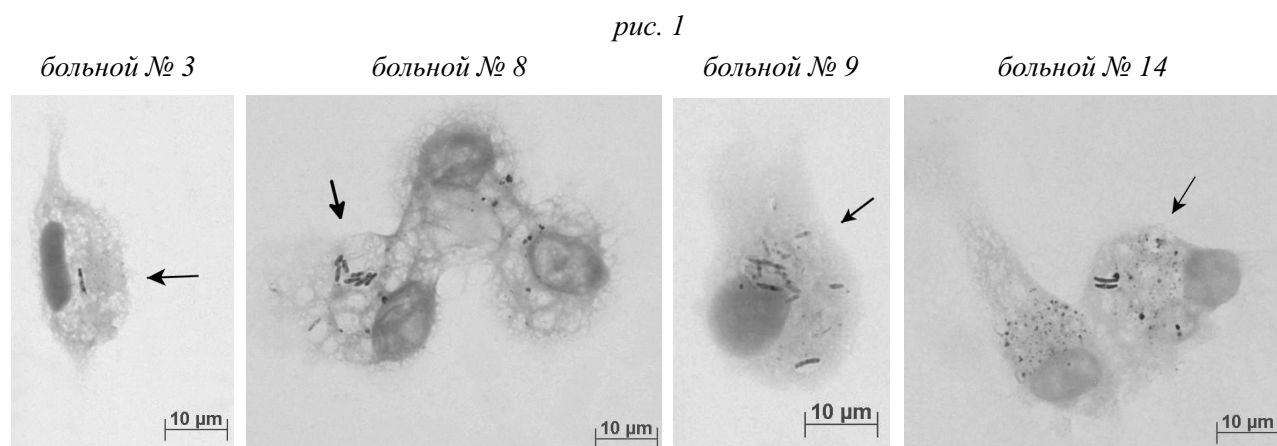
Туберкулез (ТБ), возбудителем которого является паразитарная бактерия *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), уносит ежегодно около 2 млн. человеческих жизней и занимает лидирующие позиции по числу смертей от инфекционного заболевания, вызываемого одним возбудителем [1]. В настоящее время отмечено появление и широкое распространение мультирезистентных штаммов Mtb, устойчивых одновременно к нескольким лекарственным препаратам [1]. В основе развития ТБ лежит внутриклеточная персистенция микобактерий в макрофагах организма–хозяина [2]. Макрофаги являются клетками врожденного иммунного ответа и участвуют в защитной реакции организма, направленной на уничтожение фагоцитированных инфекционных агентов, в том числе Mtb. Однако при заражении Mtb в некоторых макрофагах происходит выживание и размножение патогена [2, 3]. Несмотря на важность контроля количества и состояния Mtb в альвеолярных макрофагах больных с различными формами остро прогрессирующего легочного туберкулеза, немного известно об их содержании и функциональном статусе в клетках человека – носителя инфекции [2, 3]. Принятая в мае 2014 г. на ассамблее ВОЗ новая стратегия борьбы с ТБ [4], направленная на значительное снижение как заболеваемости, так и смертности от ТБ к 2035 г., требует разработки новых методов анализа как зараженности Mtb клеток–хозяев в организме человека, так и определения вирулентности патогена как основных факторов, влияющих на течение инфекции и исход заболевания, в том числе при активизации туберкулезного процесса в легких пациентов.

Опираясь на опыт работы в культуре *ex vivo* с гранулематозными воспалительными образованиями мышей с латентной туберкулезной инфекцией [5–7], мы разработали способ получения культур аль-

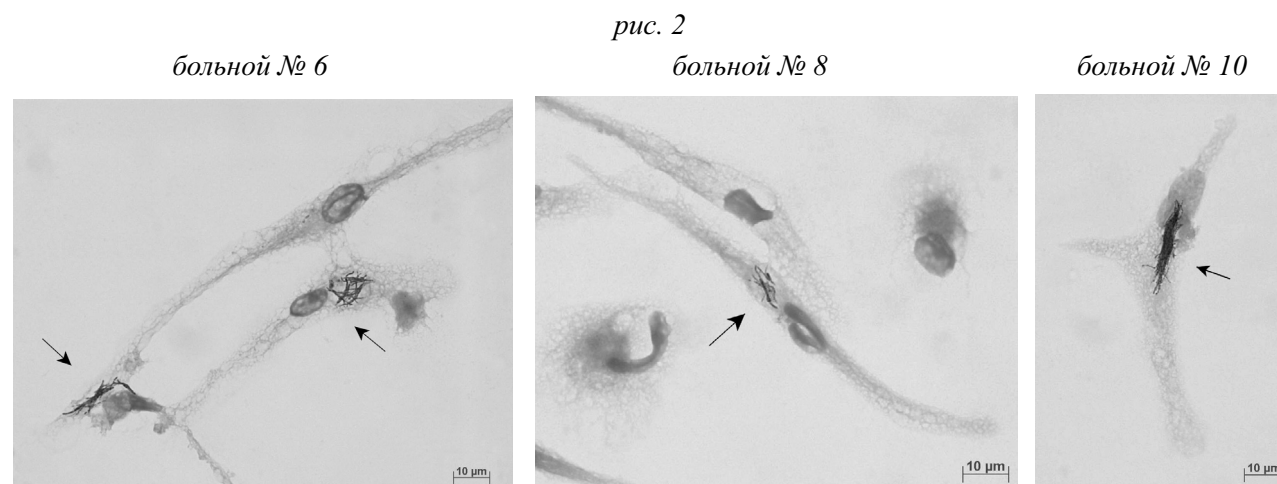
веолярных макрофагов из операционного материала больных ТБ легких для оценки зараженности Mtb клеток-хозяев из прооперированных пациентов с определением функционального статуса возбудителя заболевания [8]. Все исследования были проведены с соблюдением этических норм, определенных Хельсинской декларацией прав человека. Из вырезанного небольшого участка ткани резецированной в ходе плановой операции части легкого больного ТБ выделяли клетки и высаживали их на покровные стекла. Клетки культивировали при +37 °C в CO₂-инкубаторе. Все среды, сыворотки и другие добавки для культивирования клеток были компании Биолот (г. Санкт-Петербург, Россия).

Полученные *ex vivo* культуры клеток от 21 больного ТБ легких на 90–99% состояли из макрофагов с небольшим числом дендритных клеток, многоядерных клеток Пирогова–Лангханса, фибробластов, нейтрофилов и лимфоцитов. После 16–18 ч в культуре *ex vivo* клетки на покровных стеклах фиксировали и окрашивали на кислотоустойчивые микобактерии по методу Циля–Нильсена или с использованием антител и красителей на различные маркеры. Все альвеолярные макрофаги содержали CD14 рецептор к бактериальному липополисахариду – основной маркер моноцитарно-макрофагальных клеток человека.

Цикл размножения Mtb в благоприятных условиях составляет, как правило, не менее 22–24 ч, следовательно, проанализировали зараженность Mtb макрофагов легких, характерную для организма больного на момент оперативного вмешательства. На рис. 1 на макрофаги пациентов с кислотоустойчивыми Mtb с неповрежденной клеточной стенкой указывают черные стрелки.



Исследованные культуры клеток содержали разное количество альвеолярных макрофагов с Mtb (от 0,11% от исследованных клеток у больной № 12 до 37,72% у больного № 6). Также макрофаги больных ТБ легких содержали разное число Mtb, которые могли располагаться и одиночно и в колониях (рис. 1). Микобактерии в клетках разных больных морфологически отличались, образуя у некоторых пациентов корды, когда размножающиеся в колониях Mtb выстраивались вдоль своих длинных осей, заплетаясь в косы. На рис. 2 макрофаги с корд-морфологией колоний Mtb отмечены черными стрелками.



Образование кордов является признаком повышенной вирулентности *Mtb* [9, 10]. По наличию корд–морфологии колоний размножающихся *Mtb* сделали выводы о вирулентности возбудителя заболевания у прооперированных больных ТБ легких. В результате по совокупности полученных данных указали на повышенную эпидемиологическую опасность некоторых пациентов для окружающих их людей, в том числе и для персонала фтизиатрической клиники.

Таким образом, с помощью разработанного нами способа *ex vivo* получения культур альвеолярных макрофагов впервые в мире оценили зараженность микобактериями клеток–хозяев в легких прооперированных пациентов с ТБ легких и определили функциональный статус патогена. В целом, предложенный нами анализ может быть использован как один из составляющих в принятии решений по проведению и корректировке дальнейших профилактических, эпидемиологических и лечебных мероприятий, направленных на излечение больных ТБ легких.

Библиографический список

1. WHO, 2014: www.who.int/tb/publications/global_report
2. Cheallaigh C.N., de Castro C.P., Coleman M.M. et al. Macrophages and tuberculosis // Handbook of macrophages / Ed.: R. Takahashi, H. Kai, Nova Science Publishers, 2012. – P. 1–41.
3. Xu G., Wang J., Gao G.F., Liu C.H. Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages // Protein & Cell. – 2014. – Vol. 5, N 10. – P. 728–736.
4. Lienhardt C., Lönnroth K., Menzies D. et al. Translational research for tuberculosis elimination: priorities, challenges, and actions // PLoS Medicine. – 2016. – Vol. 13, N 3. e1001965.1. – 11 p.
5. Ufimtseva E. Investigation of functional activity of cells in granulomatous inflammatory lesions from mice with latent tuberculous infection in the new *ex vivo* model // Clin. Dev. Immunol. – 2013. – Article ID371249. – 14 p.
6. Ufimtseva E. *Mycobacterium*-host cell relationships in granulomatous lesions in a mouse model of latent tuberculous infection // BioMed Res. Int. – 2014. – Article 948131. – 16 p.
7. Ufimtseva E. Differences between *Mycobacterium*-host cell relationships in latent tuberculous infection of mice *ex vivo* and mycobacterial infection of mouse cells *in vitro* // J. Immunol. Res. – 2016. – Article ID 4325646. – 21 p.
8. Уфимцева Е.Г., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Скорняков С.Н. Способ получения *ex vivo* культур альвеолярных макрофагов из операционного материала больных туберкулезом легких и способ оценки вирулентности *Mycobacterium tuberculosis* с использованием полученных *ex vivo* культур альвеолярных макрофагов // Решение Федеральной службы по интеллектуальной собственности Российской Федерации о выдаче патента от 12 мая 2016 г.
9. Middlebrook G., Dubos R. J., Pierce C. Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli // J. Exp. Med. – 1947. – Vol. 86, N 2. – P. 175–184.
10. Connolly L. E., Edelstein P. H., Ramakrishnan L. Why is long-term therapy required to cure tuberculosis? // PLoS Medicine. – 2007. – Vol. 4, N 3. – Article ID e120. – 8 p.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИОЗОВ

М.В. Чеснокова¹, В.Т. Климов¹, Т.В. Каримова², Л.К. Иванова²

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Иркутск; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской
области», Новосибирск, Россия

Yersinia pseudotuberculosis и *Y. enterocolitica* являются зоонозами, однако их эпизоотическая активность до сих пор мало прогнозируема, выделение патогенов из объектов окружающей среды носит редкий, случайный характер даже при вспышечной заболеваемости. В связи с этим приоритетными направлениями эпидемиологического надзора за иерсиниозами наряду с эпидемиологическим слежением за заболеваемостью должен стать молекулярно-генетический мониторинг за распространением

энтеропатогенных иерсиний и идентификацией.

В течение 2010–2015 гг. в природных и антропоургических очагах девяти территорий Сибири и Дальнего Востока (Иркутская, Амурская, Тюменская, Новосибирская, Сахалинская области, Забайкальский, Приморский края, Республика Тыва, Ханты-Мансийский АО) проведено лабораторное исследование на иерсинии 1980 экз. мелких млекопитающих 112 проб копрофильтратов и 61 сыворотка крови людей (БА, ПЦР, MALDI-ToF MS). В Новосибирской области в 2013–2014 гг. отстрелены и исследованы (БА, ПЦР) 55 диких мигрирующих птиц пяти видов: 43 грача (*Corvus*), семь уток (*Anas* spp.), три чайки (*Larus* spp.), по одному кулику (*Actitis*) и чибису (*Vanellus*). Для изучения возможного эпидемиологического риска передачи кишечного иерсиниоза проведены исследования (БА, ПЦР) 99 смывов с тушек кур из Р. Бурятия. Всего за этот период изолировано 67 штаммов *Yersinia* spp., проведена их расширенная идентификация и изучение молекулярно-генетических свойств (био-серотипирование, факторы патогенности), в т.ч. восемь свежeweыделенных вспышечных штаммов исследованы методом PFGE и VNTR. Изучена молекулярно-генетическая характеристика 447 штаммов *Y. enterocolitica*, изолированных с 1970–2015 гг.

Проведенные исследования позволили установить, что заболеваемость псевдотуберкулезом в сибирском и дальневосточном регионах превалирует над заболеваемостью кишечным иерсиниозом и составляет соответственно $7,08 \pm 0,15$ и $3,07 \pm 0,10^{0/0000}$. При этом среднесуточный уровень заболеваемости псевдотуберкулезом в Сибири и на Дальнем Востоке превышает среднероссийский показатель соответственно в 3,0 и 1,8 раза; заболеваемость же кишечным иерсиниозом находится на уровне среднероссийского показателя. Несмотря на тенденцию к снижению заболеваемости псевдотуберкулезом можно констатировать активность антропоургических очагов с высоким эпидемиологическим потенциалом на территориях Томской, Новосибирской, Кемеровской, Сахалинской областей и Республики Хакасия. Заболеваемость кишечным иерсиниозом не имеет тенденции к снижению и с 2008 г. характеризуется стабилизацией эпидемического процесса. Дополнительно к вышеперечисленным территориям высокий уровень заболеваемости сохраняется в Приморском крае и Ханты-Мансийском АО, а в Ямало-Ненецком АО, Новосибирской, Сахалинской и Томской областях выявлен рост заболеваемости. Установлено, что снижение заболеваемости псевдотуберкулезом происходило за счет детского населения, поскольку заболеваемость взрослых оставалась стабильной. Что касается кишечного иерсиниоза, то динамика заболеваемости детей и взрослых имела синхронный характер при превалировании случаев заболеваний среди детей до 17 лет.

Основным эпидемиологическим проявлением псевдотуберкулеза остается вспышечная заболеваемость. Результаты комплексного применения ПЦР и бактериологического метода достоверно подтверждают значимость капусты, репчатого лука и моркови как основных факторов передачи псевдотуберкулеза, при этом инфицированность овощей и мелких млекопитающих методом ПЦР установлена в 9,2% и 4,0% , бактериологическим методом – в 0,41% и 1,72% соответственно. Все штаммы *Y. pseudotuberculosis*, изолированные на вспышках, были O:1b серогенотипа первой геногруппы (*pYV*⁺, *umpA*⁺, *HPI*), по плазмидному спектру с одинаковой частотой относились к одноплазмидным (47 МДа) или двухплазмидным (47:82 МДа) штаммам [2].

Всего за период наблюдения выделено 67 культур иерсиний (2,98% от числа исследованных проб): девять *Y. pseudotuberculosis* (0,40%), 45 *Y. enterocolitica* (2,0%), в т.ч. 11 патогенных (24,4%), 12 *Y. kristensenii* (0,53%) и один штамм *Y. intermedia* (0,04%). На энтеропатогенные иерсинии получено 272 положительных результата в ПЦР (11,7%): 63 (2,7%) на *Y. pseudotuberculosis* и 209 (9,0%) – на *Y. enterocolitica*.

От людей изолировано три штамма *Y. pseudotuberculosis* в Иркутской области: один штамм *Y. pseudotuberculosis* O:1a, остальные два штамма относились к O:1b серовару. От мелких млекопитающих выделены четыре *Y. pseudotuberculosis* O:3 в Иркутской области и один штамм O:4a в Забайкальском крае. Определены детерминанты патогенности выделенных штаммов. Плазмида pVM (82 МДа) присутствовала в одном штамме O:1b (больной, Иркутск), но отсутствовала в аналогичном по серогруппе штамме, изолированном от больного в Зиминском районе Иркутской области. *Y. pseudotuberculosis* O:1a характеризовался наличием острова высокой патогенности HPI и не имел гена суперантигена *umpA/C*. У других штаммов, изолированных от людей и мелких млекопитающих, присутствовали суперантиген *umpA/C*, ген инвазивности *inv*, остров патогенности YAPI, детерминирующий пили IV типа, плазмида вирулентности pYV (47 МДа) и отсутствовал остров высокой патогенности HPI, за исключением

штаммов *Y. pseudotuberculosis* O:3, содержащих усеченный остров HPI.

Патогенные *Y. enterocolitica* выделены от мелких млекопитающих в Иркутской области (пять штаммов O:3/3), Республике Тыва (по одному штамму O:3/4 и O:9/2) и Ханты-Мансийском АО (один штамм O:9/2 штаммов). Все изоляты имели плазмиду вирулентности pYV (47 MDa), ген токсина *ystA* и ген адгезии-инвазии *ail*.

Из смыва с тушек кур в Республике Бурятия выделен штамм *Y. enterocolitica* O:9/2, который характеризовался комплексом молекулярно-генетических (*ail*, *ystA*) и фенотипических (Ca^{2+} -зависимость и аутоагглютинация) признаков, что показывает реальную роль мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза [1].

Проведенные исследования диких мигрирующих птиц Новосибирской области позволили изолировать от них энтеропатогенные иерсинии (по одному штамму *Y. pseudotuberculosis* O:1 и патогенной *Y. enterocolitica*), а также обнаружить специфическую ДНК, характеризующуюся наличием всех (*ail*, *ystA*, *yadA*) или некоторых генов (*ail* или *ystA*) патогенных иерсиний (23,9%), что подтверждает роль птиц как природного резервуара патогенных иерсиний [3]. Диких птиц, наряду с исследованием мелких млекопитающих, можно рекомендовать для включения в систему мониторинга природных и антропоургических очагов иерсиниозов для уточнения их эпидемиологического значения на других территориях Сибири и Дальнего Востока.

Изучено 447 штаммов *Y. enterocolitica* биотипов 1А и 2-4, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке. Большинство штаммов принадлежало к серотипам O:3; O:9; O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8. Использование дифференцирующих тестов фукозы и сорбозы позволило идентифицировать два новых для РФ вида – *Y. mollaretii* и *Y. bercovierii*. Для 47 штаммов проведено фаготипирование. У штаммов биотипа 1А определены фаготипы Хz и Х0. *Y. enterocolitica* 2-4 биотипов характеризовались фаготипами VIII, Х3, встречающимися в других странах, и фаготипом Хz, распространенным только в России, эксклюзивно характерного именно для этого биотипа. *Y. enterocolitica* 2-4 биотипов всегда содержат плазмиду pYV и хромосомные гены *ail* и *ystA*.

Эпидемически значимым маркером для *Y. enterocolitica* 1А служит наличие гена *ystB*, который выявлен у 82,0% штаммов биотипа 1А, включая 14 штаммов от больных, изолированных в Новосибирской области и Алтайском крае. При этом заболевания сопровождались выраженной клинической симптоматикой энтерита и энтероколита.



Рис. 1. Дендрограмма, характеризующая степень родства исследуемых штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* в Сибири

В качестве дополнительного методического приема для установления эпидемиологических связей мы применили VNTR-типирование при анализе штаммов на трех вспышках в Новосибирской (2011 г.), Тюменской (2012 г.) и Иркутской (1993 г.) областях, а пульс-электрофорез – при изучении штаммов, изолированных на вспышке в Новосибирской области (2011 г.). Штаммы, изолированные на вспышках, формировали отдельные характерные кластеры для каждого «события» (рис. 1).

Выявленные в результате пульс-электрофореза электрофоретические паттерны штаммов, изолированные от пациентов, и вероятного фактора передачи в Новосибирской области, позволили достоверно

подтвердить единый фактор передачи для заболевших, которым явился репчатый лук (рис. 2).

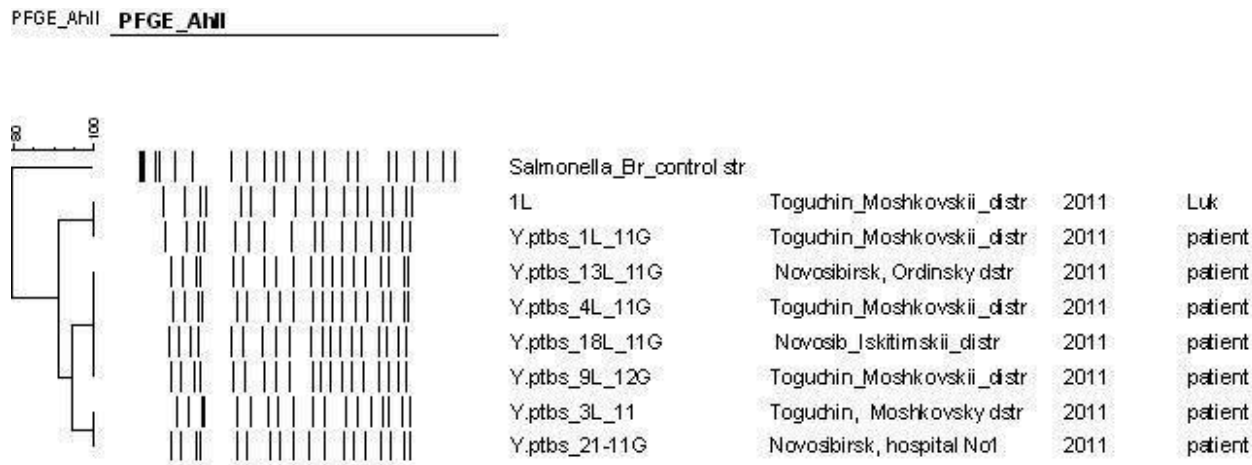


Рис. 2. Дендрограмма, характеризующая степень родства исследуемых штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* в период вспышки псевдотуберкулеза в Тогучинском районе Новосибирской области в 2011 г.

Полученные результаты продемонстрировали родство исследуемых штаммов для каждой эпидемиологической вспышки, свидетельствуя о генотипической идентичности штаммов, что подтверждает моноэтиологичность, характерную для вспышек пищевого происхождения.

Библиографический список

1. Каримова Т.В., Климов В.Т., Чеснокова М.В., Черепанова М.Б. Потенциальная опасность мяса птицы как фактора передачи кишечного иерсиниоза // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – № 4 (77). – С. 57–60.
2. Чеснокова М.В., Климов В.Т., Каримова Т.В. Эпидемиологическая и лабораторная диагностика вспышек псевдотуберкулеза // Сборник статей в области санитарии и карантина на приграничных территориях между Россией и Китаем (в память 20-летнего сотрудничества в области санитарии и карантина между Россией и Китаем). – Китай, Харбин. 2012. – С. 502–514.
3. Kawaoka Y., Otsuki K., Mitani T. et al. Migratory waterfowl as flying reservoirs of *Yersinia* species. – Res Vet Sci. – 1984. – Vol. 37, N 3. – P. 266–268.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ В 2015 Г.

Н.В. Яковчиц, Р.В. Адельшин, О.В. Мельникова, Е.И. Андаев

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Иркутск, Россия

Начало XXI века ознаменовалось активизацией природных очагов бешенства. Если в период с 1983 по 2002 гг. в Восточно-Сибирском экономическом регионе выявлено 32 экз. больных животных, то с 2003 по 2006 гг. их количество составило 226 экз. [1]. В 2011–2012 гг. на территории Республики Бурятия впервые с 1981 г. произошла крупная вспышка бешенства, вызванная генетической линией вируса, близкородственной к монгольским изолятам [2].

В связи с этим актуальным является изучение филогенетических отношений возбудителя, позволяющее установить направление распространения эпизоотии.

Нами были определены нуклеотидные последовательности гена N (1353 п.н.) восьми изолятов вируса бешенства от диких и домашних животных: четырех диких лисиц из Республики Хакасия и одной

дикой лисицы и трех голов крупного рогатого скота из Забайкальского края. Для получения ПЦР-продуктов и секвенирующей реакции использовали праймеры [3]:

Rab1f ACGCTTAACAACAAAATCATAGAAG

Rab1r GCCGGAACCTACGACATGTT

Rab2fbis ATGACAACCTACAAAATGTGYGC

Rab2rbis ATGAGCAAGATCTTCGTCAATCC

Секвенирующую реакцию проводили с набором реактивов BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 1.1. (Applied Biosystems) на генетическом анализаторе ABI Genetic Analyzer 3500 xL. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программы BioEdit v. 7.1.5.0, для филогенетического анализа использовали программу MEGA 5.

На филогенетическом древе, построенном по методу максимального правдоподобия, исследованные образцы разделились на две группы. Все образцы из Забайкальского края кластеризуются в одну подгруппу с семью штаммами, изолированными в 2012-2013 гг. на территории Внутренней Монголии (КНР), которая граничит с РФ. Анализ показал, что нуклеотидные последовательности вирусов из Китая являются эволюционно более молодыми по сравнению с изолятами с территории Забайкальского края, выделенными тремя годами позже. Данная подгруппа входит в обширную группу, включающую нуклеотидные последовательности вирусов бешенства, изолированных в разное время в Монголии и образцов 2011-2012 гг. из Республики Бурятия, исследованных ранее [2].

Последовательности гена N изолятов с территории Республики Хакасия образуют отдельную группу, в которую входят образцы 2002 г. из Республики Тыва и Красноярского края. Данный факт свидетельствует о существовании отдельных генетических линий вируса, и обмен возбудителем между природными очагами отсутствует. Возможно, что причиной этого является природный барьер в виде Восточного Саяна и Хангайских гор.

Библиографический список

1. Сидорова Д.Г., Сидоров Г.Н., Полешук Е.М., Колычев Н.М. Бешенство в Восточной Сибири в XX – начале XXI веков // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – №3. – С. 168–172.
2. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Trushina Y. N. et al. A new outbreak of fox rabies at the Russian–Mongolian border // *Virologica sinica*. – 2015. – Vol. 30, N 4. – P. 313–315
3. Poleshchuk E. M., Deviatkin A. A., Dedkov V. G. et al. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia // *Genome Announcements*. – 2013. – Vol. 1, N 3. – P 1–2.

РАЗДЕЛ 5.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ СРЕДСТВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ОСНОВАННЫХ НА НОВЕЙШИХ ТЕХНОЛОГИЯХ И ДОСТИЖЕНИЯХ НАУКИ

РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ РАНЕЕ НЕ ВЫЯВЛЯЕМЫХ ГАСТРОВИРУСОВ

И.В. Бабкин¹, С.Н. Соколов², Е.В. Жираковская¹, А.Ю. Тикунов¹, Н.В. Тикунова¹

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Вирусные гастроэнтериты являются широко распространенными заболеваниями детей младшего возраста. Многочисленные научно-исследовательские работы посвящены выявлению разнообразия вирусов, вызывающих поражение гастроинтестинального тракта. Было установлено, что вклад вирусных агентов отличается для различных территорий, но основной причиной в большинстве случаев являются вирусы человека: ротавирус А (HRV-A), астровирус (HAsV) и норовирус геногруппы GII (HNoVGII). При этом HRV-A и HAsV вызывают заболевания в основном у детей младшего возраста, а HNoVGII ответственен за вспышки заболеваний и детей, и взрослых [1]. Однако вклад других патогенных гастровирусов человека часто не оценивается и мало изучен. К редко встречающимся гастровирусам человека, обнаруживаемым в образцах от больных, относятся бокавирус (HBoV), норовирус геногруппы GI (HNoVGI), саповирус (SaV), парэховирус (HPeV), энтеровирус (EV), аденовирус F (HAdV-F) и другие. Несмотря на меньшую встречаемость, эти вирусы также представляют угрозу здоровью в первую очередь для детей младшего возраста и требуют их выявления и мониторинга при эпидемиологических исследованиях. Наше исследование было посвящено выявлению как часто, так и редко встречающихся гастровирусов человека, выделенных из образцов от большого количества больных детей младшего возраста.

Для сравнительного исследования встречаемости различных гастровирусов были отобраны 304 образца фекалий детей из г. Новосибирска (Россия), госпитализированных с острым гастроэнтеритом в период от 30 декабря 2011 г. до 18 марта 2012 г. Зимний сезон был выбран для изучения, так как в этот период детектируется рост выявляемых случаев вирусного гастроэнтерита. 175 образцов были получены от детей мужского пола и 129 – от детей женского пола. Возраст детей был от 4 дней до 3 лет.

На первом этапе была проведена детекция наиболее распространенных гастровирусов человека – ротавируса А, астровируса и норовируса геногруппы GII. Показано, что ротавирус А был обнаружен в 94 образцах, что составило 30.9%, астровирус – в 7 случаях (2.3%) и норовирус геногруппы GII – в 10 образцах (3.3%).

Для детекции редко встречающихся гастровирусов все образцы были проверены на наличие нуклеиновых кислот таких вирусов человека, как бокавирус, норовирус геногруппы GI, саповирус, парэховирус, энтеровирус и аденовирус F.

Вирусы человека бокавирус, парэховирус, энтеровирус и аденовирус F выявлялись использованием вирусспецифичных праймеров, описанных в литературе ранее [2 – 5]. Выявление саповируса человека и норовируса человека геногруппы GI проводили на основе оригинальных праймеров. Для этого на основе выравнивания всех известных в базе данных GeneBank последовательностей саповируса человека в программе Oligo 6.0 были разработаны праймеры Sap_U20 5' GGCCTACCATCDGGVATGCC 3' и Sap_L23 5' CAWTRCCCTCCATYTCAAACACT 3', обеспечивающие в ОТ-ПЦР получение специфического продукта длиной 664 п.н. Затем на основе выравнивания известных последовательностей норовируса человека геногруппы GI были рассчитаны праймеры Noro_GI_U25 5' TGTAATGATGATGGCGTCTAAGGA 3' и Noro_GI_L26 5' ACAAATATCACCGGGGG TRTTRTT 3', образующие в ОТ-ПЦР синтез специфического продукта длиной 246 п.н.

Таким образом, была проведена детекция шести редко встречающихся гастровирусов в 304 образцах от больных детей. При выполненном исследовании обнаружены вирусы человека: парэховирус – в 8 образцах (2.6%), саповирус – в 4 образцах (1.3%), аденовирус F – в 5 образцах (1.6%), норовирус геногруппы GI – в 1 образце, энтеровирус – в 1 образце (0.3%). В этих 304 клинических образцах не было обнаружено бокавируса человека. Следует отметить, что в изучаемый эпидемиологический сезон выявляемость парэховируса человека (2.6%), превысила таковую для обычно часто встречающегося астровируса человека (2.3%). Полученные данные о встречаемости парэховируса человека в зимний период 2011 – 2012 гг. свидетельствуют о его достаточно широком распространении в г. Новосибирске, делая необходимым мониторинг этого вируса на данной территории.

Идентифицированы вирусы человека, вызывающие острые кишечные инфекции у детей младшего возраста в г. Новосибирске в зимний период от 30 декабря 2011 г. до 18 марта 2012 г. Часто встречаемыми вирусами человека оказались ротавирус А (30.9%), норовирус геногруппы GI (3.3%), парэховирус человека (2.6%) и астровирус (2.3%). Среди других гастровирусов человека были обнаружены саповирус (1.3%), аденовирус F (1.6%) и в единичных случаях энтеровирус и норовирус человека геногруппы GI.

Библиографический список

1. Жираковская Е.В., Тикунов А.Ю., Курильщикова А.М. и др. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у взрослых в Новосибирске // Инфекционные болезни. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 31–37.
2. Зверев В.В., Голицына Л.Н., Фомина С.Г. и др. Генотипирование парэховирусов методом ПЦР // Медицинский альманах. – 2010. – № 2. – С. 260–262.
3. Kapoor A., Slikas E., Simmonds P. et al. A newly identified bocavirus species in human stool // J. Infect. Dis. – 2009. – V. 199. – P. 196–200.
4. Xu W., McDonough M.C., Erdman D.D. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay // J. Clin. Microbiol. – 2000. – V. 38. – P. 4114–4120.
5. Oberste M.S., Nix W.A., Maher K., Pallansch M.A. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing // J. Clin. Virol. – 2003. – V. 26. – P. 375–377.

РАЗРАБОТКА БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ОРТОПОКСВИРУСОВ

**И.К. Байков¹, Л.А. Франк², Л.П. Буракова², А.Н. Кудрявцев², Я.А. Хлусевич¹,
В.В. Морозова¹, Н.В. Тикунова¹**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск; ²ФГБУН Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия

Разработка биолюминесцентных методов иммуноанализа является одним из перспективных направлений современной диагностики заболеваний и инфекционных агентов. Использование биолюминесцентных меток в качестве репортерных групп по сравнению с ферментативными метками позво-

ляет повысить чувствительность метода анализа. В данной работе были созданы биолюминесцентные сенсоры против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и против ортопоксвирусов.

Сконструированные биолюминесцентные сенсоры представляют собой гибридные белки, в которых одноцепочечное антитело объединено с модифицированной люциферазой Rm7 коралла *Renilla muelleri* [1]. Иммуноглобулиновая часть обеспечивает связывание сенсора с антигеном, а люцифераза выполняет роль сигнальной молекулы, которая способна окислять субстрат целентеразин с излучением света, регистрируемого люминометром. Для создания плазмид, кодирующих биолюминесцентные сенсоры, был использован ген, кодирующий одноцепочечное антитело sc14D5a, созданное на основе мышинного моноклонального антитела 14D5 [2] и обладающее высоким сродством к гликопротеину Е ВКЭ, а также ген, кодирующий одноцепочечное антитело sc1A, направленное к консервативному участку иммунодоминантного белка р35 ортопоксвирусов. Белки получали в бактериальной системе экспрессии, основанной на штамме *E. coli* Rosetta-gami 2, и выделяли хроматографией. Сродство биолюминесцентного сенсора sc14D5a-Rm7 к белку Е ВКЭ составило $2,65 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ и практически не отличалось от сродства одноцепочечного антитела sc14D5a к белку Е. Для биолюминесцентного сенсора sc1A-Rm7 против ортопоксвирусов была исследована способность связываться с белком р35d ортопоксвирусов, однако активность оказалась низкой.

На основе сенсора sc14D5a-Rm7 был разработан метод биолюминесцентного сэндвич-иммуноанализа, позволяющий выявлять нативный гликопротеин Е в образцах. При анализе последовательных разведений гликопротеина Е было показано, что биолюминесцентный метод обладает чувствительностью 0,06 нг белка/100 мкл образца, в то время как аналогичная коммерческая тест-система, основанная на сэндвич-ИФА, показала чувствительность 0,25 нг белка на 100 мкл образца. Другим преимуществом разработанного метода является высокая скорость его выполнения. На выполнение анализа биолюминесцентным методом с учётом подготовки проб необходим 1 ч, в то время как анализ клещей известными коммерческими тест-системами требует более 3 ч.

С помощью разработанного биолюминесцентного метода были проанализированы образцы клещей, предварительно инфицированных ВКЭ. Наличие вирусной РНК в клещах дополнительно подтверждали методом ПЦР в реальном времени. Было показано, что во всех образцах зараженных клещей удалось достоверно выявить наличие вируса как биолюминесцентным методом, так и методом ПЦР в реальном времени.

Таким образом, на примере вируса клещевого энцефалита разработан подход, позволяющий на основе высокоаффинных антител создавать биолюминесцентные сенсоры для диагностики различных инфекционных агентов. Разработанный метод биолюминесцентного иммуноанализа гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита обладает более высокой чувствительностью и скоростью выполнения по сравнению с современными системами ИФА-диагностики этого вируса и может быть использован для создания конкурентоспособной тест-системы.

Библиографический список

1. Burakova L. P., Kudryavtsev A. N., Stepanyuk G. A. et al. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – Vol. 407, N 18. – P. 5417–5423.
2. Матвеев Л. Э., Годовиков А. А., Караванов А. С. и др. Моноклональные антитела к гликопротеиду вируса клещевого энцефалита: предварительная характеристика // Вопр. вирусол. – 1989. – Т. 34, № 6. – С. 694–698.

ТРУДНОСТИ ЛАБОРАТОРНОГО ПОДТВЕРЖДЕНИЯ ДИАГНОЗА «КОРЬ» У ПРИВИТЫХ

М.А. Бичурина¹, Н.В. Железнова¹, Е.В. Тимофеева²

¹ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург; ²Управление Роспотребнадзора по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

Реализация Программы элиминации кори на территории Российской Федерации к 2010 г., которая была разработана в соответствии с резолюцией Всемирной организации здравоохранения о глобальной элиминации кори в Европейском регионе к 2010 г. [6], способствовала существенному снижению заболеваемости корью, укреплению национальной системы иммунизации против этой инфекции, совершенствованию системы эпидемиологического надзора за корью и другими экзантемными заболеваниями. Программа выполнялась в три этапа, на каждом из которых решались конкретные задачи, и к 2010 г. предполагалось достичь показателя заболеваемости корью менее 1,0 на 1 млн населения [1, 10].

На территории Северо-Западного федерального округа (СЗФО) России в 2007–2011 гг. заболеваемость корью варьировала от 0,2 до 0,6 на 1 млн населения (в 2009 г. случаи кори не регистрировали) [2, 3].

Несмотря на то что во многих странах Европейского региона ВОЗ, в том числе в Российской Федерации, циркуляция местного вируса кори была прекращена, региональные цели элиминации кори к 2010 г. во всех странах региона не были достигнуты. В последующие годы отмечается активизация эпидемического процесса [7–9]. Имел место рост заболеваемости в целом по стране, в том числе на территориях СЗФО [4]. В связи с ухудшением эпидемической ситуации по кори принята обновленная программа элиминации кори и краснухи в Европейском регионе ВОЗ, в том числе и в Российской Федерации к 2015 г., а в последующем – к 2020 г.

В 2012–2014 гг. в вирусологическую лабораторию Санкт-Петербургского Регионального центра по надзору за корью и краснухой (СПб РЦ) поступило 477 сывороток крови от больных с первичным диагнозом «корь» с 11 территорий СЗФО. Диагноз «корь» подтвержден в 56,4% случаев. Для диагностики кори использованы тест-системы ИФА для выявления IgM и IgG-антител фирмы «Вектор-Бест» (Россия), а также тест-системы ИФА фирмы «Евроиммун» (Германия) для оценки avidности IgG-антител. Были проанализированы лабораторные показатели (IgM, IgG, IgG-avidность) в двух группах обследованных больных корью, различающихся по вакцинному статусу.

Анализ результатов, полученных в ИФА с тест-системой IgM-антител при исследовании сывороток крови от 248 пациентов с разным прививочным анамнезом, показал существенные различия в показателях оптической плотности в группе привитых и не привитых больных. Показатель оптической плотности в сыворотках крови не привитых превышал этот показатель у вакцинированных в 2,9–4,8 раза. Больные без сведений о прививках имели показатели оптической плотности ближе к группе не привитых, что свидетельствует об отсутствии вакцинации у большинства пациентов из этой группы.

Также прослеживаются различия в показателях уровня IgG-антител у больных с лабораторно подтвержденной корью у пациентов с разным прививочным статусом. В материале, взятом от больных корью на 4–7 сутки от начала сыпи, IgG-антитела отсутствовали только у одного привитого пациента, в то время как среди большинства не привитых (79,2%) IgG-антитела не были обнаружены или они присутствовали в низких титрах (менее 1,0 МЕ/мл).

У большинства ранее привитых, но заболевших корью уже на ранних сроках забора материала (4–7 сутки после появления сыпи) был выявлен высокий уровень IgG-антител (5,0–50,0 МЕ/мл и более). Это свидетельствовало о вторичном иммунном ответе у заболевших корью привитых, у которых сохранилась «иммунологическая память» на вирус кори, но по каким-то причинам (длительный срок после вакцинации–ревакцинации, состояние иммунной системы пациента и др.) не оказалось защитного уровня антител, чтобы противостоять инфекции.

Также имели место различия в степени авидности IgG-антител у больных корью с разным прививочным анамнезом. В сыворотках крови 92,5% ранее привитых пациентов на ранних сроках выявлены антитела высокой степени авидности (>60,0%). Напротив, среди не привитых заболевших корью IgG-антитела на ранних сроках от начала сыпи были низкоавидными (<40,0%).

У ряда больных, ранее привитых против кори, возникали трудности в подтверждении диагноза «корь». В качестве примера проанализированы лабораторные показатели пяти больных корью. Пациенты в возрасте от 18 до 29 лет были госпитализированы в больницу с первичным диагнозом «корь» и имели в анамнезе две дозы живой коревой вакцины. При исследовании первых сывороток крови от больных, взятых на 4–7 сутки от начала сыпи, в двух случаях IgM-антитела не были выявлены вообще, у трех пациентов был сомнительный результат. Для подтверждения диагноза вторые сыворотки от этих больных были взяты через 7–10 дней. У четырех пациентов были выявлены IgM-антитела во вторых сыворотках, но у одного больного результат повторного исследования был отрицательным. Вместе с тем у всех пациентов имело место нарастание IgG-антител во второй сыворотке по сравнению с первой в 1,7–10,0 раз. У четырех пациентов уже в первой сыворотке были высокие титры IgG-антител.

Чтобы окончательно лабораторно подтвердить диагноз «корь», парные сыворотки этих больных были исследованы в ИФА в тест-системе IgG корь-авидность. У всех больных и в первой, и во второй сыворотках был высокий процент авидности IgG-антител (80,0–100,0%). Эти данные показали, что ранее вакцинированные против кори пациенты на новое инфицирование диким вирусом кори отвечали по вторичному типу (высокий уровень IgG-антител и высокий процент авидных IgG-антител уже на ранние сроки после заражения).

Аналогичные результаты приведены в работах Мамаевой и др. [5]. Данные лабораторного обследования больных, ранее привитых против кори, свидетельствовали о повторной встрече с вирусом кори: IgG-антитела с высокой степенью авидности и высокими показателями концентрации обнаружены в большинстве сывороток.

Таким образом, показана большая значимость лабораторных исследований для подтверждения диагноза «корь», особенно в группе больных, ранее привитых. Поэтому необходимо кроме стандартного определения IgM-антител, использовать возможности других тестов (IgG, в том числе в динамике, IgG-авидность и др.).

Библиографический список

1. Бичурина М.А., Лялина Л.В., Василенко А.Ж., Железнова Н.В. Совершенствование эпидемиологического надзора за корью в Северо-Западном федеральном округе России на этапе ликвидации инфекции // Аналитический обзор. – 2008. – СПб. – 52 с.
2. Бичурина М.А., Железнова Н.В., Лялина Л.В. и др. Успехи и проблемы на этапе сертификации территорий СЗФО на отсутствие эндемичной кори // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1–2. – С. 503–504.
3. Бичурина М.А., Лялина Л.В., Железнова Н.В., Канаева О.И. Результаты сертификации территорий СЗФО на отсутствие циркуляции эндемичного вируса кори // Аналитический обзор. – 2012. – СПб. – 60 с.
4. Бичурина М.А., Тимофеева Е.В., Железнова Н.В. и др. Вспышка кори в детской больнице Санкт-Петербурга в 2012 году // Журнал инфектологии. – 2013. – Т. 5, № 2. – С. 96–102.
5. Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А. и др. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. – 2015. – Т. 5, № 1. – С. 55–62.
6. Национальная программа ликвидации кори в Российской Федерации к 2010 г. // Приказ МЗ РФ № 270 от 19.08.2002.
7. Measles and rubella surveillance // Bulletin WHO. – February 28, 2008.
8. Measles and rubella surveillance // Bulletin WHO. – April 30, 2008.
9. Morbidity and mortality // Weekly Report. – CDC. – May 24, 2011.
10. Tikhonova N.T., Bichurina M.A., Gerasimova A.G. et al. Enhanced surveillance for measles in low-incidence territories of the Russian Federation: defining a rate for suspected case investigation // Epidemiol. Infect. – 2011. – V. 139. – P. 239–246.

СТАНДАРТНЫЕ УСЛОВИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МАГНОИММУНОСОРБЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Ю.Ю. Гаркуша, О.Л. Старцева, И.В. Жарникова, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев,
С.А. Курчева, Е.В. Жданова

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Исследования в области магноиммуносорбентов (МИС) привели к созданию и внедрению в практику тест-систем магноиммуносорбентных для выявления возбудителей особо опасных и других инфекций в иммуноферментном анализе (ИФА).

Для унификации производства тест-системы магноиммуносорбентной для выявления холерного вибриона («ИФА-МИС-Холера-СтавНИПЧИ») и набора реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии («ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ») необходимо стандартизировать магносорбент (МС), являющийся твердой матрицей для иммобилизации специфических лигандов при конструировании МИС.

Для оптимизации структурных характеристик МС проведены исследования по варьированию соотношения компонентов синтеза, а также изучено влияние времени гелеобразования и pH среды на величину удельной поверхности сорбентов, объем и размер пор [1].

На основе полученных результатов рекомендованы следующие оптимальные условия синтеза алюмосиликатных МС: соотношение компонентов – алюмосиликат: FeO (1:2 соответственно); время гелеобразования 2 ч, pH гелеобразования – 7,0.

Для получения частиц МС контролируемого размера измельчение сорбента проводили в шаровой планетарной мельнице методом сухого размола.

Для определения влияния степени заполнения размольного стакана материалом, а также количества и диаметра мелющих тел на эффективность измельчения была осуществлена серия экспериментальных помолов. В работе использовали размольные стаканы объемом 45 мл, мелющие шары диаметром 5 и 10 мм в количестве от 5 до 15 штук. Количество загружаемого МС варьировало от 1 до 10 г.

Экспериментальные пробные помолы показали, что с увеличением числа шаров с минимальным диаметром резко сокращалось время размола с образованием высокой дисперсности частиц МС. По мере увеличения степени заполнения размольного стакана материалом наблюдалось снижение эффективности процесса помола, выражающееся в неоднородности фракций. Максимальная эффективность процесса размола достигалась при использовании шаров диаметром 10 мм в количестве 10 шт. и массой загружаемого МС в количестве 3 г, скорость вращения планетарного диска – 450 об/мин.

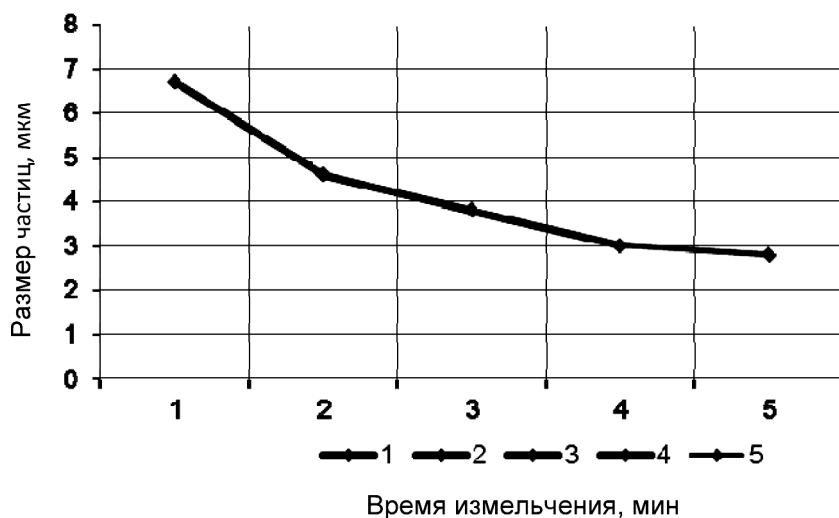


Рис. 1. Распределение частиц по размерам, полученное при измельчении магносорбента в течение 1-5 мин

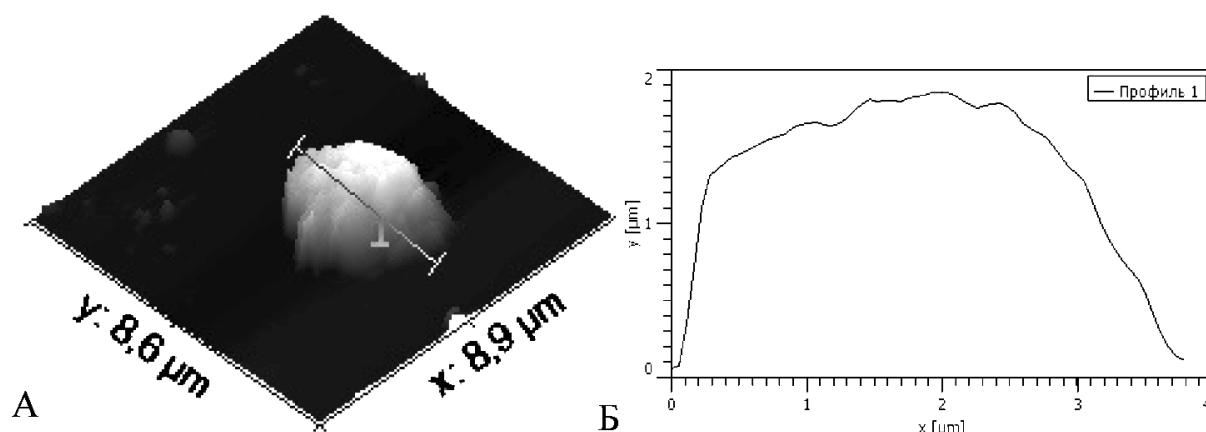


Рис. 2. АСМ-изображения частицы, полученной после трехминутного измельчения: А – топография частицы, Б – профиль частицы (плоскость сечения на рис. 2А).

Размер частиц МС после 1 мин обработки составил $6,8 \pm 0,5$ мкм и, как следствие, снижался с увеличением времени измельчения. Через 2 мин измельчения данный показатель снизился до $4,8 \pm 0,5$ мкм, а через 3 мин составил $3,8 \pm 0,5$ мкм. С дальнейшим увеличением времени обработки размер частиц изменялся незначительно и находился в пределах $3,0 \pm 0,3$ мкм после 4 мин измельчения, размол в течение 5 мин приводил к образованию мелкой фракции частиц с минимальным размером $2,5 \pm 0,3$ мкм. Результаты исследований представлены на рис. 1.

Использование атомной силовой микроскопии в исследовании МС позволило установить истинную форму и размер частиц (рис. 2). По внешнему виду и размерам все образцы МС были однородны и соответствовали предъявляемым требованиям.

Химическое активирование поверхности полученных после измельчения образцов МС проводили двумя равнозначными вариантами модифицирования твердофазных носителей: окислением перйодатом натрия и воздействием вторичным алкилсульфатом натрия.

После активирования к МС добавляли туляреминые иммуноглобулины с концентрацией 2,5 мг/мл. Эффективность иммобилизации IgG на поверхности МС представлена в табл.

Таблица.

Эффективность иммобилизации IgG на поверхности магносорбентов

Время измельчения магносорбента, мин	Количество связавшихся IgG, мг/мл	
	магносорбент, активированный ПАВ	магносорбент, активированный перйодатом натрия
1	$0,84 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,1$
2	$0,70 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,1$
3	$0,90 \pm 0,2$	$1,00 \pm 0,2$
4	$0,89 \pm 0,1$	$0,90 \pm 0,2$
5	$0,59 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,1$

Данные таблицы свидетельствуют, что время измельчения и размер частиц оказывают существенное влияние на адсорбционную емкость МС. Наибольшее количество связавшихся IgG наблюдалось в образцах, активированных перйодатом натрия и измельченных в течение 3 мин, и составляло $1,0 \pm 0,2$ мг/мл. Трехминутный временной интервал измельчения способствовал адсорбции $0,9 \pm 0,2$ мг/мл IgG в группе магносорбентов, активированных ПАВ.

С увеличением времени измельчения и уменьшения размера частиц наблюдалось снижение адсорбционной активности во всех образцах МС, независимо от способа активирования их поверхности. Наилучшими адсорбционными свойствами обладали образцы МС, измельченные в течение 3 мин с размером частиц $3,8 \pm 0,5$ мкм [2].

Контроль чувствительности и специфичности в ИФА с использованием набора реагентов «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» позволил обнаружить возбудитель туляремии в концентрации $1,0 \times 10^3$ м.к./мл. При определении специфичности в ИФА не отмечалось перекрестных реакций с гетерологичными микроорганизмами.

Таким образом, отработан способ измельчения МС, позволяющий получать частицы оптимального размера с постоянными характеристиками.

Библиографический список

1. Старцева О.Л., Курчева С.А., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. К вопросу разработки стандартного образца композиционного органокремнеземного микрогранулированного магносорбента // Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения: материалы Всероссийской научно-практической конференции (28 мая 2014 г.). Под ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород: Типография «Алтай», 2014. – С. 239–241.

2. Старцева О.Л., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. и др. Оптимизация параметров стадии механического измельчения при конструировании стандартного образца магносорбента // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (8–10 декабря 2015 г., г. Санкт-Петербург). – С. 192–193.

ГЕРМАНО-КАЗАХСТАНСКОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО В ОБЛАСТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И БИОБЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ОПАСНЫМИ ПАТОГЕНАМИ

**А.М. Дмитриевский¹, S. Frey², S. Essbauer², J. Zinner², Р.А.Егембердиева³, Л.Т. Ералиева³,
Ж.Ж. Шапиева⁴, Н. Туребеков⁵, К. Абдиева⁵, А. Жалмагамбетова⁶**

¹Центральная референтная лаборатория, Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан; ²Bundeswehr Institute of Microbiology, Virology & Rickettsiology, Munich, Germany; ³Казахский национальный медицинский университет, Алматы, Республика Казахстан; ⁴Научно-практический центр Санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга, Алматы, Республика Казахстан; ⁵Ludwig-Maximilians-Universität, Center for International Health, Munich, Germany; ⁶Немецкое общество по международному сотрудничеству (GIZ), Алматы, Республика Казахстан

Введение. Казахстан занимает площадь 2,7 млн км², находясь по этому показателю на 9 месте в мире. Занимая положение между Западной Сибирью на севере и Центральной Азией на юге, Волгой и Каспийским морем на западе и Алтайским краем и Китаем на востоке, территория Республики вобрала в себя самые разные ландшафтно-географические зоны, включая тайгу и горные хвойные и смешанные леса, степи и пустыни, с вкраплениями многочисленных рек и озер с их пойменной фауной и флорой. Кроме того, на всей территории Казахстана значительное развитие имеет животноводство, как правило, пастбищно-выпасное. Все это способствовало формированию многочисленных и распространенных как природных очагов зоонозных инфекций, таких как чума, туляремия, конго-крымская геморрагическая лихорадка, клещевой энцефалит, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, боррелиозы и риккетсиозы, так и наличию зоонозов с преимущественно антропогенным распространением, таких как бруцеллез, сибирская язва, пастереллез а также зоонозов с глобальным распространением, таких как иерсиниозы, листериоз, лептоспирозы и другие.

К сожалению, в процессе обретения независимости, смены экономической формации и дальнейших глубоких социально-экономических изменений, в том числе и в областях здравоохранения, ветеринарии, науки, не наступило существенных позитивных изменений в плане спектра и качества лабораторной диагностики, эпидемиологического надзора, аспектов биобезопасности. В то время как в наиболее

развитых мировых центрах в последние десятилетия научно-технического прогресс бурно развивался в плане новых методов и оборудования, а также стандартизации и методических подходов в областях лабораторной диагностики, инфекционных болезней, молекулярной и аналитической эпидемиологии, биологической безопасности [1], РК заметно отстал в этих вопросах.

Цель и задачи. С целью совершенствования лабораторной диагностики и практики биологической безопасности при работе с опасными инфекционными заболеваниями и их возбудителями, внедрения международных требований и стандартов, а также получения новых данных по распространенности опасных инфекционных заболеваний на территории Казахстана нами было заключено соглашение о совместной деятельности в рамках Германско-Казахстанского партнерства [2].

Материал и методы. В рамках этого соглашения немецкая сторона провела ряд тренингов по вопросам биологической безопасности для специалистов санэпидслужбы, а также медицинского университета, также нами было проведено несколько совместных тренингов, в частности по клещевому энцефалиту и GPS навигации и ГИС технологиям.

Научно-исследовательская часть проекта выполняется двумя казахстанскими соискателями поступившими в докторантуру в Университете Людвиг-Максимилиана в Мюнхене, проходящими обучение в Институте микробиологии и вирусологии Бундесвера и выполняющими свою работу в Казахстане. Немецкая сторона предоставляет необходимое оборудование и расходные материалы, стипендию и оплату транспортных расходов PhD докторантам, кроме того, немецкая сторона отремонтировала и оборудовала дополнительную лабораторию 2 уровня биобезопасности в НПЦ СЭЭМ (бывшая республиканская СЭС) и оказывает постоянную тесную методическую и практическую помощь соискателям. Казахстанская сторона предоставляет возможность докторантам работать в лабораториях НПЦ СЭЭМ и КазНМУ, осуществляет сбор, хранение и доставку образцов и также организационно-методическую помощь [3].

Проект включает обследование клещей и сывороток лихорадящих больных в пяти областях Казахстана на целый ряд как уже известных в РК, так и экзотических инфекций, включая клещевой энцефалит, конго-крымскую геморрагическую лихорадку, геморрагическую лихорадку с почечным синдромом, лихорадку Западного Нила, боррелиозы, риккетсиозы, коксиеллез, эрлихиоз, анаплазмоз, бруцеллез, туляремию, чуму, сибирскую язву, иерсиниозы, лептоспироз, лейшманиоз, сап, москитную лихорадку, лихорадку денге, Японский комариный энцефалит, Калифорнийский энцефалит, лихорадку Сндбис, лихорадку Тягиня.

На первом этапе проекта исследования проводятся в рамках диссертационных тем докторантов, куда входят бактериальные инфекции с основным упором на риккетсиозы и вирусные инфекции, с упором на клещевой энцефалит, пока в двух областях РК – Алматинской и Кызылординской. В работе используются ИФА (сыворотки) и ПЦР (клещи) диагностика, экстракция РНК и ДНК возбудителей и их секвенирование.

Результаты. Получены результаты о циркуляции в Алматинской области сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита с минимальным уровнем инфицирования от 1,1% до 4,4% в популяции клещей, причем не только *Ixodes persulcatus* (3,4%), но и *Dermacentor marginatus* (2,0%) и *Haemaphysalis punctata* (1,1%), на различных эндемичных территориях, самый высокий уровень инфицирования клещей отмечен на территории, примыкающей к городу Алматы Талгарского района [4].

Обнаружено широкое распространение риккетсий в популяции клещей разных видов как в Алматинской (до 69,9%), так и в Кызылординской (до 100%) областях. Циркулирующие риккетсии были определены как *Rickettsia raoultii* (*D. marginatus*, *D. niveus*, *D. reticulatus*) и *R. slovaca* (*D. marginatus*), кроме того, были обнаружены три возможно новых видов риккетсий в районе Текели, Талгара и Иссыка [5].

Таким образом, уже начало сотрудничества в рамках Германо-Казахстанского партнерства позволило существенно улучшить возможности лабораторной диагностики опасных инфекционных заболеваний в рамках эпиднадзора в РК, снизить риски заражения при работе с клещами, используя соответствующие средства индивидуальной защиты при сборе клещей, их упаковке и транспортировке, а также их гомогенизации и дальнейшего исследования, обучить специалистов лабораторного профиля современным методам лабораторной диагностики, разработав и внедрив в использование в лабораториях соответствующие СОПы, подготовив двух высококвалифицированных специалистов в области современной лабораторной диагностики, а также получив новые данные о циркулирующих в РК под-

типах вируса клещевого энцефалита, а также различных видах риккетсий.

В настоящее время работа продолжается, и мы надеемся продлить совместный проект, расширив его на другие регионы, охватив в исследовании других возбудителей и подключив к исследованию новых соискателей.

Библиографический список

1. Соглашение Европейского комитета по стандартизации биобезопасности и обучения по вопросам биологической безопасности (Cen Workshop Agreement _ CWA15793).- Brussels, 2011.- 46 p.
2. Соглашение о сотрудничестве (Memorandum of understanding).- Мюнхен, Алматы. – 2014. – 7 с.
3. Frey S., Shapieva Z., Yegemberdiyeva R. et al. The German Partnership Program Supports Biorisks Management in Kazakhstan // 15-th Medical Biodefense Conference. – Munich, 2016. – P. 73.
4. Abdiyeva K., Turebekov N., Shapieva Z. et al. The South of Kazakhstan is a hotspot for the Siberian Subtype of Tick-borne encephalitis virus // 15-th Medical Biodefense Conference. – Munich, 2016. – P. 31.
5. Turebekov N., Shapieva Z., Yerallyeva L. et al. Southern Kazakhstan as a melting pot for human pathogenic Rickettsiae // 15-th Medical Biodefense Conference. – Munich, 2016. – P. 29.

ЦЕНТРАЛЬНАЯ РЕФЕРЕНТНАЯ (РЕФЕРЕНС) ЛАБОРАТОРИЯ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН. СОСТОЯНИЕ ДЕЛ, ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

**А.М. Дмитриевский, С.М. Мамадалиев, Р.А. Егембердиева, Ф.А. Исакова,
Г.К. Сарыбаева**

*Центральная референтная лаборатория, Комитет науки Министерства образования
и науки Республики Казахстан, Алматы, Республика Казахстан*

Введение. 23 августа 2005 г. Правительство Республики Казахстан (РК) подписало с Правительством США исполнительное соглашение относительно ликвидации инфраструктуры оружия массового поражения, это стало основой, в том числе и для распространения на РК Программы уменьшения биологической угрозы в рамках Программы совместного уменьшения угрозы, осуществляемой Агентством по уменьшению угрозы Министерства обороны США [1]. В рамках этой программы в Казахстане была запущена программа обнаружения и реагирования на особо опасные инфекции (патогены), направленная на усиление лабораторных возможностей, эпиднадзора и биобезопасности в РК. В рамках этой программы было построено, оборудовано и проведено обучение персонала в 4 т.н. зональных диагностических лабораториях (ЗДЛ), построена лаборатория 3 уровня биобезопасности, и Центральная референтная лаборатория (ЦРЛ). Первоначально предполагалось, что ЗДЛ будет больше, и они будут нести референтные функции в регионах РК, ЦРЛ же станет единой референтной лабораторией. Однако в настоящее время приходит понимание, учитывая расстояния и площади областей РК, что лаборатории областных центров должны нести референтные функции в своих областях и следовательно должны соответствовать всем международным стандартам хотя бы 2 уровня биобезопасности.

Таким образом, Центральная референтная лаборатория – это республиканское научно-практическое учреждение, предназначенное для выполнения референтных функций в области эпиднадзора опасных инфекционных заболеваний человека и животных. Это уникальное учреждение, в котором совместно работают три министерства: Здравоохранения (в настоящее время в РК, комитет по защите прав потребителей, переведен в министерство национальной экономики), Сельского хозяйства (ветеринарии) и Образования и науки. Также при ЦРЛ будет единый депозитарий (музей живых культур) особо опасных патогенов.

Инфекционные заболевания становятся ведущей причиной смерти в мире, более чем 15 млн. из 57 млн. смертей во всем мире ежегодно вызваны инфекционными заболеваниями, но значительно большее количество смертей являются следствием перенесенных инфекций, что выводит инфекционные болезни на первое место как причину смертности населения. Мир переживает увеличение заболеваемости и глобального распространения инфекционных заболеваний. Большинство из этих новых и вновь возникающих возбудителей являются вирусами, в среднем, более двух новых видов вирусов,

патогенных для людей, регистрируется в мире каждый год [2 – 4]. Не остается в стороне от этих тенденций и Казахстан, являющийся эндемичным по целому спектру опасных зоонозных заболеваний, начиная с чумы и заканчивая Конго-Крымской геморрагической лихорадкой.

Цель и задачи. Для того чтобы минимизировать последствия возникающих эпидемий и вспышек, необходимо решить проблемы раннего обнаружения, быстрой и точной этиологической идентификации (особенно вызванных новыми возбудителями), быстрой локализации, ликвидации и эффективного контроля. Лабораторная служба играет центральную роль в определении этиологического агента и является основой эпиднадзора, что требует необходимости создания сети эффективных диагностических лабораторий, особенно в эндемичных регионах[5]. Эту задачу, по нашему мнению, может решить четко отлаженная иерархическая лабораторная референтная система. При этом в районных лабораториях должны проводиться основные клинико-лабораторные и первичные лабораторно-этиологические исследования; в областных лабораториях должна проводиться диагностика известных инфекционных заболеваний (патогенов) и поддержка эпиднадзора, здесь должны выполняться референтные функции в масштабе области; центральная же референтная лаборатория должна выполнять референтные функции в масштабе всей страны по отдельным инфекционным заболеваниям или группам инфекций.

Материал и методы. Что входит в референтные (референс) функции с точки зрения современных международных представлений, это проведение референтной диагностики, разработка, производство и распространение референтных (контрольных) материалов и внешний контроль качества, научно-консультативная деятельность, подготовка кадров, научно-исследовательская деятельность и международное сотрудничество [6].

Референтная диагностика, с нашей точки зрения, заключается в подтверждении положительных результатов нижестоящих лабораторий, анализе этих результатов по индикации или подтверждению диагнозов, выявлении типичных маркеров патогенов для данного региона, проведении диагностических лабораторных исследований только в сложных случаях, с которыми областная лаборатория не справляется.

Контроль качества включает разработку и производство референтных (контрольных) материалов и проведение внешнего контроля качества в нижестоящих лабораториях в соответствии с казахстанскими и международными стандартами и процедурами, проведение анализа типичных ошибок, оценку рисков и разработку планов по их устранению, а также проведение переподготовки кадров.

Консультативная деятельность заключается в том, что референтная лаборатория является центром экспертизы в своей области, предоставляет информацию и проводит консультации всем заинтересованным учреждениям и ведомствам по вопросам методологии и процедур, по интерпретации результатов лабораторных исследований для соответствующих учреждений, а также правительственных органов.

Центральная Референтная лаборатория (ЦРЛ) проводит подготовку специалистов в области современных методов лабораторной диагностики, эпидемиологического надзора и биобезопасности.

ЦРЛ проводит исследования инфекционных патогенов, совместно с лабораториями региональных и международных сетей, соответствующими зарубежными университетами и научными центрами, проводит научные исследования в области разработки и внедрения эффективных методов лабораторной диагностики и эпиднадзора.

На наш взгляд, ЦРЛ должна быть на вершине не только лабораторных исследований, но и всего эпиднадзора, распространяя референтные функции на его систему [7].

Результаты. В настоящее время лаборатория построена и оснащена современным оборудованием, в том числе секвенатором, что позволяет перевести эпиднадзор на более высокий качественный уровень молекулярной эпидемиологии, а с использованием современных аналитических методов и геоинформационных технологий – аналитической эпидемиологии. Официальная сдача казахстанской стороне будет проведена в середине года. ЦРЛ состоит из 4 этажей, имеет достаточную физическую защиту, может выдержать 9-балльное землетрясение. Каждому министерству предполагается отвести по этажу, на первом этаже размещаются подразделения общего пользования: депозитарий, виварий, лаборатория 3 уровня биобезопасности, а также тренинговый центр. В лаборатории будут работать только казахстанские специалисты. Персонал каждого отдела определен, и уже проведена его подготовка по биобезопасности. Подготовлен инженерный состав по контролю и обслуживанию инженерных коммуникаций, в том числе и системы вентиляции, поддерживающей давление разного уровня в различных

лабораторных помещениях.

Таким образом, наша задача в настоящее время заключается в запуске лаборатории, освоении и отладке лабораторного оборудования, а также в активном сотрудничестве с разными профильными центрами, занимающимися опасными инфекциями человека и животных и их возбудителями, в первую очередь с российскими институтами. В настоящее время мы разрабатываем несколько проектов в области эпиднадзора за зоонозными инфекциями вирусной и бактериальной этиологии и открыты как для двусторонних, трехсторонних, так и многосторонних контактов и сотрудничества. Одними из важных направлений сотрудничества могут стать новые и вновь активизирующиеся опасные инфекции, такие как MERS, вирус Зика, Эбола и ККГЛ, хантавирусная инфекция, клещевой энцефалит, клещевые боррелиозы, риккетсиозы, иерсиниозы, листериоз и лептоспироз. Одной из важнейших задач является формирование подвижной бригады «быстрого реагирования», оборудованной современным мобильным оснащением, способной развернуться в любых условиях и в кратчайшие сроки выявить этиологический фактор вспышки и провести мероприятия по ее локализации и ликвидации.

Библиографический список

1. Соглашение по ликвидации инфраструктуры оружия массового поражения.- Астана. – 2005.
2. Fauci A.S., Touchette N.A., Folkers G.K. Emerging Infectious Diseases: a 10-year perspective from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases // Emerg Infect Dis. – 2005. – Vol. 11.– P.519–525.
3. Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A. et al. Global trends in emerging infectious diseases // Nature. – 2008. –Vol. 451.– P. 990–993.
4. Woolhouse M.E., Howey R., Gaunt E. et al. Temporal trends in the discovery of human viruses // Proc R Soc B. – 2008. – Vol. 275.– P. 2111–2115.
5. Chua K.B. , Gubler D.J. Perspectives of public health laboratories in emerging infectious diseases // Emerg Microbes Infect. – 2013.– Vol. 2, N 6.- P. 37.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC; 2010.
7. Дмитриевский А.М., Мамадалиев С.М., Раюшкин Б.В. и др. К вопросу о референтных лабораториях и референтной системе эпиднадзора // Материалы Первой международной научно-практической конференции Агентства Республики Казахстан по защите прав потребителей.– Уральск, Казахстан, 2014, –С. 49–51.

ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ НА ОСНОВЕ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Важнейшим условием профилактики и борьбы с холерой является эффективный мониторинг, включающий диагностические тесты, которые отличаются высокой специфичностью и чувствительностью по отношению к холерному вибриону, и позволяют своевременно обнаружить возбудителя инфекции в исследуемом материале, определить его эпидемическую значимость. Иммунодиагностика холеры включает в себя комплекс иммунологических реакций, различающихся по регистрируемому эффекту и технике постановки, основанных на взаимодействии специфических антигенов холерного вибриона и гомологичных антител [1]. За рубежом проблема специфичности холерных иммунологических диагностик была решена путем конструирования моноклональных реагентов, которые нашли широкое применение в лабораторной практике [2–8]. В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проводится работа, направленная на совершенствование лабораторной диагностики холеры путем конструирования новых препаратов на основе моноклональных антител (МКА) для детекции холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в реакциях прямой иммунофлуоресценции (РИФ), слайд-агглютинации и иммуноферментном анализе (ИФА и dot-ИФА), а также иммунохроматографии (ИХ).

На первых этапах лабораторной диагностики холеры в качестве экспресс-методов применяются

реакция слайд-агглютинации и реакция иммунофлуоресценции. На базе Ростовского противочумного института получены экспериментальные серии флуоресцирующих МКА, предназначенные для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в реакции прямой иммунофлуоресценции. Препараты прошли широкие испытания на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, ФГБУЗ Государственный центр гигиены и эпидемиологии Федерального медико-биологического агентства, в ходе учений санитарно-противоэпидемических бригад (г. Ростов-на-Дону), которые показали их высокую специфичность и чувствительность порядка 10^5 м.к. [9]. На набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РИФ «ИГ – *V. cholerae* O1/O139 – РИФ» получено Свидетельство о Государственной регистрации № РЗН 2014/2142 от 16.12.2014 г. Он рассчитан на выявление холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в 30 исследуемых образцах.

Способность МКА O1, O139 агглютинировать холерные вибрионы O1, O139 серогрупп, аналогично коммерческой О-сыворотке, послужила основанием для создания набора реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом РА «ИГ – *V. cholerae* O1/O139 – РА». Строгая специфичность МКА в отношении холерных вибрионов O1, O139 при отсутствии перекрестных реакций с близкородственными и гетерологичными микроорганизмами в перспективе позволит использовать их в слайд-агглютинации без дополнительной постановки ее развернутого варианта, что существенно сократит время получения ответа и экономические затраты. Один флакон набора в среднем рассчитан на серологическую идентификацию 500 штаммов *V. cholerae* O1 и O139. Применение агглютинирующих МКА также позволяет исключить перекрестные реакции с представителями холерных вибрионов не O1/не O139, так как в последние годы увеличилось число штаммов, агглютинирующихся холерной сывороткой O1 в низком титре. Суммарные данные многочисленных испытаний свидетельствуют о высокой специфичности набора. В настоящее время на диагностические видоспецифические агглютинирующие моноклональные препараты O1, O139 получено Свидетельство о Государственной регистрации №РЗН 2015/2336 от 26.01.2015 г.

В лабораторной практике уже давно нашли применение диагностические иммуноферментные тест-системы для детекции возбудителей различных заболеваний. Однако в России на сегодняшний день не существует коммерческих доступных иммуноферментных наборов для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп. Нами проведена работа по созданию моноклональных пероксидазных конъюгатов (ПХ–МКА) для обнаружения холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп методом ТИФА и дот-иммуноанализа (dot-ИФА). С помощью видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов можно выявлять холерные вибрионы O1, O139 при наличии их в пробе 10^5 – 10^6 м.к. Особенно привлекательным является вариант dot-ИФА который относится к числу экспрессных, так как его постановка осуществляется в течение 1,5–2 ч и результаты реакции могут учитываться визуально. Метод dot-ИФА позволяет в одной постановке на небольшом участке мембраны исследовать большое количество проб. Более того, практический интерес представляет прямой вариант ИФА и dot-ИФА, то есть когда используют конъюгат пероксидазы со специфическими антителами, что исключает необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов и сокращает общее время анализа. Так, было показано, что прямой метод ИФА в планшетном варианте сокращает время анализа до 70–80 мин, в случае dot-ИФА на мембране – до 70–90 мин. В ходе исследования отработаны оптимальные режимы постановки прямого варианта планшетного иммуноферментного анализа и дот-иммуноанализа с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспрессного выявления холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения. Установлено, что чувствительность методов остается на исходном уровне при проведении анализа в условиях комнатной температуры (20–25 °C). Строгая специфичность экспериментальных серий моноклональных пероксидазных конъюгатов подтверждена при исследовании их на наборе штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп и представителей близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Визуальная оценка результатов, простота и экономичность данных тестов по затратам обуславливает их практическую значимость и возможность применения для

диагностики возбудителя холеры в полевых условиях при исследовании большого количества штаммов. С помощью прямого варианта ТИФА или dot-ИФА можно тестировать одновременно большое число проб и в короткие сроки получать ответ о наличии холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп.

Иммунохроматография (ИХ) также является экспресс-тестом, который значительно ускоряет диагностику возбудителя, так как время постановки занимает до 15 мин. В рамках совместной темы нашего института с ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (г. Оболensk) разработана моноклональная ИХ тест-система для выявления *V. cholerae* O1, при лабораторных испытаниях которой установлена строгая специфичность в отношении вибрионов O1 серогруппы. Установлено, что ИФА и dot-ИФА позволяют выявлять 10^5 – 10^6 микробных клеток, а ИХ тест-полоски выявляют 10^8 микробных клеток [10]. Перечисленные иммунологические методы могут быть применены на этапе выделения чистой культуры.

В настоящее время на базе Ростовского противочумного института проводятся работы по конструированию моноклональных пероксидазных конъюгатов, позволяющих выявлять *tcp*⁺ штаммы *V. cholerae* O1 и O139 в прямом ТИФА и dot-ИФА. Экспериментальные серии конъюгатов будут испытаны в иммуноферментных методах на наборе штаммов холерных вибрионов с различным генотипом, а также на штаммах представителей близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Будет определена диагностическая значимость полученных препаратов.

Из вышеизложенного следует, что в Ростовском противочумном институте разработаны новые диагностические препараты на основе МКА, внедрение которых в практику отечественного здравоохранения будет способствовать совершенствованию лабораторной диагностики холеры и повышению качества серологического анализа.

Библиографический список

1. Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л. и др. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы // Проблемы ООИ. – 2010. – вып. 103. – С. 18–23.
2. Qadri F. Evaluation of the monoclonal antibody-based kit Bengal SMART for rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal in stool samples // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33. – P.732 – 734.
3. Gustafsson B. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for identification and serotyping of *Vibrio cholerae* O1 // J. Clin. Microbiol. – 1984. – Vol. 20, N 6. – P. 1180 – 1185.
4. Chaicumpa W., Srimanote P., Sakolvaree Y. et al. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139 // J. Clin. Microbiol. – 1998. Vol. 36. – P. 3595– 3600.
5. Nato F., Boutonnier A., Rajerison M. et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2003. – Vol. 10, N 3. – P. 476–478.
6. Tuteja U., Kumar S., Shukla J. et al. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56, Pt 10. – P. 1340–1345.
7. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S. et al. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139 // Southeast Asian J Trop Med Public Health. – 2013. – Vol. 44, N 3. – P. 448–455.
8. Supawat K. A monoclonal antibody-based dot-blot ELISA diagnostic kit for the detection of *Vibrio cholerae* O1 in stools of diarrheic patients and household contacts // Asian. Pac. J. Allergy Immunol. – 1994. – Vol. 12, N 2. – P. 155–159.
9. Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Евдокимова В.В. и др. Новые препараты на основе моноклональных антител в лабораторной диагностике холеры // Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой «Холера и патогенные для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону, 2014. – С. 156–160.
10. Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. и др. Сравнительная оценка методов дот-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы // Журн. микробиол. – 2010. – № 6. – С. 88 – 93.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Т.В. Жарникова, И.В. Жарникова, Т.В. Таран.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

Для диагностических целей широко используется реакция иммунофлуоресценции (РИФ), отличающаяся простотой постановки, экспрессностью и рекомендуется для ускоренного выявления возбудителей инфекций.

Получение высокоактивных и специфичных иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих – достаточно сложная задача: необходимо освободиться от несвязавшегося красителя (так как при его избытке наблюдается ложноположительное свечение) и очистить иммуноглобулины флуоресцирующие от гетерологичных антител (так как следствием невыполнения данной операции является неспецифическое свечение).

Известны различные методы очистки иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося флуорохрома, одним из которых является использование активированного угля. Однако при этом потери белка достигают 40%. Чаще всего конъюгаты освобождают от несвязавшегося флуорохрома гель-фильтрацией на колонках с сефадексом G-50 или G-25 с элюированием конъюгата 0,1 М фосфатным буферным раствором pH 9,5. При указанных условиях разделения конъюгат разбавляется не более чем в 2 раза и потеря белка незначительна, но сефадекс – дорогостоящий импортный реактив.

Известны различные методы истощения сывороток крови, иммуноглобулинов от гетерологичных антител. Для связывания гетерологичных антител в иммунных сыворотках использовали в качестве адсорбентов микробные клетки, но сорбция корпускулярными антигенами существенно понижает специфические титры антител, зачастую приводя к полной непригодности сырья из-за появления в иммунных сыворотках растворимых комплексов «антиген–антитело». Известно использование для этих целей твердофазных полиакриламидных сорбентов с иммобилизованными водорастворимыми антигенами из гетерологичных штаммов, преимуществами которых являлось то, что при сорбции не происходило попадания в сыворотки антигенного материала, и в ней отсутствовал комплекс «антиген–антитело», мешающий в дальнейшем созданию специфических диагностических систем. Такая иммуносорбция приводила к повышению специфичности сывороток. Титры специфических антител снижались незначительно (в 1,5–2 раза), и конечный продукт оставался качественным сырьем для дальнейшей работы. Но технология приготовления полиакриламидных сорбентов трудоемка, включает использование высокотоксичных, дорогостоящих импортных реактивов.

В связи с этим нами разработан способ получения иммуносорбента, выполняющего одновременно две функции: очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя – флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ) и сорбцию гетерологичных антител путем связывания с антигенным лигандом, конъюгированным с матрицей.

Важным моментом являлся выбор эффективной матрицы, соответствующей ряду требований: матрица должна иметь открытую и пористую структуру, быть биологически и химически инертной, но в то же время легко образовывать производные, обеспечивающие иммобилизацию лигандов, быть стабильной в течение определенного времени и не приводить к разрушению ни носителя, ни лиганда.

Химическим модифицированием поверхности матрицы можно в широких пределах изменить адсорбционные и технологические свойства. Нами использованы матрицы на основе органической и неорганической природы (алюмосиликат, полифепан, алюмосиликат, активированный полиглюкином, полифепан, активированный полиглюкином, оксид железа с алюмосиликатом, активированные полиглюкином, оксид железа с полифепаном, активированные полиглюкином, неосмектин в различных комбинациях).

Из сорбентов без оксида железа лучшие результаты получены с неосмектином и алюмосиликатом, активированными полиглюкином. Но отрицательным моментом очистки иммуноглобулинов флуорес-

цирующих является необходимость центрифугирования. В связи с чем акцент был сделан на применение оксида железа в сорбенте, так как это сокращало материальные и трудовые затраты, упрощало процесс получения иммуноглобулинов флуоресцирующих на этапах очистки препарата от несвязавшегося красителя и гетерологичных антител в результате применения внешнего магнитного поля, фиксирующего микрогранулы во время их отмывания и перемешивания. Введение магнитного материала в структуру сорбентов приводило к изменению его физических параметров.

Лучшие результаты получены при использовании сорбента, состоящего из алюмосиликата с полиглюкином и оксидом железа (высокая активность и отсутствие перекрестных реакций с гетерологичными штаммами, полнота очистки от несвязавшегося флуорохрома [1]). Магнитные свойства сорбента позволили упростить процесс отделения его от жидкой фазы в магнитном поле, используя постоянный магнит, и исключить процесс центрифугирования. Для получения бифункциональных свойств сорбентов, на их поверхность иммобилизовали водорастворимые гетерологичные антигены.

Было проанализировано 3 серии иммуноглобулинов туляремиальных флуоресцирующих [2] с концентрацией белка 9 – 10 мг/мл и молярным соотношением Мф/Мб от 3,8 до 11,0. Оценку результатов активности и специфичности иммуноглобулинов флуоресцирующих определяли на фиксированных мазках гомологичных и гетерологичных штаммов прямым методом окраски препаратов в РИФ по Coons, Kaplan [3].

Специфическая активность всех приготовленных серий характеризовалась рабочим разведением препаратов 1:32 – 1:64 при исследовании мазков гомологичных возбудителей. При определении полноты очистки от несвязавшегося флуорохрома методом тонкослойной хроматографии, установлено, что в иммуноглобулинах туляремиальных флуоресцирующих не обнаружен свободный флуорохром.

Бифункциональность свойств сорбентов позволяла одновременно выполнять две задачи. Первая состояла в освобождении иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя – ФИТЦ – в результате физической сорбции последнего на сорбенте с участием электростатических взаимодействий с кислотными центрами алюмосиликата. Вторая задача включала очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от гетерологичных антител за счет аффинных взаимодействий последних, входящих в состав иммуноглобулинов и соответствующих антигенов, фиксированных на иммуносорбенте. Отработанная при этом методика может быть использована как основа для получения высокоактивных, специфических иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих при выявлении возбудителей различных инфекций, а с учетом снижения временных, трудовых и материальных затрат превосходство предложенного нами метода очистки иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя и гетерологичных антител становится очевидным.

Библиографический список

1. Носков Ф.С. Очистка конъюгатов от непрореагировавшего флуорохрома // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций / Под ред. Т.В. Перадзе, П. Халонена. - М., 1985. - С. 254.
2. Coons A.H., Kaplan M.H. Localisation of antigen in tissue cells // J. Exp. Med. - 1950. - Vol.91, N 1. - P.81–89.
3. Stortz H. (Шторц Х.) Иммунофлуоресценция // Иммунологические методы. - М.: Медицина, 1987. - С.128–148.

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ДВУХ МИШЕНЕЙ – ПОДХОД К РЕШЕНИЮ ПРОБЛЕМ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ С ВЫСОКОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТЬЮ

М.К. Иванов, М.А. Прасолова, Д.И. Тимофеев, С.А. Глушков, Е.В. Кандрушин

ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

В настоящее время молекулярно-генетические тесты, основанные на методе ПЦР, обладающие высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, широко применяются в диагностике многих серьезных вирусных заболеваний, таких как ВИЧ-инфекция и вирусные гепатиты В и С. При разработке ПЦР-тестов необходимо выбирать в качестве мишени наиболее консервативный участок генома выявляемого патогена и учитывать все известные для него генетические варианты (точечные мутации, инсерции, делеции) при дизайне олигонуклеотидных праймеров и зондов, чтобы выявлять эти варианты одинаково эффективно. Тем не менее информация о генетической вариабельности вирусов никогда не является исчерпывающей, и с развитием технологий секвенирования, с одной стороны, и развертыванием эпидемиологических работ в новых регионах, с другой, ее накопление происходит лавинообразно и приводит к постоянному выявлению новых, ранее не описанных генетических вариантов.

Геномы вирусов, в особенности тех, в жизненный цикл которых входит обратная транскрипция, характеризуются высочайшей изменчивостью. В результате в них фактически нет не только абсолютно консервативных участков – потенциальных мишеней для ПЦР, но даже абсолютно консервативных нуклеотидных позиций. В случае наличия в геноме определенного штамма вируса мутаций в участках связывания праймеров или зондов, входящих в состав ПЦР-теста, этот штамм может выявляться данным тестом с меньшей эффективностью. Поэтому при использовании стандартного подхода к дизайну ПЦР-тестов, предполагающих выявление только одной мишени, не все геноварианты патогенов выявляются с высокой эффективностью, и для неучтенных вариантов всегда существует вероятность получения ложноотрицательных результатов при качественном анализе и заниженных оценок – при количественном.

Цель работы. Простые математические расчеты показывают, что при одновременном анализе двух адекватно выбранных мишеней для ПЦР вероятность получения искаженных результатов существенно снижается [1]. Поэтому целью нашей работы являлась разработка и апробация двухлокусных (предполагающих одновременное выявление двух участков-мишеней) диагностических наборов реагентов на основе ПЦР в реальном времени для выявления РНК вирусов гепатита С и ВИЧ-1, а также ДНК вируса гепатита В в клиническом материале (сыворотка и плазма крови). Разрабатываемые наборы должны по аналитическим характеристикам не уступать выпускаемым предприятием и соответствовать международным требованиям.

Материалы и методы. Выделение нуклеиновых кислот из клинического материала и амплификацию с детекцией в режиме реального времени на термоциклере CFX-96 (BioRad Laboratories, США) проводили с использованием наборов, производимых ЗАО «Вектор-Бест», согласно инструкциям производителя.

На основании анализа данных литературы, общедоступных баз генетических последовательностей, а также собственных исследований для создания двухлокусных тестов были выбраны:

- для выявления вируса гепатита В – два участка S-гена;
- для выявления вируса гепатита С – фрагменты 5'UTR и 3'UTR (X-Tail) [2];
- для выявления ВИЧ-1 – фрагменты гена pol и 5'LTR.

В соответствии с общими принципами построения ПЦР-наборов серии «Реал-Бест» с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени основу наборов составляет лиофильно высушенная готовая реакционная смесь (ГРС). Она обеспечивает длительное хранение (до двух лет) и транспортировку наборов при +4 °С. ГРС содержит все необходимые для проведения обратной

транскрипции и ПЦР компоненты, что исключает дополнительные затраты времени при постановке реакции и снижает риск контаминации [3].

Для оценки аналитических характеристик разрабатываемых наборов реагентов использовали: международные стандартные образцы ВОЗ, в том числе стандартную панель генотипов ВИЧ-1; стандартные образцы предприятия, аттестованные относительно международных стандартов и используемые при выпуске диагностических наборов ЗАО “Вектор-Бест”; собранную в ходе предыдущей работы коллекцию из нескольких сотен клинических образцов, содержавших нуклеотидный материал анализируемых вирусов.

Для оценки устойчивости разрабатываемых тестов к одиночным нуклеотидным заменам, присутствующим в реальных штаммах вирусов, использовали специально отобранный клинический материал, а также коллекцию специально наработанных ДНК-конструкций, включающих последовательности, идентичные кДНК редких штаммов вирусов, которых не было в нашем распоряжении.

Для поиска генетических вариантов вирусов, эффективность выявления которых отличалась для разных локусов, проводили параллельное тестирование клинического материала, получаемого из разных регионов России, при помощи диагностического набора, выявляющего один (наиболее консервативный) локус, а также лабораторного варианта набора, выявляющего альтернативный локус. В случае вариантов вируса, для которых один локус выявлялся с заметно более низкой эффективностью, чем другой, проводили секвенирование соответствующего фрагмента вирусного генома по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3100 DNA Analyser» («Applied Biosystems») и выявляли мутации, повлиявшие на результат ОТ-ПЦР. Дополнительно проводили анализ образцов, вызвавших у нас особый интерес, с помощью наборов реагентов для выявления нуклеиновых кислот ВИЧ-1, ВГВ и ВГС методом ПЦР в реальном времени, выпускаемых другими российскими производителями.

Для контроля специфичности лабораторных версий наборов использовали 570 образцов сывороток и плазм крови, не содержащих маркеров ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов В и С, полученных из учреждений «Службы крови» Сибирского федерального округа.

Результаты и обсуждение. Были разработаны и апробированы двухлокусные наборы реагентов для выявления нуклеиновых кислот ВИЧ-1, ВГВ и ВГС методом ПЦР в реальном времени. В ходе разработки были оптимизированы условия для обеспечения максимально эффективной обратной транскрипции и амплификации участков НК-мишеней обоих локусов, а также внутреннего контрольного образца в одной пробирке (для каждого вируса: ВИЧ-1, ВГС, ВГВ) в рамках стандартизованных протоколов проведения реакций. Аналитическая чувствительность созданных наборов: для РНК ВИЧ-1 20 МЕ/мл, для ДНК ВГВ 10 МЕ/мл, для РНК ВГС 15 МЕ/мл. С 2016 г. разработанные комплекты реагентов для двухлокусного определения нуклеиновых кислот ВИЧ-1, ВГВ и ВГС объединены в составе единого диагностического набора реагентов “РеалБест ВГВ/ВГС/ВИЧ ПЦР”, прошедшего процедуру государственной регистрации (РУ № РЗН 2013/1179) и выпускаемого ЗАО “Вектор-Бест” для нужд службы крови.

В ходе работы были выявлены два образца, содержащие ДНК ВГВ, и 5 образцов, содержащих РНК ВИЧ-1, с которыми были получены ложноотрицательные результаты с использованием стандартных вариантов наборов. В случае ВГВ причина заключалась в заменах в участках, соответствующих 3'концу одного из праймеров, в случае ВИЧ-1 были выявлены разнообразные замены в областях связывания праймеров и зондов. При использовании двухлокусных тестов все эти образцы были определены как положительные, при этом один из образцов содержал РНК ВИЧ-1 в концентрации порядка 10^5 МЕ/мл. При выявлении РНК ВГС подобных результатов получено не было, однако были выявлены пробы, в которых значения S_q при выявлении стандартным тестом, нацеленным на 5'UTR, отличались на 4–5 и даже 9 циклов по сравнению с выявлением фрагмента X-Tail, что соответствовало потенциальной ошибке в 2–3 lg при количественных оценках. Секвенирование участка 5'UTR в этих пробах выявило наличие в них генетических вариантов 2 генотипа ВГС, не имеющих аналогов в общедоступных базах данных.

Полученный нами в ходе выполнения работ опыт показывает, что а) локализация нуклеотидных замен в участках вирусных геномов, выбранных в качестве мишеней для ПЦР, может быть непредсказуемой, и б) расхождения результатов выявления разных участков вирусного генома в одних и тех же штаммах могут быть выше, чем при выявлении одного и того же участка в ПЦР-наборах от разных про-

изготовителей. И врачи-клиницисты, и сотрудники лабораторной службы должны осознавать ограничения метода ПЦР и понимать, что технические характеристики, заявленные производителями наборов, подтвержденные в технических испытаниях, соответствуют выявлению тех генетических вариантов вируса, которые были учтены при дизайне теста, но не гарантируют надежное выявление более редких или неучтенных форм. Разработчикам диагностических наборов необходимо постоянно отслеживать обновления данных о генетической вариативности выявляемых патогенов, а дизайн наборов должен обеспечивать высокую устойчивость к разнообразным, в том числе и неизвестным в настоящее время генетическим вариациям в геномах вирусов.

Разработка диагностических ПЦР-наборов, предполагающих одновременное выявление не менее чем двух мишеней, в большинстве случаев является сложной технической задачей. Тем не менее использование двухлокусных тестов позволяет эффективно выявлять генетические варианты вирусов, не соответствующие имеющимся в базах данных, а также позволяет осуществлять более точные количественные оценки в случае редких мутаций, попадающих в области связывания праймеров и зондов. На наш взгляд, данный подход представляется крайне перспективным для клинической диагностики и в будущем должен стать стандартным при выявлении нуклеиновых маркеров патогенов человека.

Исследование финансировалось из средств ЗАО «Вектор-Бест».

Библиографический список

- 1.Steensels D., Vankeerberghen A., De Beenhouwer H. Towards Multitarget Testing in Molecular Microbiology // Int. J. Microbiol. –2013– 2013:121057. –6 p.
- 2.Drexler J.F., Kupfer B., Petersen N. et al. A Novel Diagnostic Target in the Hepatitis C Virus Genome // PLoS Medicine. – 2009. – Vol. 6, N 2. – P. 210–220.
- 3.Иванов М.К., Порываев В.Д., Трухина А.В., Кандрушин Е.В. Наборы серии «РеалБест» для диагностики вирусных патогенов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Концепция и особенности конструирования // Новости «Вектор-Бест». – 2008. – N 4 (50). – С. 16 – 19.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИЕРСИНИОЗОВ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

Т.В. Каримова¹, М.В. Чеснокова², В.Т. Климов², Э.Ф. Опочинский³

¹ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск; ²ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск;

³Федеральный центр гигиены и эпидемиологии, Москва, Россия

Учреждения Роспотребнадзора Сибири и Дальнего Востока на энтеропатогенные иерсинии (*Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*) ежегодно (2010–2014 гг.) выполняют в среднем 142 тыс. исследований бактериологическим, серологическим и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами. Преобладающий объем (более 75%) приходится на 8 территорий региона: Алтайский край (45 765), Р. Саха-Якутию (11 203), Иркутскую область (10 728), Приморский край (9 256), Ханты-Мансийский АО (9 126), Тюменскую область (8 016), Р. Бурятию (6 149), Новосибирскую область (5 698). На остальных 15 территориях региона проводится менее 5000 исследований в год (от 541 до 4 594). В структуре исследований преобладают смывы с объектов окружающей среды и блюда из сырых овощей (76,6%), материал от людей и мелких млекопитающих составляет 12,6% и 7,4% соответственно. Продукты животного происхождения, как основные факторы передачи кишечного иерсиниоза, занимают невысокий удельный вес (2,8%), на прочие объекты (почва, вода, членистоногие) приходится 0,6%.

При исследовании материала от людей лидирующую позицию (71,36%) занимают серологические исследования, результативность которых составляет на псевдотуберкулез 28,08±0,88 на 1000 исследованных проб (‰) и кишечный иерсиниоз – 36,15±0,92‰. За 2010–2014 гг. изолированы 158 культур *Y. pseudotuberculosis* (13,86±0,32‰) и 106 – *Y. enterocolitica* (9,09±0,88‰). Среднеголетний

показатель высеваемости *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* соответственно в сибирском регионе составил $16,82 \pm 1,39\%$ и $10,48 \pm 1,07\%$, дальневосточном – $4,93 \pm 1,31\%$ и $4,25 \pm 1,28\%$. Чаще *Y. pseudotuberculosis* выделяли в Новосибирской области (51,3%), Ямало-Ненецком АО и Красноярском крае (по 7,0%), Р. Хакасия (5,1%), Иркутской области, Р. Бурятия и Хабаровском крае (по 4,4%).

Преобладающее количество *Y. enterocolitica* установлено в Забайкальском крае (30,3%), Ямало-Ненецком АО (29,2%), и Новосибирской области (13,2%).

От мелких млекопитающих выделено 48 культур *Y. pseudotuberculosis* ($2,66 \pm 0,38\%$) и 375 *Y. enterocolitica* ($22,79 \pm 1,16\%$). Высеваемость *Y. pseudotuberculosis* в дальневосточном регионе была выше подобного показателя в Сибири в 5,5 раза ($3,91 \pm 0,59\%$ и $0,71 \pm 0,32\%$, $t=4,8$; $p \leq 0,01$).

Культуры *Y. pseudotuberculosis* изолированы в Приморском крае (85,4%), Республике Алтай и Амурской области (по 4,2%), Новосибирской, Омской и Тюменской областях (по 2,08%). Чаще *Y. enterocolitica* изолировали в Приморском (40%), Алтайском (28,5%) краях, Новосибирской (8%), Омской (5,3%), Тюменской (3,8%) областях и Хабаровском крае (2,9%).

Из смывов с объектов окружающей среды и пищевых продуктов было выделено 50 культур *Y. pseudotuberculosis* ($0,18 \pm 0,03\%$) и 965 – *Y. enterocolitica* ($3,09 \pm 0,10\%$). Преобладающее число *Y. pseudotuberculosis* установлено в Республике Хакасия (20,0%), в Алтайском, Хабаровском и Красноярском краях (по 18,0%), Иркутской области (10,0%), Амурской области (8,0%) и Новосибирской области (6,0%). *Y. enterocolitica* чаще изолировали в Алтайском крае (35,9%), Красноярском крае (14,2%), Новосибирской (13,9%), Иркутской (12,8%) областях, Республике Саха-Якутия (7,7%) и Кемеровской области (4,8%).

Специфические фрагменты ДНК *Y. pseudotuberculosis* обнаруживали в биоматериале от людей в $46,75 \pm 5,99\%$ ($t=5,41$, $p<0,05$), от грызунов – $2,86 \pm 1,1\%$ ($t=0,17$, $p>0,05$), из смывов с объектов окружающей среды и овощной продукции – $7,68 \pm 1,35\%$ ($t=5,56$, $p<0,05$). Преобладающее число положительных результатов от людей установлено в Томской области (32,2%), Красноярском крае (16,9%), Республике Бурятия (16,9%), Амурской области (8,5%) и Республике Хакасии (6,8%); единичные находки от мелких млекопитающих отмечались в Томской (3 культуры), Новосибирской, Амурской областях и Красноярском крае (по 2 культуры); из смывов с объектов и других объектов окружающей среды – в Иркутской области (40,6%), Красноярском крае (28,1%) и Новосибирской области (18,8%). Специфические фрагменты ДНК *Y. enterocolitica* обнаруживали в биоматериале от людей в $15,34 \pm 2,22\%$ ($t=5,02$, $p<0,01$), от грызунов – $152,93 \pm 6,36\%$ ($t=20,1$, $p<0,01$), из смывов с объектов окружающей среды и овощной продукции – $255,10 \pm 7,2\%$ ($t=35,0$, $p<0,01$). Чаще положительные находки в ПЦР при исследовании материала от людей установлены в Р. Саха-Якутии (36,2%), Р. Хакасии (14,9%), Красноярском крае (21,3%), Новосибирской (12,7%) и Иркутской (6,38%) областях; от мелких млекопитающих – в Р. Саха-Якутии (56,5%), Хабаровском крае (21,2%) и Новосибирской обл. (13,1%); из смывов и других объектов окружающей среды – в Красноярском крае (55,0%), Новосибирской области (15,6%) и Р. Саха-Якутии (7,2%).

СПЛАЙСИНГ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЙ ДНК-МИКРОЧИП ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ мРНК ЭЛЕМЕНТОВ АПОПТОЗ-АССОЦИИРОВАННОГО СИГНАЛИНГА

Д.И. Князев, Л.А. Солнцев, Н.А. Сахарнов, В.Д. Цветкова, О.В. Уткин

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Высокопроизводительным инструментом для изучения динамических особенностей изменения транскриптома являются ДНК-микрочипы. Основную трудность в разработке дизайна и конструировании ДНК-микрочипов представляет поиск оптимального баланса между количеством выявляемых мишеней, а также чувствительностью и специфичностью такого анализа. Данная проблема отчасти

решается путём оптимизации первичной последовательности иммобилизованных на подложке ДНК-зондов, введении спейсерных участков, подбором оптимальных условий гибридизации и методов пробоподготовки.

Апоптоз является регулятором тканевого гомеостаза в процессе эмбриогенеза, гистогенеза, функционирования иммунной системы. В реализации сигнальных событий апоптоза принимают участие сотни различных молекул, многие из которых образуются в результате альтернативного сплайсинга. Уровень экспрессии и качественный состав сплайсированных вариантов мРНК основных участников апоптоз-ассоциированного сигналинга определяет баланс в системе выживание/гибель клетки, что имеет функциональные последствия для организма. Целью работы явилась оценка суммарной экспрессии генов, а также отдельных сплайсированных вариантов мРНК основных участников апоптоз-ассоциированного сигналинга с помощью ДНК-микрочипов.

В первую очередь был разработан алгоритм подбора зондов в системе Matlab (США) с пакетом расширений Bioinformatics Toolbox и Parallel Computing Toolbox [1]. Длина целевой последовательности зондов составила 20–29 нуклеотидных оснований (н. о.). Для увеличения чувствительности микрочипа с 3'-конца был добавлен олиго-Т-спейсер длиной 8 н. о. Выбор спейсера такой длины обусловлен данными литературы и результатами собственных исследований, согласно которым удовлетворительный баланс между чувствительностью и специфичностью достигается при длине спейсера 8–10 н. о. [2–4]. Синтез зондов осуществляли с применением модифицированного амидофосфитного метода на платформе CustomArray (США). Каждый микрочип включал в себя 4 идентичных, но обособленных друг от друга участка, содержащих по 2084 целевых зонда и 140 зондов отрицательного контроля. Целевые зонды позволяли анализировать экспрессию 225 генов, включающих в себя рецепторы, адапторы, эффекторы, регуляторы внешнего и внутреннего путей апоптоза, а также факторы сплайсинга, элементы сплайсосомы и другие.

Для тестирования экспериментального ДНК-микрочипа были использованы 3 образца – кровь условно здорового донора (образец «К»), кровь пациента с герпес-вирусной инфекцией (образец «Г»), опухолевый биоптат, полученный от пациента с раком шейки матки (образец «Р»). Пробоподготовку осуществляли по следующей схеме: 1) выделение тотальной РНК биологического образца; 2) получение кДНК, сопряжённое с введением промотора Т7 РНК-полимеразы и ПЦР-адаптора в состав кДНК; 3) ПЦР-амплификация дц-кДНК; 4) Нарботка амплифицированной РНК (аРНК) методом *in vitro* транскрипции с использованием Т7 РНК-полимеразы, сопряжённая с введением биотиновой метки в состав аРНК. Измерения сигнала гибридизации зондов с аРНК проводили амперометрическим методом.

аРНК каждого образца гибридизовали на отдельном микрочипе. Поскольку каждый микрочип содержал 4 идентичных набора зондов, то все образцы анализировали в 4 повторах. Обработку данных гибридизации проводили следующим образом: 1) Для каждого из чипов выполняли коррекцию фона с использованием алгоритма RMA [5, 6]; 2) Полученные данные подвергали процедуре нормализации с использованием алгоритма квантильной нормализации [5, 6]. Обработку выполняли в пакете Mathworks Matlab R2014b. Несмотря на то что массив данных от всех трёх образцов нормировался совместно, в силу гетерогенности образцов и их клеточного состава попарные сравнения уровней гибридизации идентичных зондов между образцами не являются корректными. Поэтому в рамках данной работы проанализированы зонды с наиболее высоким сигналом гибридизации, т. е. выполнен анализ паттернов встречаемости мРНК среди биологических образцов разного типа.

Среди генов, чья экспрессия детектировалась на относительно высоком уровне во всех трёх образцах, были гены домашнего хозяйства (*FPGS*, *USP19*, *PPIB*, *BECN1*), гены, кодирующие факторы сплайсинга и компоненты сплайсосомы (*SF1*, *PCBP4*, *CELF3*, *CELF6*, *SNRPB*), белки, взаимодействующие с мРНК (*CIRBP*), компоненты рецепторного сигналинга (*TNFRSF25*, *TNFRSF10C*, *SYK*, *PIK3R2*, *PIK3R5*, *IKBKB*, *NFATC1*, *FOSB*) и другие участники апоптотического каскада (*CASP7*, *BNIP3L*, *BMF*).

Наиболее явной чертой было чёткое разделение паттернов встречаемости исследуемых генов между образцами крови («К» и «Г») и опухолевого очага («Р»). Так, в образцах крови наблюдали высокий сигнал гибридизации зондов, детектирующих мРНК Fas-ассоциированной фосфатазы (PTPN13), каспаз-8, -10, ингибитора апоптоза IAP4, β-варианта мРНК каспазы-9 с вырезанными альтернативными экзонами, сериновой протеазы HtrA2, элементов митохондриального пути апоптоза BAX, BID,

BIM, протеинкиназ (гены *MAPK8*, *PRKCH*, *IKBKE*, *MAP3K14*, *MAP4K4*, *DAPK1*), транскрипционных факторов Мус и JunD, рецептора андрогенов AR, регуляторов сплайсинга HnRNP-Q, SnRNP200, CUGBP1, регулятора каспаз CARP-1. В свою очередь в опухолевом очаге на сравнительно высоком уровне специфически экспрессировались мРНК CD254, сплайс-изоформы 1 («длинный» вариант) TNFSF15, FADD, дельта-изоформы каспазы-1 (следует отметить, что данная изоформа не обладает апоптоз-индуцирующей активностью), сплайс-изоформа 2 индуктора апоптоза COXPD6, сплайс-изоформа 18 индуктора апоптоза BIM, факторов сплайсинга HnRNP-A1, HnRNP-F, HnRNP-H3, SRSF2, SRSF3, SRSF5, SRSF7.

Несмотря на сильное сходство паттернов встречаемости мРНК в образцах крови условно здорового донора и пациента с герпес-вирусной инфекцией, между ними наблюдался ряд различий. Так, в образце «К» на относительно высоком уровне экспрессировались конститутивная и альтернативная изоформы мРНК гена *CFLAR*, β -изоформа мРНК каспазы-3, длинная изоформа мРНК CARP1, тогда как в образце «Г» на относительно высоком уровне экспрессировались мРНК APAF-1, BNIP-3, длинной изоформы адапторного белка P84 R13K.

Таким образом, после первых испытаний сплайсинг-чувствительного ДНК-микрочипа можно заключить, что разработанный биочип позволяет проводить дифференциальную детекцию 225 апоптоз-ассоциированных генов как в контексте оценки суммарной экспрессии, так и на уровне отдельных сплайсированных вариантов мРНК.

Библиографический список

1. Солнцев Л.А., Старикова В.Д., Сахарнов Н.А. и др. Стратегия подбора зондов для изучения совокупности мРНК участников рецептор-опосредованного сигналинга апоптоза // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 3. – С. 515–524.
2. Shchepinov M.S., Case-Green S.C., Southern E.M. (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays // Nucleic Acids Res.– 1997. – Vol. 25. – P. 1155–1161. // Nucleic Acids Res.– Vol. 25. P. 1155–1161.
3. Князев Д.И., Сахарнов Н.А., Цветкова В.Д. и др. Разработка ДНК-микрочипа для мультиплексного анализа экспрессии мРНК основных участников апоптоз-ассоциированного сигналинга // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: Материалы Всероссийской научно-практической конференции (25 мая 2016 г., г. Нижний Новгород). Под ред. д.м.н., проф. Е.И. Ефимова. – Н. Новгород, 2016. – С. 173–179.
4. Guo Z., Guilfoyle R.A., Thiel A.J. et al. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports // Nucleic Acids Res. – 1994.– Vol. 22. P. 5456–5465.
5. Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F. et al. Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data // Biostatistics. – 2003. – Vol. 4.– P. 249–264.
6. Bolstad B. M., Irizarry R.A., Astrand M., Speed T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias // Bioinformatics.–2003.– Vol. 19, N 2.– P. 185–193.

ВИДОСПЕЦИФИЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВИРУСОВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ, ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ВЕТРЯНОЙ ОСПЫ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ В МУЛЬТИПЛЕКСНОМ ФОРМАТЕ

Р.А. Максютлов, Е.В. Гаврилова, С.В. Маренникова, С.Н. Щелкунов

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Разработан метод одностадийной идентификации и дифференциации эпидемиологически значимых вирусов натуральной оспы (VARV) и оспы обезьян (MPXV) с одновременной дифференциацией от вируса ветряной оспы (VZV) с использованием мультиплексного TaqMan ПЦР-анализа в режиме реального времени. Мультиплексный формат позволяет использовать единый протокол и условия ре-

акции для всех детектируемых патогенных микроорганизмов. Учитывая, что образцы пациентов могут также содержать ПЦР-ингибирующие вещества, был разработан внутренний контроль (IC) для устранения ложноотрицательных результатов. Три пары олигонуклеотидных праймеров и четыре гибридизационных зонда с различными флуоресцентными красителями и соответствующими гасителями одновременно использованы для анализа. Гибридизационный зонд, специфичный для последовательности VARV, содержит FAM/BHQ1 в качестве пары краситель/гаситель; MPXV-специфический, JOE/BHQ1; VZV-специфический, TAMRA/BHQ2; и IC-специфический, Cy5/BHQ3.

Аналитическую специфичность разработанного метода в мультиплексном формате оценивали путем анализа панели образцов ДНК 34 штаммов вирусов. Различные штаммы VARV, MPXV и VZV были успешно идентифицированы в мультиплексной ПЦР в реальном времени. Использованная смесь олигонуклеотидов не давала продуктов в ПЦР с ДНК других ортопоксвирусов (вирусов осповакцины, оспы коров, экстремелии и оспы верблюдов), других поксвирусов (вирусы миксомы кроликов и оспы птиц), а также с геномной ДНК человека и ДНК экзантемных патогенов человека, таких как вирусы простого герпеса. Диагностическая специфичность была проверена с использованием 20 тотальных препаратов крови здоровых доноров (отрицательный сигнал).

Аналитическую чувствительность оценивали с использованием рекомбинантных плазмид pVARV-B12R, pMPXV-F3L и pVZV-ORF38 с воспроизводимым уровнем, равным 20 копий для плазмидной ДНК VARV и MPXV и 50 копий для VZV на реакцию. Применимость разработанного анализа для диагностических целей была изучена с использованием клинических и экспериментальных образцов. Архивные клинические образцы VARV, полученные от человека во время программы по ликвидации оспы в 1970–1975 гг., и экспериментальные образцы MPXV, полученные после интраназального заражения сурков штаммом MPXV CDC#V79-I-005, были успешно выявлены в этих образцах.

Разработанный метод для одностадийной, быстрой и специфической дискриминации экзантемных заболеваний, вызванных вирусами оспы обезьян, натуральной оспы и ветряной оспы в первую очередь можно будет использовать в эндемичных по оспе обезьян районах, где диагностика VZV и MPXV инфекций может быть ошибочной.

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ БРУЦЕЛЛЕЗНОГО КОРПУСКУЛЯРНОГО ЦВЕТНОГО L-ДИАГНОСТИКУМА

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

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по бруцеллезу в России остается напряженной [1–3]. Современная система профилактики и борьбы с бруцеллезом основывается на проведении общих ветеринарно-санитарных мероприятий. Одним из наиболее важных элементов этой системы является своевременное выявление возбудителя бруцеллеза. Существенные трудности в диагностике создают циркулирующие в природе измененные варианты возбудителя, в том числе в L-форме, которые, несмотря на их пониженную вирулентность, способны к реверсии в исходные формы и могут вызвать вспышки заболевания. Основным способом лабораторного подтверждения диагноза бруцеллеза человека и животных является серологическое обследование. Сложность диагностики бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме, связана с изменением его биологических свойств при частичной или полной утрате клеточной стенки, это влечет за собой невозможность обнаружения возбудителя существующими сертифицированными диагностическими препаратами и тест-системами. Поэтому поиск измененных форм бруцелл и конструирование на их основе диагностических препаратов для выявления специфических антител является актуальным.

Цель – разработать подходы к конструированию бруцеллезного корпускулярного цветного

L-диагностикума

Материалы и методы

В работе использовали экспериментальный штамм *Brucella abortus* И-206 в стабильной L-форме, на основе которого разработан корпускулярный L-диагностикум [4], красители – гематоксилин Карацци [5] и Романовского-Гимза. Активность и специфичность сконструированного бруцеллезного корпускулярного цветного L-диагностикума определяли с экспериментальной кроличьей сывороткой против бруцелл в L-форме (титр 1:800) (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт) и коммерческой поливалентной бруцеллезной сывороткой (серия 3) (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора).

Результаты

Для приготовления цветного корпускулярного бруцеллезного L-диагностикума апробирован краситель гематоксилин Карацци в различных концентрациях (0,2; 0,3; 0,5%) и температурных режимах окрашивания (20, 37, 56 °C). Активность полученного диагностикума оценивали в пробирочной реакции агглютинации (РА) с экспериментальной кроличьей сывороткой против бруцелл в L-форме. Выявлено, что практически все серии корпускулярного бруцеллезного L-диагностикума не окрашивались красителем и проявляли спонтанную агглютинацию в контролях на два-три креста, поэтому использование красителя гематоксилина Карацци в вышеуказанных режимах окрашивания оказалось неэффективным для конструирования цветного корпускулярного бруцеллезного L-диагностикума.

Для предотвращения склеивания клеток исходную бактериальную массу бруцелл в L-форме смывали раствором NaCl в различных концентрациях (0,9; 2; 3; 5; 6; 8; 10%), однако избежать самоагглютинации антигена не удалось (контроль антигена на один-два креста). Поэтому в дальнейшем проводили работу по поиску стабилизаторов, в качестве которых испытаны: карбонатный буфер 0,03 М с 3% раствором сахарозы, хлористый кальций 10%, а также хлористый кальций 10% с 5% сахарозой. Стабилизаторы добавляли из расчета 0,1 мл на 1 мл бактериальной массы в концентрации 2×10^{10} микробных клеток (м.к.), оставляли на час при комнатной температуре (20 ± 2 °C). В результате проведенных испытаний выявлено, что карбонатный буфер 0,03 М с 3% раствором сахарозы позволяет предотвратить спонтанную агглютинацию корпускулярного L-диагностикума.

Активность и специфичность полученного бруцеллезного L-диагностикума проверяли в РА с бруцеллезной поливалентной коммерческой и экспериментальной кроличьей сывороткой против бруцелл в L-форме. Результаты показали, что L-диагностикум не взаимодействовал с поливалентной бруцеллезной сывороткой, с экспериментальной кроличьей сывороткой против бруцелл в L-форме реагировал до разведения 1:800 на четыре креста, что свидетельствует о его высокой специфичности и активности.

Для улучшения визуализации результатов в РА бруцеллезный L-диагностикум окрашивали красителем, приготовленным по Романовскому-Гимзе в нашей модификации. Бруцеллезный L-диагностикум (инактивированную бактериальную массу *B. abortus* И-206 в L-форме) отмывали от формалина трижды в двух объемах раствора 0,9% NaCl путем центрифугирования при 7 000 об./мин в течение 10 мин. В пробирку с отмытой микробной взвесью наливали раствор 0,9% NaCl до первоначального объема и равный объем красителя. Взвесь тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре (20 ± 2 °C) на 40 мин. После указанной экспозиции окрашенную микробную взвесь осаждали при 7 000 об./мин 10 мин. Супернатант удаляли, а осадок отмывали в растворе 0,9% NaCl пять-шесть раз, пока супернатант не станет светлым при 7 000 об./мин в течение 10 мин. В пробирку с отмытыми окрашенными бактериями добавляли раствор 0,9% NaCl до начального объема.

Полученный цветной бруцеллезный L-диагностикум в концентрациях 4×10^9 , 2×10^9 м.к./мл проверяли на активность и специфичность с сыворотками: поливалентной бруцеллезной и экспериментальной кроличьей против бруцелл в L-форме в РА. Цветной бруцеллезный L-диагностикум в обоих разведениях не взаимодействовал с поливалентной бруцеллезной сывороткой, а с экспериментальной кроличьей сывороткой, против бруцелл в L-форме реагировал до разведения 1:800 на два креста в разведении 2×10^9 м.к./мл, и четыре креста – 4×10^9 м.к./мл.

Таким образом, показано, что полученный нами цветной бруцеллезный L-диагностикум обладает высокой активностью и специфичностью, значительно улучшает визуализацию (агглютинат окрашивается в голубой цвет) результатов и может быть использован для лабораторной диагностики бруцел-

леза, обусловленного возбудителем в L-форме.

Библиографический список

1. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Кулаков Ю.К. и др. Эпидемиологические проявления бруцеллеза в Российской Федерации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 6 (49). – С. 23–28.
2. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнёва С.И. и др. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. // Пробл. ООИ. – 2013. – № 1. – С. 21–24.
3. Лямкин Г.И., Головнёва С.И., Худолеев А.А. и др. Обзор эпизоотической и эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2013 г. и прогноз на 2014 г. // Пробл. ООИ. – 2013. – № 2, – С. 29–32.
4. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л. и др. Способ получения антигенного препарата из бруцелл в L-форме. Патент РФ № 2416429, опубл. 20.04.2011, бюл. № 11.
5. Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Голубинский Е.П. и др. Способ получения бруцеллезного диагностикума. Патент № 2269360, опубл. 10.02.2006, бюл. № 4.

ДИАГНОСТИКА МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

В.В. Морозова¹, Н.В. Фоменко², Ю.Н. Козлова¹, Н.В. Тикунова¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

²ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

Стафилококки (*Staphylococcus* spp.) - грамположительные факультативно-анаэробные малоподвижные бактерии, не образующие спор. К настоящему времени описано более 40 видов, входящих в род *Staphylococcus* [1]. Большинство бактерий из этого рода в норме обитают на коже и слизистых человека и животных, а также входят в состав почвенных микробных сообществ [2]. В то же время стафилококки способны поражать практически любые органы и ткани организма человека, вызывая поверхностные и глубокие гнойные инфекции, инфекции дыхательных и мочевыводящих путей, гнойно-некротические процессы в послеоперационных ранах, парапротезные инфекции, а также провоцировать пищевые отравления и интоксикации. Считается, что более 85% всех стафилококковых инфекций человека вызвано *S. aureus* [2]. В последние годы участились случаи гнойно-септических инфекций у людей, возбудителями которых являются *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*. Они значительно чаще стали регистрироваться как нозокомиальные инфекции, особенно у больных в отделениях интенсивной терапии и в хирургических отделениях, причем какое-то время они могут протекать в виде бессимптомной бактериемии, не реализуя классических манифестных форм гнойной инфекции, в то же время резко истощая компенсаторные механизмы больного и повышая риск неблагоприятных исходов [3, 4].

Особая опасность внутрибольничных стафилококковых инфекций заключается в повышенной вирулентности и патогенности таких штаммов, а также в их частой устойчивости к различным антибиотикам. Особенно трудно поддаются лечению заболевания, вызванные метициллин-резистентными стафилококками (MRS) [5, 6], обладающими устойчивостью к бета-лактамам – группе антибиотиков, которая включает метициллин, оксациллин, ингибитор-защищенные аминопенициллины, цефалоспорины всех поколений, карбапенемы и пр. Идентификация метициллин-резистентных стафилококков важна для назначения адекватной лекарственной терапии. В связи с этим востребована быстрая и точная диагностика метициллин-резистентности клинических штаммов стафилококков.

Целью данного исследования являлась разработка диагностики метициллин-резистентности штаммов стафилококков методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-рв).

Для тестирования была использована коллекция из 100 штаммов стафилококков, выделенных ранее из различных образцов в Новосибирской области и депонированных в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН (КЭМТК ИХБФМ СО РАН). Из 100 штаммов

85 были изолированы от здоровых и больных людей (48 штаммов – от пациентов с торпидными трофическими язвами, парапротезной инфекцией и инфекцией мягких тканей и 37 – от условно здоровых лиц), 15 штаммов выделены от животных и из окружающей среды.

Таблица.

Основные характеристики коллекции штаммов стафилококков

№	Вид стафилококка	Всего, шт	Штаммы от больных из стационаров, шт	Внебольничные штаммы, шт	Штаммы от условно здоровых людей и амбулаторных больных, шт	Штаммы от животных и из окружающей среды, шт
1	<i>S. aureus</i>	56	38	18	15	3
2	<i>S. capitis</i>	2	0	2	2	
3	<i>S. epidermidis</i>	24	6	18	13	5
4	<i>S. equorum</i>	1	0	1	1	0
5	<i>S. haemolyticus</i>	2	1	1	1	0
6	<i>S. hominis</i>	4	1	3	3	0
7	<i>S. intermedius</i>	1	0	1	0	1
8	<i>S. lentus</i>	1	0	1	0	1
9	<i>S. pseudintermedius</i>	4	0	4	0	4
10	<i>S. simulans</i>	2	1	1	1	0
11	<i>S. warneri</i>	3	1	2	1	1
ИТОГО		100	48	52	37	15

Видовая принадлежность стафилококков определялась по последовательности гена 16S рРНК [8]. Среди всех штаммов более половины составили штаммы *S. aureus*, около трети - штаммы *S. epidermidis* (табл.). Видовое разнообразие внебольничных штаммов и штаммов, выделенных из стационаров, отличалось. Так, среди штаммов, полученных от больных из стационаров, доминировали *S. aureus* (79,1%), *S. epidermidis* составили около 12,5%, а *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. hominis* и *S. warneri* встретились в единичных случаях. Среди внебольничных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* выделены в примерно равных соотношениях, кроме того, шире спектр видов – у условно здоровых и амбулаторных больных, кроме вышеперечисленных видов присутствовали *S. capitis*, *S. equorum* (табл.).

Известно, что резистентность стафилококков к β -лактамам обусловлена наличием гена *mecA*, кодирующего вариант ПСБ2а пенициллин связывающего белка. ПСБ2а обладает почти в тысячу раз меньшим аффинитетом к β -лактамам, чем остальные ПСБ, и стафилококк – носитель гена *mecA*, способен выдерживать воздействие этих антибиотиков [7]. Поэтому для диагностики MRS штаммов методом ПЦР-рв были разработаны следующие олигонуклеотиды, специфичные к последовательности гена *mecA*:

Fmec 5'-AGGGACTCGAAAACTTTACGAT-3',

Rmec 5'-ATTAATGTATGTGCGATTGTATTGC-3',

Zmec 5'-(HEX)-GCTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCAATCGT-(BHQ1)-3'

Штаммы стафилококков тестировали на наличие гена *mecA* методом ПЦР-рв. Для этого из 100 мкл бактериальной суспензии выделяли ДНК с использованием набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). В качестве положительного контроля ПЦР использовали ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО), входящего в состав набора для выделения. ПЦР-рв проводили с использованием соответствующих праймеров и зондов, на амплификаторе с детекцией в режиме реального времени «CFX96 Touch™» («Bio-Rad», США). Количественную оценку ДНК осуществляли по калибровочным кривым, построенным по результатам анализа серии разведений стандартного образца, приготовленного с использованием очищенной ДНК *S. aureus* штамм КЭМТК 707, концентрация которой была определена спектрофотометрически. В качестве контрольных штаммов для фенотипических тестов и генотипирования использовали чувствительные к метициллину штаммы *S. aureus* ATCC 25923 и *S. aureus* ATCC 29213 и резистентный штамм *S. aureus* ATCC 43300.

Параллельно штаммы исследовали на фенотипическую устойчивость к антибиотикам диско-

диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности к антибактериальным препаратам» с использованием агара Мюллера-Хинтона. MRS штаммы выявляли фенотипически по наличию устойчивости к оксациллину.

Наличие гена *mecA* было выявлено у 19 штаммов стафилококков, при этом фенотипическое тестирование позволило идентифицировать 18 MRS штаммов, 11 из которых – *S. aureus*, 6 – *S. epidermidis*, 1 – *S. haemolyticus*. Оба вида анализа (выявление гена *mecA* и анализ устойчивости к оксациллину) показали высокую степень соответствия (99%). Только один из штаммов *S. epidermidis* КЭМТК 2034 обладал промежуточной фенотипической устойчивостью к оксациллину, при этом выявление гена *mecA* подтвердило его принадлежность к метициллин-резистентным эпидермальным стафилококкам. Среди штаммов, фенотипически чувствительных к оксациллину, ген *mecA* выявлен не был.

Таким образом, детекция гена *mecA* методом ПЦР в реальном времени является специфичным методом и превосходит фенотипический метод по чувствительности и скорости анализа; выявление гена *mecA* у стафилококков может рассматриваться как альтернатива фенотипическому выявлению MRS штаммов.

Исследование финансировалось из средств проекта VI.55.1.1 «Геномика бактериальных и вирусных сообществ» Минобрнауки РФ и проекта № 2014-155 «Разработка экспериментальных образцов коктейлей бактериофагов для лечения гнойно-воспалительных заболеваний при синдроме диабетической стопы» Программы фундаментальных исследований Президиума РАН.

Библиографический список

1. Ghebremedhin B., Laver F., König W., König B. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences // J Clin Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 1019–1025.
2. Dworkin M. et al. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus* // The Prokaryotes. – New York: Springer US, 2006. – 310 p.
3. Bond R., Loeffler A. Что произошло со *Staphylococcus intermedius*? Пересмотр таксономической классификации и развитие лекарственной полирезистентности // J Small Anim. Pract. Российское издание. – 2012. – Vol. 3. – P. 5–13.
4. Hidron A.I., Edwards J.R., Patel J. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007 // Infect. control hosp. epidemiol. – 2008. – Vol. 29. – P. 996–1011.
5. Карпов И.А., Качанко Е.Ф. Внебольничные инфекции, обусловленные метициллинрезистентным стафилококком (MRSA): подходы к антибактериальной терапии // Медицинские новости. – 2006. – Т. 10. – С. 28–32.
6. Черный В.И., Колесников А.Н., Кузнецова И.В. и др. Антибактериальная терапия в медицине критических состояний. – Донецк, 2010. – 392 с.
7. Сидоренко С. В., Тишков В. И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биол. химии. – 2004. – Т. 44. – С. 263–306.
8. Wang Y., Qian P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, N 10 – e7401.

АВТОНОМНЫЙ НАБОР ДЛЯ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ

О.В. Нечитайло, В.И. Офицеров, А.Г. Полтавченко

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Введение

Одной из наиболее важных и сложных задач современной медицины является диагностика гемотрансмиссивных инфекций (ГТИ), передающихся через кровь и ее продукты. Большинство ГТИ чрезвычайно широко распространены среди населения, для них характерно латентное или скрытое тече-

ние, отсутствие специфичных симптомов, часто заболевания встречаются в форме «микст-инфекций» в различных сочетаниях. Распространение ГТИ-инфекций остается одной из актуальных проблем и представляет серьезную угрозу социальному и экономическому развитию страны. В связи с этим они внесены в «Перечень социально значимых заболеваний и перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих», утвержденный Постановлением Правительства Российской Федерации № 715 от 1 декабря 2004 г.

В данной работе описана технология мультиплексного дот-иммуноанализа, потенциально пригодная для комплексной диагностики инфекционных заболеваний во внелабораторных условиях.

Результаты и обсуждение

Набор для мультиплексного тестирования включает в себя комплект белковых матриц и аналитическую ванну. Основные элементы набора, схема рабочей области иммуночипа и примеры результатов дот-анализа представлены на рис. 1.

Белковая матрица (иммуночип) представляет собой плоскую подложку, на поверхности которой в определенном порядке дискретно иммобилизован набор иммунореагентов захвата. При выборе стратегии изготовления чипов мы отказались от их чрезмерной миниатюризации. Такой подход позволяет легко контролировать нанесение антител на подложку и учитывать результаты визуально.

Материалом подложки могут служить некоторые марки синтетической бумаги [1]. Они обладают однородностью поверхности; белым фоном; инертностью к растворам, используемым при выполнении анализа; способностью адсорбировать и прочно удерживать на своей поверхности белки.

Иммобилизацию реагентов захвата на подложке проводили физической адсорбцией. Экспериментально установлено, что оптимальным для иммобилизации белков на синтетической бумаге является 0,005-0,01 М боратный буферный раствор в диапазоне pH 6,0-8,0. Насыщение участка подложки достигается при нанесении 2 мкл сорбционной смеси, содержащей 10–20 мкг/мл белка (20–40 нг белка на одно пятно) [8]. При сенсibilизации ячейки полистирольного планшета для иммуноферментного анализа (ИФА) обычно используют 100 мкл раствора с концентрацией иммунореагента около 5 мкг/мл. Таким образом, расход реагента захвата на один анализ в нашем наборе по крайней мере в 10 раз

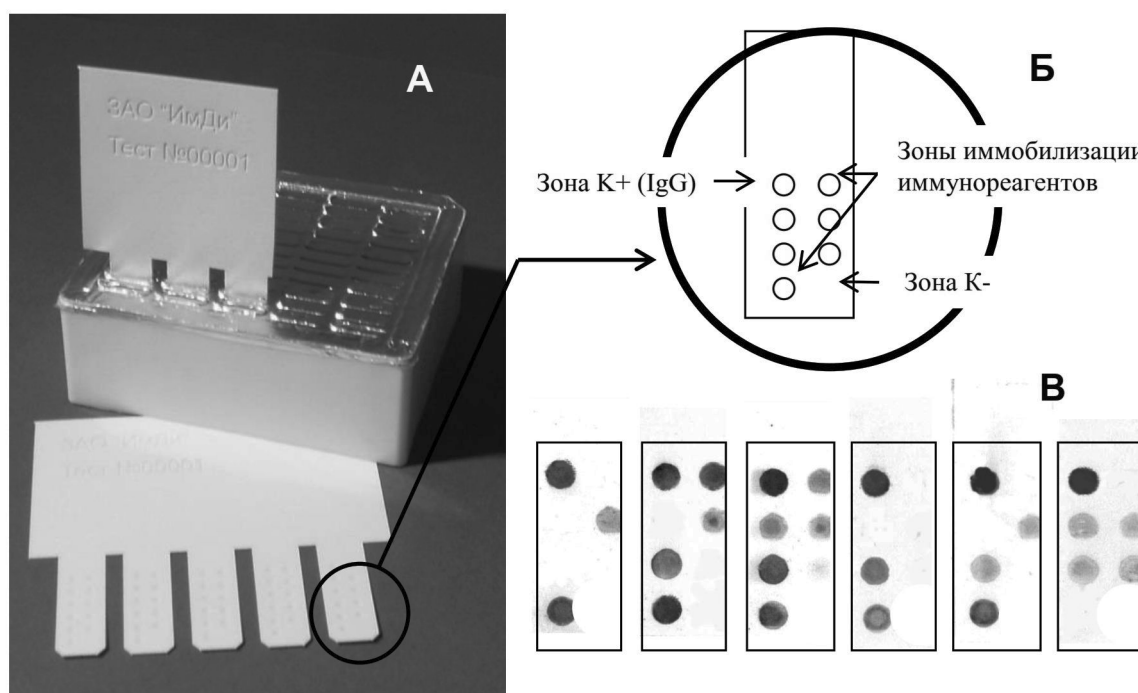


Рис. 1. Основные элементы набора для мультиплексного дот-иммуноанализа маркеров инфекционных заболеваний (А), схема рабочей области иммуночипа (Б) и примеры результатов дот-анализа (В).

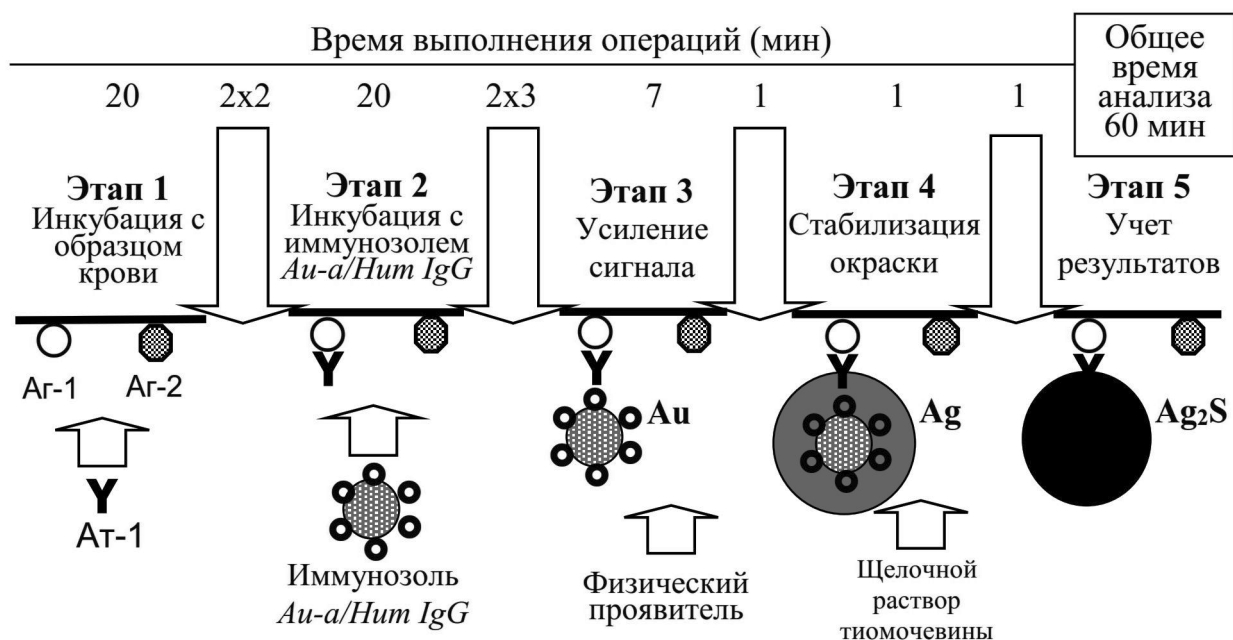


Рис. 2. Общая схема мультиплексного дот-иммуноанализа антител с применением иммунозоля золота, усилением сигнала физическим проявлением и стабилизацией окраски щелочным раствором тиомочевины

меньше, чем в ИФА.

Мы сравнили два режима иммобилизации антител: первый – сушка капель (2 мкл) сорбционной смеси на воздухе при комнатной температуре и второй – инкубация подложек с сорбционной смесью во влажной камере при 4 °С в течение 8 ч. Результаты показали, что наиболее эффективная сорбция происходит при инкубации во влажной камере, а сушка капель на воздухе значительно снижает сигнал [8].

Многоячеечная аналитическая ванна изготовлена из инертного полимерного материала, заполнена готовыми к использованию растворами и герметизирована фольгированным материалом. Ванна объединяет 5 рядов для индивидуальных тестов [7], также возможно одновременно выполнять 5 мультиплексных тестирований.

В мультиплексном анализе используют различные метки и стратегии генерирования сигнала [11, 13]. Сравнение наиболее популярных меток – пероксидазы, щелочной фосфатазы и коллоидного золота с различными системами проявления оптического сигнала показало, что золи золота в сочетании с серебряным проявлением имеют существенные преимущества перед ферментными метками и обеспечивают максимальную чувствительность и наглядность результатов [9].

Схема анализа (рис. 2) включает усиление оптического сигнала за счет каталитического восстановления на золотых частицах серебра из проявителя. Проявитель содержит растворимую соль серебра и метол (восстановитель) в кислой среде [9]. В наших наборах проявитель представлен в виде таблеток (4 мг), и 0,4%-ного раствора нитрата серебра. Бывают случаи неравномерных отложений серебра, имеющих нюансы окраски. Для того чтобы избежать связанных с этим эффектом осложнений при учете результатов в схему анализа введен этап стабилизации сигнала, заключающийся в кратковременной (1 мин) обработке проявленного иммуночипа в щелочном растворе тиомочевины [6]. Анализ проводится при комнатной температуре и предусматривает инкубации с образцом и иммунозолом в течение 20–25 мин с промежуточными промывками иммуночипов (кратность промывок указана на рис. 2) по 1–2 мин.

Возможен визуальный и инструментальный учет результатов анализа. Инструментальный учет заключается в обработке отсканированного изображения чипа специальной компьютерной программой, при этом возможна денситометрия, вычитание фоновых значений (ОПкрит) по индивидуальным точкам иммуночипа, получение ориентировочных количественных показателей [3].

Сравнение мультиплексных тестов с соответствующими моноспецифическими наборами показало,

что по чувствительности, специфичности и воспроизводимости наши наборы не уступают планшетному варианту ИФА [4, 10], но имеют перед ними преимущества в информативности, оперативности, автономности, простоте выполнения и стоимости анализа. Набор для 20 мультиплексных тестирований имеет вес 400-500 г, он удобен при транспортировке, содержит все необходимые компоненты и может использоваться во внелабораторных условиях.

Заключение

Описанный выше мультиплексный анализ при сходной чувствительности имеет очевидные преимущества перед традиционным ИФА по информативности, скорости получения результатов, расходу реагентов, трудоемкости и удельной стоимости. Автономность и простота выполнения анализа позволяют применять его в полевых условиях как для диагностики инфекционных заболеваний, так и для эпидемиологического контроля населения.

Работа выполнена при частичной поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0020 (RFMEF1607114X0020)).

Библиографический список

1. Ерш А. В., Полтавченко А. Г. Выбор формата и материала для изготовления подложки белковых чипов // Международный Научный Институт Educatio. – 2014. – № 3. – С. 16–19.
2. Ерш А. В., Полтавченко А. Г., Пьянков С. А. и др. Метод комплексной оценки гуморального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям // Вопр. вирусол. – 2015. – № 1. – С. 45–49.
3. Полтавченко А. Г., Ерш А. В., Пьянков С. А. и др. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. Инструментальный учет результатов анализа // Биотехнология. – 2013. – № 4. – С. 74–82.
4. Полтавченко А. Г., Яковченко А. М., Кривенчук Н. А. Многопрофильная иммунохимическая индикация возбудителей инфекционных заболеваний // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 5. – С. 39–42.
5. Полтавченко А. Г., Кривенчук Н. А., Серпинский О. И., Тюнников Г. И. Способ многопрофильного иммунохимического выявления антигенов в жидких образцах. – Патент РФ № 2296995, приоритет от 20.06.03, опубл. 10.04.2007, Бюл. № 10.
6. Полтавченко А. Г., Кривенчук Н. А., Ерш А. В., Агафонов А. П., Сергеев А. Н. Набор для многопрофильного иммунологического анализа антител в препаратах крови. – Патент РФ № 2495434, приоритет от 09.12.2011, опубл. 10.10.2013, Бюл. № 28.
7. Полтавченко А. Г., Кривенчук Н. А., Ерш А. В., Снопков В. П., Филатов П. В., Буторин Д. В. «Ванна для выполнения мультиплексного дот-иммуноанализа». – Патент № 2517035, приоритет от 13.02.2013, опубл. 27.05.2014, Бюлл. № 15.
8. Полтавченко А. Г., Яковченко А. М., Кривенчук Н. А. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 2. Иммобилизация антигенов на подложке белкового чипа // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 86–94.
9. Полтавченко А. Г., Яковченко А. М., Кривенчук Н. А., Карпышев Н. Н. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 3. Визуализация результатов анализа // Биотехнология. – 2007. – № 2. – С. 63–71.
10. Полтавченко А. Г., Яковченко А. М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. 4. Лабораторные испытания многопрофильного теста // Биотехнология. – 2007. – № 3. – С. 88–94.
11. Bastarache J. A., Koyama T., Wickersham N. E. et al. Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: A validation study // J. Immunol. Meth. – 2011. – Vol. 367. – P. 33–39.
12. Jones K. 15th Anniversary Essay: Assay Development // IVDT. – 2010. – N 8. – P. 30–38.
13. Kosack S., Nick S., Shanks L. Diagnostic accuracy evaluation of the ImmunoFlow HCV rapid immunochromatographic test for the detection of hepatitis C antibodies // J. Immunol. Meth. – 2014. – Vol. 204. – P. 6–10.
14. Sinclair J. C. Constructing arrays of proteins // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2013. – Vol. 17. – P. 946–951.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ВОЗВРАТНОЙ КЛЕЩЕВОЙ ЛИХОРАДКИ, ВЫЗВАННОЙ *BORRELIA MIYAMOTOI*, В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

М.В. Савельева¹, Н.В. Тикунова², Е.И. Краснова^{1,3}, В.А. Рар², В.В. Проворова¹,
Н.И. Хохлова¹, О.В. Мельникова¹, Ю.В. Сабитова², Д.В. Капустин³

¹ ГБУЗ "Городская инфекционная клиническая больница № 1", Новосибирск; ²ФГБУН
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;
³Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального
образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия

Боррелиозы – группа инфекционных заболеваний, возбудителями которых являются спирохеты рода *Borrelia*. У человека боррелии могут вызвать иксодовый клещевой боррелиоз, также называемый Лайм-боррелиозом, и возвратный тиф (возвратную лихорадку). Боррелии — возбудители этих двух заболеваний – имеют существенные генетические различия [1]. Этиологическими агентами иксодового клещевого боррелиоза являются бактерии комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) [2], из которых на территории Западной Сибири встречаются *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii* и *B. valaisiana* [3]. До недавнего времени полагали, что боррелии, вызывающие возвратный тиф, переносятся только вшами или аргасовыми клещами [1]. Однако, в 1995 г. в Японии в клещах *Ixodes persulcatus* обнаружили новый вид боррелий – *B. miyamotoi* [4], также принадлежащий к группе возбудителей возвратного тифа [5]. Позднее *B. miyamotoi* были найдены в иксодовых клещах, обитающих в Российской Федерации [6, 7], в различных европейских странах и в Северной Америке [8]. В Западной Сибири уровень зараженности иксодовых клещей *B. miyamotoi* невысок и обычно варьирует от 1,3% до 15,4% [6]. В 2011 г. были опубликованы результаты исследований российских ученых, доказавших способность *B. miyamotoi* вызывать возвратную лихорадку [9]. Позднее боррелиозы, вызванные *B. miyamotoi* (БМ), были описаны и другими исследователями, причем в некоторых регионах у 58% больных безэритемной формой боррелиоза методом ПЦР в крови выявлялась ДНК *B. miyamotoi* [10]. Изучение клинических проявлений БМ показало, что в подавляющем большинстве случаев это заболевание протекало в безэритемной форме, с выраженной интоксикацией, что существенно затрудняло дифференциальный диагноз с клещевым энцефалитом [9]. Случаи заболеваний человека, вызванные *B. miyamotoi*, в России описаны мало, преимущественно в Европейской части страны и на Урале. Особенности клинических проявлений острого и возможность развития хронических форм данного заболевания в Западно-Сибирском регионе остаются неизученными. Кроме того, традиционные наборы для выявления иммуноглобулинов класса М (IgM) против возбудителей ИКБ не могут быть использованы для диагностики БМ, что ставит вопрос о разработке адекватных методик для включения в комплекс обследования на клещевые инфекции.

Цель данной работы – верификация диагноза боррелиоза, вызванного *B. miyamotoi*, у жителей Новосибирской области и изучение его клинических и лабораторных особенностей.

Кровь 164 пациентов, поступивших в Городскую инфекционную клиническую больницу № 1 Новосибирска в период с мая по июль 2015 г. с ведущим синдромом лихорадки, возникшей после укуса клеща (эритема на месте укуса клеща при поступлении отсутствовала), исследовали на присутствие ДНК *B. miyamotoi*. Для этого боррелии осаждали центрифугированием из плазмы крови, лизировали в буфере, содержащем 4 М гуанидин тиоционат, 0,1 М Трис-HCl, pH 6,4, 0,045 М ЭДТА pH 8,0, 1,3% Тритон X-100, при 65 °С в течение 10 мин, и из полученного лизата выделяли ДНК с использованием набора «Проба НК» (ДНК-технология, Россия) согласно инструкции производителя. ДНК *B. miyamotoi* выявляли методом двухраундовой ПЦР в присутствии видоспецифичных праймеров из области гена

р66 и гена *glpQ* *B. miyamotoi*, как описано ранее [9]. Полученные ПЦР-фрагменты составляли 570 н. п. и 425 н. п. соответственно.

Проведенный анализ позволил выявить ДНК *B. miyamotoi* в крови у 20 пациентов. Для всех положительных образцов были отсекарованы фрагменты гена *р66* длиной 514 н. п. и гена *glpQ* длиной 359 н. п. *B. miyamotoi*. Все определенные последовательности фрагментов гена *р66* генов были идентичны друг другу и соответствовали азиатскому типу *B. miyamotoi*, ранее обнаруженному в клещах *I. persulcatus* на территории Новосибирской области, в других регионах России и в Латвии [9, 10, 14]. Аналогично, все определенные последовательности фрагментов гена *glpQ* также были идентичны друг другу и соответствовали азиатскому типу *B. miyamotoi*.

Заболевание у всех больных начиналось остро – с подъема температуры и появления симптомов интоксикации. У большинства больных (14/20, 70%) с выявленной ДНК *B. miyamotoi* отмечалась высокая лихорадка (13/20) и даже гиперпирексия (1/20), у 4-х пациентов она была умеренной, и у 2-х человека был субфебрилитет. Инкубационный период у таких больных варьировал от 1 до 32 дней, составив в среднем $14,5 \pm 7,3$ дней. Интересно, что средние показатели высоты температуры в первый день болезни и максимальной температуры у больных с ДНК *B. miyamotoi* были достоверно выше, чем у больных иксодовым клещевым боррелиозом – $38,7 \pm 0,9$ °С, против $37,6 \pm 0,6$ °С и $39,1 \pm 0,9$ °С против $37,7 \pm 0,7$ °С соответственно ($p < 0,001$). Длительность лихорадочного периода у таких больных колебалась от 2 до 10 дней и составила в среднем $3,6 \pm 2,1$ дня. У 4-х больных наблюдалась двухволновая лихорадка; вторая волна повышения температуры возникала после 2–3 дней апиреksии и характеризовалась кратковременным субфебрилитетом.

У большинства больных с ДНК *B. miyamotoi* отмечали проявления интоксикации (19/20, 95%): слабость и головная боль были зарегистрированы у большинства больных ($n = 19$), миалгии – у 13 человек, артралгии – у 5 пациентов. У одного больного с ДНК *B. miyamotoi* был выявлен кратковременный менингеальный синдром, который развился на 2-е сутки заболевания на фоне лихорадки до $38,6$ °С и проявлялся сильной головной болью и болями в шее при движении. Был выявлен положительный симптом Кернига, ригидность мышц затылка составила 2 поперечных пальца. Симптомы регрессировали через сутки и были расценены как менингизм.

В гемограмме для большинства больных с ДНК *B. miyamotoi* был характерен нормоцитоз (12/20, 60%), у 25% пациентов (5/20) регистрировалась лейкопения. Относительный нейтрофилез и палочкоядерный сдвиг лейкоцитарной формулы достоверно чаще отмечали у больных с ДНК *B. miyamotoi*, чем у больных иксодовым клещевым боррелиозом – 65% (13/20) и 40% (8/20) против 33% и 6,7% у больных ИКБ соответственно ($p < 0,05$).

Восьми пациентам с ДНК *B. miyamotoi* провели биохимическое исследование крови. В целом у 44% больных) выявлено повышение трансаминаз, при этом фоновой патологии печени не было ни у одного из обследованных больных. Интересно, что у больных с ДНК *B. miyamotoi* повышение трансаминаз обнаруживалось чаще, чем у больных иксодовым клещевым боррелиозом, так, АЛТ была повышена у большинства больных с ДНК *B. miyamotoi* (6 из 8 человек), чем у больных ИКБ (2 из 10 человек) ($p < 0,05$). Повышение аспартатаминотрансферазы выявлено у 62,5% больных с ДНК *B. miyamotoi* (5 из 8 человек) и лишь у 20% больных ИКБ (2 из 10 человек) ($p = 0,09$).

Мигрирующая эритема у больных с ДНК *B. miyamotoi* не развивалась.

Всем больным с ДНК *B. miyamotoi* проводилась антибактериальная терапия доксициклином перорально в дозе 100 мг в сутки или цефтриаксоном в дозе 2 г в сутки внутримышечно продолжительностью от 3 до 10 дней. Исход заболевания у всех больных был благоприятным.

На основании проведенных исследований клинико-лабораторных особенностей клещевого боррелиоза, вызванного *B. miyamotoi*, можно заключить, что у пациентов, заболевших после укуса клеща, произошедшего на территории Новосибирской области в эпидсезоне 2015 г., выявлено присутствие в крови ДНК *B. miyamotoi* азиатского типа. Рекомендуются включать в комплекс методик обследования на клещевые инфекции тест-системы для выявления *B. miyamotoi*.

Библиографический список

1. Barbour A.G., Hayes S.F. Biology of Borrelia species // Microbiol Reviews. – 1986. – Vol. 50, N 4. – P. 381–400.

2. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1999. – Vol. 12, N 4. – P. 633–653.
3. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Russia // *Ticks Tick Borne Dis*. – 2013. – Vol. 4, N 4. – P. 275–279.
4. Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan // *Int J Syst Bacteriol*. – 1995. – Vol. 45, N 4. – P. 804–810.
5. Fukunaga M., Koreki Y. The flagellin gene of *Borrelia miyamotoi* sp. nov. and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species // *FEMS Microbiol Lett*. – 1995. – Vol. 134, N 2–3. – P. 255–258.
6. Фоменко Н.В., Ливанова Н.Н., Боргояков В.Ю. и др. Выявление *Borrelia miyamotoi* в клещах *Ixodes persulcatus* на территории России // *Паразитология*. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 201–211.
7. Войцеховская И.В., Козлова И.В., Сунцова О.В. и др. Циркуляция *Borrelia miyamotoi* в природных очагах Прибайкалья // *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*. – 2014. – Т. 8. – С. 56–65.
8. Crowder C.D., Carolan H.E., Rounds M.A. et al. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States // *Emerg Infect Dis*. – 2014. – Vol. 20, N 10. – P. 1678–1682.
9. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M. et al. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia // *Emerg Infect Dis*. – 2011. – Vol. 17, N 10. – P. 1816–1823.
10. Krause P.J., Narasimhan S., Wormser G.P. et al. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States // *New Engl J Med*. – 2013. – Vol. 368. – P. 291–293.

РАЗРАБОТКА ЭРИТРОЦИТАРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕЛИОИДОЗА

Е.В. Савина, И.В. Новицкая, Ю.С. Татаренко

*ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора, Волгоград,
Россия*

В последние годы в мире, независимо от уровня экономического развития страны, отмечается рост инфекционной заболеваемости населения. Конструирование препаратов для выявления патогена является приоритетной задачей здравоохранения. Особого внимания заслуживают вопросы идентификации возбудителей особо опасных инфекций, эндемические очаги которых находятся вне территории нашей страны [1, 3].

Мелиоидоз - особо опасная инфекция людей и животных, протекающая с образованием в различных органах множественных абсцессов и сопровождающаяся высоким уровнем летальности – до 40–70% [2, 4]. Возбудитель мелиоидоза входит в ведущие группы патогенов по степени опасности для человека, и в национальных системах классификации особо опасных возбудителей России, США, Великобритании и Канады его относят ко II группе патогенности. Возбудитель мелиоидозной инфекции распространен в эндемичных районах Таиланда, Вьетнама, Индии, Северной Америки и Австралии и с увеличением потоков населения, развития туризма, предстоящего чемпионата мира по футболу вероятность завозных случаев на территорию Российской Федерации резко возрастает [2, 4, 5].

В схемах лабораторного анализа особую актуальность приобретают экспресс-методы иммуноанализа, которые позволяют проводить диагностику заболевания без выделения культуры, и таким образом сократить время получения результата и начала терапии.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) зарекомендовала себя как высокоспецифичный агглютинационный тест, позволяющий выявлять возбудителя мелиоидоза в короткие сроки и отличающийся экономичностью, доступностью, а также отсутствием необходимости использования дорогостоящего оборудования и реактивов.

В настоящее время для РНГА используют диагностикум поликлонального происхождения («Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый сухой» №

ФСР 2011/11613 Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Россия), позволяющий выявлять в исследуемом материале возбудителей как мелиоидоза, так и сапа.

Целью нашего исследования явилось конструирование диагностикума для РНГА на основе мелиоидозных моноклональных иммуноглобулинов, с помощью которого становится возможным дифференциация возбудителей этих особо опасных буркхольдериезов.

Производство мелиоидозного моноклонального иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума происходило в 2 этапа:

- получение моноклональных антител к возбудителю мелиоидоза с помощью гибридомной технологии по *Köhler, Milstein* (1975) [6, 7];
- конструирование эритроцитарного препарата для РНГА.

Клон гибридной клетки, продуцирующей пул специфических иммуноглобулинов, получали путем слияния клеток-партнеров [6]. Клетки миеломы X63-Ag 8.653 выводили в логарифмическую фазу роста и культивировали в среде RPMI-1640. Иммунные спленоциты получали от инбредных мышей линии *BALB/c*, иммунизированных клетками *B. pseudomallei* 56830. Контроль уровня иммунного ответа осуществляли путем взятия крови прижизненно из ретроорбитального пространства и определения уровня сывороточных антител в ТИФМ [4]. По результатам реакции в опыт по гибридизации была отобрана мышь с наиболее высоким уровнем сывороточных антител по отношению к возбудителю мелиоидоза. Слияние клеток проводили с помощью полиэтиленгликоля высокой степени очистки. Контроль роста гибридом осуществляли визуально под объективом инвертированного микроскопа *Eclipse TS 100*. Уровень продукции мелиоидозных антител определяли в ТИФМ. Антителопродуцирующие гибридомы клонировали не менее чем трехкратно методом лимитирующих разведений. Накопление МКА осуществляли *in vivo* в асцитической жидкости линейных мышей, предварительно праймированных пристаном. По мере накопления проводили отбор асцитической жидкости, после чего методом двукратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония выделяли фракцию мелиоидозных иммуноглобулинов.

Для получения биологического носителя кровь барана, взятую из яремной вены, фильтровали, отмывали, а полученные эритроциты разводили 0,15 М раствором NaCl (pH 7,2) до концентрации клеток 8%.

Формалинизацию эритроцитов осуществляли путем добавления равного объема формалина с содержанием 3% формальдегида в течение 24 ч на водяной бане при 37 °С. Формализованные эритроциты отмывали 0,15 М NaCl (pH 7,2) и суспендировали (1:1) в 0,15 М NaCl (pH 7,2), содержащим формалин в конечной концентрации 1%.

С целью более эффективной сенсibilизации эритроцитарных клеток проводили дополнительную подготовку их поверхности, обрабатывая формализованные эритроциты танином. Для этого взвесь эритроцитов инкубировали в равных объемах с раствором танина на водяной бане при 37 °С в течение 15 мин.

Оптимальную сенсibilизирующую дозу определяли путем добавления к эритроцитам барана моноклональных иммуноглобулинов в концентрациях от 400 мкг/мл до 50 мкг/мл. На основании 4 выполненных вариантов пробной сенсibilизации в РНГА определили оптимальную концентрацию сенситина – 100 мкг/мл. Для получения опытной серии использовали двойную сенсibilизирующую дозу (200 мкг/мл).

Оценку аналитических характеристик полученного препарата проводили в РНГА, используя набор коллекционных штаммов возбудителей мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* 56830, 56770, 100, С – 141, сапа *Burkholderia mallei* 10230, 11, 8, 5584, а также взвесей гетерологичных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* 4000, *Burkholderia cepacia* 8235, *Escherichia coli* 011, *Brucella abortus* BA-19 и др.

В отличие от препаратов поликлонального происхождения, диагностикум на основе МКА отличался видоспецифичностью. Чувствительность по отношению к возбудителям мелиоидоза в микроварианте РНГА составила $3,12 \times 10^6$ – $9,7 \times 10^4$ м.к./мл, при этом как с близкородственным возбудителем сапа, так и условно-патогенными культурами микроорганизмов в дозах до 10^7 м.к./мл гемагглютинации отмечено не было.

В результате проведенных исследований удалось получить экспериментальную серию эритроцитарного иммуноглобулинового моноклонального мелиоидозного диагностикума, который обладает высокими видоспецифичными аналитическими характеристиками, что доказывает перспективность его использования при экспресс-диагностике мелиоидоза с помощью РНГА.

Библиографический список

- 1.Белая О.Ф., Пак С.Г. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекционных заболеваний // Вестник РАМН. – 2010. – № 11. – С. 50–53.
- 2.Демина Ю. В., Пакскина Н. Д., Илюхин В. И. и др. Лабораторная диагностика мелиоидоза (МУ 4.2.2787-10.4.2) . – Изданы ФЦГиЭ. – 2011.
- 3.Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.:ЗАО «Шико», 2013.– 560 с.
- 4.Новицкая И. В., Савина Е.В. // Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней: Материалы Междунар. науч.-практ. конф. (г. Сочи, 25–26 мая 2015 г.). – М., 2015. – С. 298–300.
- 5.Chieng S., Carreto L., Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional adaptation in macrophages // BMC Genomics.–2012.– Vol. 13.– P. 328.
- 6.Limmathurtsakul, D., Wuthiekanun V., Chantratita N. et al. *Burkholderia pseudomallei* is spatially distributed in soil in northeast Thailand // PLoS Negl Trop Dis.– 2010.– Vol.4, N 6: e694.
- 7.Shivanand P. Hybridomatechnology for production of monoclonal antibodies // Intern. J. of Pharmac. Scien. Rev. &Res. – 2010.– Vol. 1, N 2.– P. 88– 94.
- 8.Zhanq C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies // Methods Mol Biol. – 2012. –Vol. 90. – P.117.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА В КРОВИ МЕТОДОМ ВРЕМЯПРОЛЕТНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Д.В. Ульшина, Д.А. Ковалев, Д.Г. Пономаренко, А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

В Российской Федерации, по данным Федеральной службы по ветеринарному надзору, отмечено ежегодное увеличение числа больных сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота [1]. В свою очередь эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу определяется неблагополучной эпизоотической обстановкой, которая не имеет тенденции к стабилизации.

Одним из активно развивающихся направлений исследования является изучение возможностей применения MALDI-TOF MS в целях индикации возбудителей инфекционных болезней, в том числе возбудителя бруцеллеза, в клинических или иных контаминированных образцах на основании выявления на MALDI-TOF масс-спектрах групп высокоспецифичных фрагментов без этапа выделения чистой культуры на стадии пробоподготовки [2]. MALDI-TOF MS успешно применяется для идентификации бруцелл до уровня рода при анализе гемокультур, в частности, с использованием наборов MALDI Serpityper Kit (Bruker Daltonics, Германия) [3].

В зарубежных источниках сообщается о возможности индикации бруцелл в биологических жидкостях организма, в частности в цереброспинальной жидкости, методом MALDI-TOF MS с помощью программного пакета Biotyper v 3.1 (Bruker Daltonics, Германия) [4]. При этом при индикации бруцелл до уровня рода были получены низкие значения Score, что, вероятно, связано с присутствием в образцах минорных белков, существенно влияющих на качество масс-спектров. Таким образом, выявление возбудителя в клинических образцах, включающих значительное количество различных контаминантов и их экстрактов, методом MALDI-TOF MS с использованием программы Biotyper неэффективно.

Один из программных продуктов для анализа данных в клинической протеомике – ClinProTools (CPT) (Bruker Daltonics, Германия). В литературе описаны результаты применения CPT для эффективной индикации бруцелл в крови [5]. Для успешного применения указанного программного продукта необходимо проведение пробоподготовки с использованием специфичных расходных материалов, в

частности планшетов AnchorChip (Bruker Daltonics, Германия), повышающих чувствительность метода в 10–100 раз. Следует отметить, что внедрение указанных подходов к индикации возбудителя бруцеллеза в клиническом материале в значительной мере затруднено относительно высокой стоимостью соответствующего программного обеспечения и необходимых расходных материалов. Следовательно, разработка и внедрение новых эффективных схем выявления бруцелл в клиническом материале – одно из важных направлений исследований.

Ранее нами была предложена схема идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF MS на основании выявления в диапазоне масс 2000 – 20000 Da группы родоспецифичных фрагментов (m/z (± 5 Da)): 2422, 2581, 3025, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 5360, 6672, 7048, 9085, 16068 [19]. Возможность применения этого подхода для выявления возбудителя бруцеллеза в клинических образцах, в том числе гемокультурах, не изучена.

Цель работы – оптимизировать схему выявления бруцелл в крови на основе выделения специфичных биомаркеров возбудителя методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

В работе использовали 11 культур *B. melitensis* и *B. abortus* из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Культуры были выращены на агаре Альбими (производитель – ФКУЗ Ставропольский противочумный институт, показатели качества: pH 7,2 – 7,4, прочность 300 – 380 г по Валенту, содержание аминного азота 100 – 120 мг%).

В качестве объекта исследования использовали стабилизированную гепарином венозную кровь 30 условно здоровых человек (15 мужчин и 15 женщин в возрасте от 20 до 60 лет). В ходе работы было проведено исследование 60 образцов интактной крови и 120 модельных образцов, искусственно контаминированных культурами *B. melitensis* (60) и *B. abortus* (60). Для каждого образца было получено не менее 30 суммарных масс-спектров, наиболее репрезентативные из которых были отобраны для проведения сравнительного анализа полученных данных.

Все этапы работы с культурами возбудителя бруцеллеза проводили в боксе биологической безопасности класса III или II-B. Одну бактериологическую петлю эмульгировали в воде I типа, затем по 1 мл приготовленной суспензии переносили в вакутейнеры с цельной кровью объемом 3 мл и инкубировали при 37 °C в течение 48 ч. Полученные образцы объемом 4 мл центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 сек. В процессе пробоподготовки получали две фракции: надосадочную жидкость и лейкоцитарную массу, используемые в дальнейшем исследовании.

Обеззараживание образцов, содержащих возбудитель бруцеллеза, проводили с использованием этилового спирта по ранее описанной методике [6]. Инактивированные образцы ресуспендировали в 100 мкл кислоты муравьиной 70% и 100 мкл ацетонитрила с последующим осаждением центрифугированием в течение 4 мин при 14 000 об/мин при температуре 10°C. Супернатант использовали в качестве исследуемого образца для проведения масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектры получали в линейном режиме на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Внутреннюю калибровку проводили с использованием бактериального тест-стандарта MBT (Bruker Daltonics, Германия).

Основное количество пиков на масс-спектрах белковых экстрактов интактной крови было локализовано в интервале значений масс 2300 – 16100 Da рабочего диапазона и составило 80 ± 10 . Установлено наличие гомологичных, отличающихся по интенсивности (1200 ± 200 a.i), сигналов с m/z (± 5 Da): 3352, 3372, 3440, 3464, 3486, 3508, 3613, 3707, 4062, 4230, 5046, 5155, 5222, 5290, 5935, 6345, 6576, 7090, 7570, 7935, 9414, 10088, 10442, 10830, 11100, 12688, 15131, 15866. Полученные белковые профили содержали мажорные фрагменты (m/z (± 5 Da)): 3372, 3442, 3486, 5674, 6349, 7005, 7934. На основе совокупности сигналов полученных масс-спектров был сформирован пик-лист супер-спектра крови человека.

Масс-спектрометрический анализ экстрактов интактной крови показал, что соответствующие масс-спектры содержат фрагменты с m/z (± 5 Da): 2576, 3262, 5360, 16063, которые ранее были отнесены к группе потенциально специфичных для микроорганизмов рода *Brucella*. В связи этим указанные сигналы были исключены из схемы выявления возбудителя бруцеллеза в контаминированных образцах.

В ходе анализа полученных масс-спектров искусственно контаминированных образцов крови в 100% случаев были выявлены 13 родоспецифичных маркеров возбудителя бруцеллеза (m/z (± 5 Da)): 2422, 3268, 3336, 3523, 3696, 3754, 4545, 4770, 5036, 5170, 6672, 7048, 9085.

Интенсивность сигналов на масс-спектрах экстрактов крови, содержащей возбудитель бруцеллеза, с (m/z (± 5 Da)): 3370, 3442, 3485, 5043, в 3 – 5 раз превосходила интенсивность соответствующих сигналов на спектрах интактной крови, что, вероятно, связано с интерференцией сигналов идентичных по массе компонентов протеома крови и возбудителя бруцеллеза. В то же время для гомологичных сигналов (m/z (± 5 Da)): 4468, 5158, 5223, 5290, 5417, 6346, 6895, 7766, 7933, 8125, 8932, 10836, существенных изменений интенсивности, разрешения и других параметров не наблюдалось.

Таким образом, в рамках проведенного исследования апробирована схема выявления бруцелл в гемокультурах на основе определения на MALDI-TOF масс-спектрах присутствия 13 родоспецифичных фрагментов возбудителя. Составлен супер-спектр и охарактеризованы основные параметры масс-спектров интактной крови человека. Перспективной представляется дальнейшая оценка эффективности применения предложенной схемы анализа для выявления *Brucella spp.* в клинических образцах.

Библиографический список

1. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 2. – С. 22 – 24.
2. Prodhom G., Bizzini A., Durussel C. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48, N. 4. – P.1 481–1483.
3. Sánchez-Juanes F., Ferreira L., Vega Castano S. MALDI-TOF mass spectrometry does not differentiate between *Brucella* species, suggesting that they may represent a single species // Microbial Proteomics. – MALDI Biotyper Poster Hall 2014. – S2. – P. 25.
4. Nyvang H.G., Kvistholm J.A., Böcher S. et al. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour // Scand J Infect Dis. – 2010. – Vol. 42, N 9. – P. 716 – 718.
5. Rams T.E., Sautter J.D., Getreu A., van Winkelhoff A.J. Phenotypic identification of *Porphyromonas gingivalis* validated with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // Microbial pathogenesis. – 2016. – Vol. 94. – P. 112 – 116.
6. Ульшина Д.В., Ковалев Д.А., Бобрышева О.В. и др. Разработка алгоритма идентификации культур возбудителя бруцеллеза методом MALDI-TOF масс-спектрометрии // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 4. – С. 96 – 99.

РАЗДЕЛ 6.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ ИННОВАЦИОННЫХ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ И СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

ПРОБЛЕМА АНТИФАГОВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ ЭНТЕРАЛЬНОЙ ФАГОТЕРАПИИ

**В.А. Алешкин¹, Л.И. Новикова¹, С.С. Бочкарева¹, А.В. Алешкин¹, О.Н. Ершова²,
И.А. Киселева¹, Э.Р. Зулькарнеев¹**

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва; ²ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» МЗ РФ, Москва, Россия

Бактериальные инфекции, вызванные антибиотикорезистентными штаммами бактерий, в современных условиях приобретают все более тяжелое течение, затяжной характер и не поддаются самым интенсивным методам лечения. Единственной альтернативой в ряде случаев может служить терапия бактериофагами.

Для оценки эффективности фаготерапии необходимо учитывать не только микробиологические показатели, демонстрирующие лизис бактерий в биологических жидкостях, но и показатели гуморального иммунитета. В литературе только начинают появляться публикации, касающиеся выработки антител в процессе приема бактериофага, в связи с этим данные исследования весьма актуальны. К настоящему времени самым удобным методом определения наличия антител является иммуноферментный анализ. Поскольку коммерческие тест-системы для определения антифагового ответа отсутствуют, была сконструирована иммуноферментная тест-система, позволяющая установить наличие соответствующих IgG-антител в сыворотке крови или любой биологической жидкости пациента (на примере оригинального бактериофага, лизирующего *Pseudomonas aeruginosa*). Для работы были использованы как коммерческие реагенты, так и реагенты, приготовленные в лабораторных условиях. Так, в частности, с помощью цикла внутримышечных иммунизаций кролика была получена моноспецифическая антисыворотка к бактериофагу, лизирующему *P. aeruginosa*. Специфичность антисыворотки была доказана методом иммунопреципитации по Оухтерлони и в реакции нейтрализации фаголизата.

Антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, а связавшиеся с антигеном IgG-антитела выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma). Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG разных видов животных.

Сконструированная тест-система была апробирована при анализе IgG-антител к бактериофагу, лизирующему *P. aeruginosa*, в сыворотках, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов, кроликов в процессе ректального приема свечи с бактериофагом, а также в сыворотках крови людей, принимавших и не принимавших бактериофаг *per os*. У иммунизированных кроликов был зарегистрирован высокий титр IgG-антител, в то время как у неиммунизированных он был на уровне

отрицательного контроля. У кроликов после ректального приема бактериофагов также обнаруживали антитела класса G. В дальнейшем были проведены исследования по анализу гуморального иммунного ответа на бактериофаги у больных, находящихся в условиях стационара. Было зафиксировано наличие, а также рост титра антител у больных, повторно принимающих бактериофаг после длительного перерыва. У пациентов, не принимавших бактериофаг, регистрировалось отсутствие антител к данному бактериофагу. Полученные данные подтвердили необходимость определения соответствующих IgG-антител для корректировки состава препаратов при проведении повторного курса энтеральной фаготерапии.

ЗИМОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТИРУЕМЫХ РНКаз ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

И.С. Андреева¹, А.И. Закабунин², Мокрушина О.С.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²Институт химической биологии и функциональной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Несмотря на успехи, достигнутые в борьбе с гриппом, лечение этого заболевания остается сложной проблемой. В связи с этим особое внимание на себя обращают секретируемые РНКазы микроорганизмов, способные подавлять репродукцию РНК-содержащих вирусов в инфицированных клетках. Внеклеточные рибонуклеазы обнаружены у многих видов бацилл, в том числе у *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. circulatis* (барназоподобные РНКазы), *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* (биназоподобные РНКазы). Установлено, что рибонуклеазы бацилл обладают выраженной противовирусной активностью в отношении таких РНК-содержащих вирусов, как вирусы полиомиелита, клещевого энцефалита, вирус бешенства [1–3]. Целенаправленный поиск терапевтически перспективных ферментов среди РНКаз млекопитающих не всегда тактически оправдан в связи с имеющейся системой защиты клеток млекопитающих от активности собственных РНКаз. Филогенетически далекие от своих аналогов у млекопитающих РНКазы амфибий, грибов и бактерий, нечувствительные к действию ингибиторов РНКаз высших организмов, представляются перспективными соединениями для разработки препаратов против РНК-содержащих вирусов.

В ранее проведенных исследованиях авторами была показана возможность подавления метаболитами штаммов *B. thuringiensis* (*Bt*) размножения вируса гриппа человека A/Aichi/2/68(H3N2) и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) на культуре ткани MDCK [4]. В результате фракционирования методом гель-хроматографии компонентов культуральной жидкости (КЖ) штаммов *Bt* обнаружены фракции, способные ингибировать размножение вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(A/H5N1), содержащие внеклеточные РНКазы в качестве возможных агентов с противовирусной активностью.

В настоящей работе проведен зимографический анализ секретируемых РНКаз трех штаммов *Bt*, культивированных на средах, отличающихся составом. Во всех вариантах культивирования в культуральной жидкости (КЖ) обнаружены сходные наборы из шести–семи ферментов, способных использовать в качестве субстрата высокополимерную РНК дрожжей. Определены условия культивирования штаммов *Bt*, позволяющие значительно повысить содержание РНКаз в КЖ.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *Bt* Gi-416, Gi-416 и Gi-466 с неустановленным серотипом из состава «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора». Нарработку биомасс штаммов *Bt* проводили с использованием среды LB (Difco, США) и сред ПДГТ и ПДГС, отличающихся составом и концентрацией добавляемых солей и углеводов. Состав сред: ПДГТ (г/л): пептон – 9,27, дрожжевой экстракт – 5,0, глюкоза 0,2, глицерин – 5,0; ПДГС (%): пептон – 2,1, глюкоза – 1,0, Na₂HPO₄ – 0,04, CaCl₂ – 0,01, MgSO₄ × 7H₂O – 0,03, MnSO₄ –

0,01, NaCl – 0,3. Культивирование проводили в колбах на термостатированной качалке (КТ 104, Россия) при скорости 180-190 об/мин, температуре 28-30 °С, в течение 18-24 ч. Использовали также режим пролонгированного культивирования до 55 ч, с сохранением остальных условий роста бактерий. Для приготовления препаратов полученные КЖ штаммов центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21 (Beckman, США). Надосадочную жидкость стерилизовали последовательной ультрафильтрацией через Whatman фильтры, с размерами пор 0,45 и 0,2 мкм, и хранили до использования при температуре минус 20 °С.

Электрофорез белков КЖ в полностью денатурирующих условиях проводили по методу Laemmli. В качестве маркеров молекулярной массы использовали наборы белков Precision Plus Protein Standards unstained фирмы Bio-Rad (США). Зимографию проводили в 12 или 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем в качестве субстрата высокополимерную РНК дрожжей (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 0,1-0,2 мг/мл). Для оценки молекулярной массы ферментов использовали наборы предварительно окрашенных белков-маркеров (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas). После завершения зимографии гели обрабатывали раствором красителя кумасси ярко-голубого G-250.

Аффинное фракционирование проводили на голубой сефарозе. Связавшийся фермент элюировали 1,5 М KCl. Определение РНКаз во фракциях элюата проводили зимографией с последующим окрашиванием белков в геле кумасси ярко-голубым G-250. Ионообменную хроматографию на керамическом гидроксилapatите СНТ-I проводили на колонке объемом 4 мл. Адсорбированный белок элюировали в изократическом режиме растворами фосфата калия, pH 6,8, с концентрацией 0,25, 0,50 и 1,0 М. РНКазы во фракциях элюата обнаруживали зимографией. Определение активности РНКаз в КЖ проводили путем определения количества кислото-растворимых продуктов, образующихся при гидролизе высокополимерной РНК дрожжей (1 мг/мл). За единицу активности фермента принимали его количество, катализирующее образование 1 A₂₆₀ кислоторастворимых продуктов в течение 1 ч в выбранных условиях (37 °С, 50 mM HEPES, pH 8,0, в присутствии 2 mM MgSO₄ и CaCl₂). Для фракционирования компоненты КЖ белковой природы концентрировали добавлением сухого сульфата аммония до 90% насыщения (662 мг/мл исходной среды) при температуре 4 °С в течение суток. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в минимальном объеме 0,15 М NaCl в 0,05 М трис HCl, pH 7,4. Фракционирование компонентов КЖ проводили гель-хроматографией на Fractogel HW 50F в 0,15 М NaCl в 0,05 М трис HCl, pH 7,4.

Результаты и обсуждение. Определения РНКазной активности в образцах КЖ трех штаммов *Bt*, культивированных на средах, отличающихся составом, показали, что накопление РНКаз в среде ПДГС, обогащенной микроэлементами, и среде ПДГГ с глицерином происходило эффективнее и в течение более длительного времени, чем на среде LB. Максимальное содержание ферментов, порядка 370 – 400 е.а./мл, на среде ПДГС в условиях опыта определялось через 50 ч культивирования. В противоположность этому, на среде LB максимум внеклеточных РНКаз обнаруживался через 18–24 ч (рис.). Кроме того, максимальные концентрации ферментов различались почти на порядок – 370-400 е.а./мл на ПДГС и 43-49 е.а./мл на LB. При 18-часовом культивировании концентрации (активности) РНКаз были сопоставимы.

Полученные данные показали, что наборы РНКаз, секретируемых в среду у всех трех штаммов в условиях опыта, практически совпадали, с удлинением периода культивирования их содержание увеличивалось. Среди секретируемых ферментов обнаруживалась высокомолекулярная РНКаз с молекулярной массой более 50 кДа, а также пул из нескольких ферментов с массой от 22 до 30 кДа. Зимографический анализ компонентов КЖ выявил порядка шести-семи внеклеточных ферментов через 18 ч культивирования – период, за который какого-либо лизиса клеток *Bt* не происходило. И этот набор ферментов сохранялся при увеличении культивирования бактерий до 55 ч. Отметим, что в условиях опыта не обнаружены РНКзы, которые можно было бы отнести к ранее известной биназо-подобной *Bt* РНКазе с молекулярной массой 12 кДа.

Высокомолекулярная РНКаз, возможно, секретировалась наиболее эффективно, так как гидролиз в зоне ее расположения в геле проявлялся уже при коротких временах инкубации геля в буфере. Этот фермент был высоко активен в пробах, отобранных через 18 ч культивирования, в то время как другие РНКазы при зимографии в тот же период времени проявляли активность заметно ниже, чем при более длительном культивировании. Сравнение методов концентрирования внеклеточных

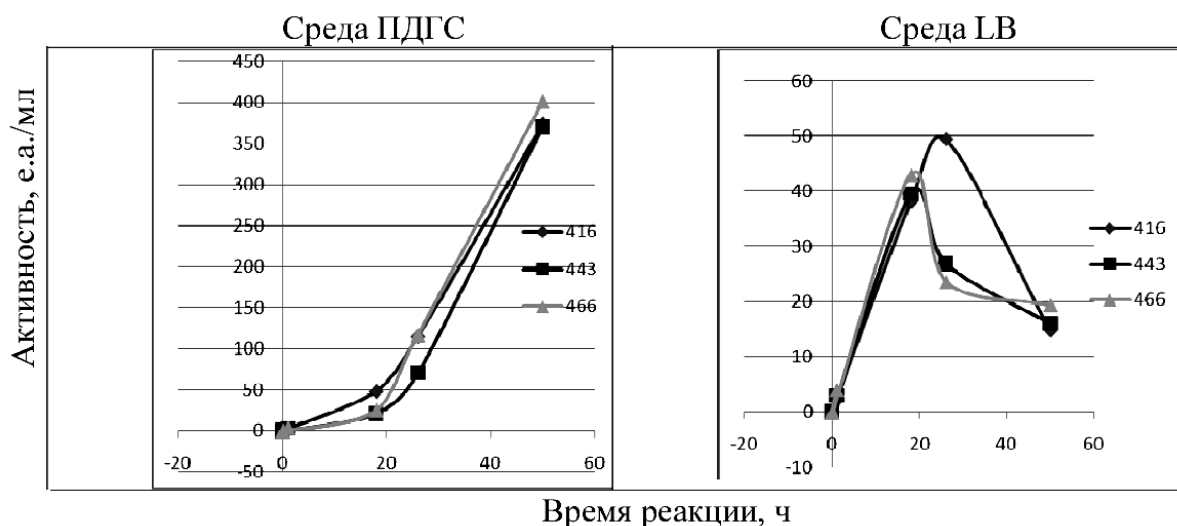


Рис. Определение активности РНКаз в образцах КЖ, отобранных через 18, 26 и 50 ч культивирования на средах ПДГС и LB. Обозначения на кривых: ромб – штамм Gi-416, квадрат – штамм Gi-443 и треугольник – штамм Gi-466.

РНКаз центрифугированием на мембранах с пределом исключения 10 кДа и осаждением при добавлении сухого сульфата аммония показало предпочтительность использования мембран из-за меньшей инактивации ферментов. В то же время сделан вывод о возможности применения в отдельных случаях сульфат-аммонийного осаждения внеклеточных РНКаз *Bt*. Использование голубой сефарозы для группоспецифичного выделения (или обогащения) РНКаз показано, что высокомолекулярная РНКазы и РНКазы с молекулярной массой 25 кДа могут быть частично очищены на этом сорбенте. Высокополимерная внеклеточная РНКазы может быть также частично очищена ионообменной хроматографией на гидроксилапатите.

Библиографический список

1. Ильинская О.Н., Шах Махмуд Р. Рибонуклеазы как противовирусные агенты. // Молекуляр. Биология. – 2014. – Т.48, №5. – С. 707-717.
2. Гончарова Е.П., Ковпак М.П., Рябчикова Е.И. и др. Расщепление вирусного генома с помощью искусственных рибонуклеаз - новый способ инактивации РНК-содержащих вирусов. // Докл. АН. – 2009. – Т. 427, № 6. – С.840-843.
- 3.6. Fedorova A.A., Azzami K., Ryabchikova E.I. et al. Inactivation of a non-enveloped RNA virus by artificial ribonucleases: Honey bees and Acute bee paralysis virus as a new experimental model for in vivo antiviral activity assessment // Antiviral Research. – 2011. – Vol. 91, N 3. – P. 267–277.
4. Андреева И.С., Мазуркова Н.А., Мокрушина О.С. и др. Штаммы *Bacillus thuringiensis*, секретирующие метаболиты, подавляющие размножение вируса гриппа человека A/Aichi/2/68(H3N2) и вируса гриппа птиц A/chicken/5.Kurgan/05/2005(H5N1) // Research Journal of International Studies XVIII (Россия, Екатеринбург, 2013г.). – 2013. – № 7(14). – С. 70–71.

ДИЗАЙН ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ – КАНДИДАТОВ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-1

С.И. Бажаң, Д.В. Антонец, Л.И. Карпенко, В.И. Офицеров, А.А. Ильичев

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Учитывая существующие в настоящее время проблемы в создании вакцин против ВИЧ-1, эта задача требует применения новых нетрадиционных подходов, нацеленных на создание нового поколения эффективных и безопасных вакцин. В общем случае принято считать, что идеальная вакцина должна индуцировать оба звена иммунного ответа – гуморальный ответ, направленный на индукцию антител, которые могут нейтрализовать вирус или обеспечивать антитело-зависимый лизис раковых клеток; и клеточный ответ, нацеленный на индукцию CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и CD4⁺ Т-лимфоцитов-хелперов (Тх). ЦТЛ узнают и лизируют инфицированные клетки, а Тх усиливают ответы антител и ЦТЛ. В области создания Т-клеточных вакцин одним из новых и перспективных подходов является конструирование искусственных полиэпитопных иммуногенов, включающих широкий спектр проективных Т-клеточных эпитопов из различных белков вируса.

Целью данной работы явилась разработка рациональных подходов к проектированию полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, которые могут приблизить нас к созданию эффективных Т-клеточных вакцин против ВИЧ-1. Для достижения этой цели необходимо обеспечить процессинг полиэпитопной конструкции и презентацию освободившихся эпитопов CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитам с использованием современных знаний о механизмах презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и II классов. Это связано с тем, что Т-клеточные антигены представляются CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам не как полноразмерные белки, а как короткие пептиды, ассоциированные с молекулами МНС I и II классов.

Чтобы обеспечить процессинг целевых полиэпитопных иммуногенов, для их проектирования мы использовали различные стратегии:

1) для конструирования поли-ЦТЛ-эпитопной конструкции использовали спейсерные последовательности, разделяющие эпитопы, которые содержат сайты протеасомного расщепления и/или мотивы для связывания с ТАР, чтобы обеспечить процессинг полиэпитопа и транспорт освободившихся пептидов (эпитопов) в эндоплазматический ретикулум;

2) для нацеливания полиэпитопного иммуногена в протеасому и презентации ЦТЛ-эпитопов CD8⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС I класса использовали генетическое присоединение к его N- или С-концу последовательности убиквитина;

3) для презентации Т-хелперных эпитопов CD4⁺ Т-лимфоцитам по пути МНС II класса использовали генетическое присоединение к его С-концу последовательности тирозинового мотива белка LAMP-1, чтобы направить полиэпитопный иммуноген из секреторного пути в лизосому.

Дизайн и конструирование целевых полиэпитопных конструкций проведены с использованием оригинального программного обеспечения TEpredict/PolyCTLD designer, которое мы позиционируем как универсальную платформу для проектирования полиэпитопных иммуногенов, индуцирующих Т-клеточный иммунитет как против инфекционных, так и против онкологических заболеваний. Определение количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IL-2 и IFN- γ , проводилось с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов.

Чтобы оценить влияние убиквитина и спейсерных последовательностей, фланкирующих эпитопы, на иммуногенность полиэпитопной конструкции, мы спроектировали набор полиэпитопных иммуногенов, которые отличались по ряду структурных характеристик, именно по наличию или отсутствию спейсеров; по структуре спейсерных последовательностей; по наличию N- или С-концевой последовательности убиквитина.

Мы показали, что наиболее перспективной вакцинной конструкцией является конструкция, которая содержит N-концевой убиквитин для нацеливания полиэпитопа на протеасому, в составе которой эпитопы разделены спейсерными последовательностями, содержащими сайты протеасомного расще-

пления полиэпитопа и мотивы для ТАР-зависимого транспорта освободившихся пептидов в эндоплазматический ретикулум.

На следующем этапе наших исследований мы оценивали влияние протеасом-зависимой и лизосом-зависимой деградации полиэпитопов на иммуногенность целевой полиэпитопной конструкции. Мы показали, что убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопа на протеасому является более эффективной стратегией для стимуляции ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа, по сравнению с LAMP-зависимым нацеливанием на лизосому.

Полученные результаты поддерживают концепцию рационального дизайна вакцин, основанную на имеющихся знаниях о механизмах презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и II класса.

НОВЫЕ РАСЫ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Н.Е. Гаевская

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Холера продолжает оставаться проблемой мирового здравоохранения в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде интенсивных и масштабных эпидемий и вспышек на различных континентах мира. Это определяет необходимость постоянного мониторинга холеры как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора на глобальном и территориальных уровнях [1].

Для идентификации холерных вибрионов прочно вошёл в практику метод определения фагочувствительности изучаемых культур с помощью холерных диагностических фагов. Но в настоящее время появилось большое число резистентных штаммов к диагностическим препаратам (до 77,4%). Способность возбудителя холеры, в наблюдаемый период, формировать отличающиеся по признаку устойчивости формы позволяет понять всю сложность задачи их фагодиагностики.

В то же время иметь в данный период эффективный фаг для идентификации циркулирующих штаммов холерных вибрионов весьма важно в оценке изменчивости холерного вибриона и определения их роли, учитывая то обстоятельство, что общей закономерностью является неразрывная связь эволюции паразита и его хозяина [2]. Установлено, что угнетение физиологических функций или нарушение клеточного метаболизма и условий внутриклеточного развития фага являются одной из причин возникновения их фагорезистентности [3, 4].

Многолетние наблюдения различных исследователей позволили выяснить причины фагорезистентности бактерий и констатировать факт того, что утрата чувствительности холерного вибриона к гомологичному бактериофагу обеспечивает бактериальной клетке экологическую устойчивость на пути эволюции [3]. Нарушение нормального функционирования систем рестрикции-модификации различной специфичности взаимодействия фага и бактериальной клетки также может быть одной из причин возникновения фагорезистентных вариантов среди обнаруживаемых из объектов внешней среды штаммов *Vibrio cholerae El Tor* [3, 5, 6]. Также одной из причин снижения или потери чувствительности к холерным фагам может являться носительство гомоиммунных умеренных фагов, которые обуславливают феномен несовместимости, заключающийся, как правило, в том, что бактерии приобретают иммунитет к родственному типовому бактериофагу [5, 7].

Фагочувствительность холерных вибрионов остаётся ценным специфическим тестом их идентификации, поэтому разработка и усовершенствование существующих препаратов фагодиагностики является актуальной задачей. В зарубежной литературе отсутствуют сведения о получении фагов, пригодных для диагностики устойчивых форм холерных вибрионов.

Поиск новых рас холерных фагов актуален и в первую очередь связан с необходимостью подтверждения специфических свойств возбудителя холеры эффективным, простым и надёжным способом.

Поэтому в центре внимания специалистов Роспотребнадзора оказалась проблема совершенствования диагностического препарата холерного фага, эффективно лизирующего холерные штаммы при проведении идентификации патогенного микроба.

В этой связи мы поставили **целью** провести изыскание новой расы холерных фагов, активных в отношении фагоустойчивых к выпускаемому препарату диагностического фага штаммов холерных вибрионов, и наметить перспективы их практического использования. Вновь полученные расы фагов будут отличаться от исходных образцов целым рядом биологических признаков, ведущим из которых будет преодоление резистентности клетки-хозяина.

В работе использовано 267 штаммов *V. cholerae* биовара *El Tor* (52 штамма ctx^+tcp^+ , 9 штаммов ctx^-tcp^+ , 206 штаммов ctx^-tcp^-), из них фагорезистентных к фагу «Эльтор» – 253 штамма, выделенных в 2001-2015 гг. из различных источников, а также 24 штамма *V. cholerae Classical*. В исследование были взяты как типичные культуры *V. cholerae El Tor*, так и измененные варианты (RO, RS).

Для изучения и сохранения биологического разнообразия бактериофагов, а также для выполнения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные вибрионы» в Ростовском-на-Дону противочумном институте собрана коллекция холерных фагов разного происхождения. Из данной коллекции изучены 25 холерных фагов по чувствительности к отобранным штаммам. Критерием отбора фагов является лизис фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в различные годы от людей и из внешней среды (2001-2014 гг.). Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами [8].

Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (pH 7,6 – 7,8).

При отборе холерного фага для диагностики возбудителя холеры мы учитывали следующие показатели: максимально высокую репродуктивную активность в отношении вибрионов Эль Тор; специфичность литического действия; степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

В результате проведенной работы были отобраны четыре холерных бактериофага, лизирующие холерные вибрионы, устойчивые к коммерческим диагностическим фагам. Анализ результатов литической активности показал, что все штаммы, взятые для лабораторных испытаний, лизируются в той или иной степени и в разных вариантах экспериментальными холерными бактериофагами (O1, C1, El 1, El 2).

По данным электронно-микроскопического исследования новые холерные бактериофаги относились по морфологии корпускул: фаги O1, El 1 и фаг C1 к III морфогруппе [9] и типу C [10] семейства *Podoviridae*; фаг El 2 к V морфогруппе [9] и типу A [10] семейства *Myoviridae*.

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытываемые фаги.

При изучении действия инактивирующих агентов – хлороформа и повышенной температуры было установлено, что к действию хлороформа фаги *V. cholerae* устойчивы и инактивировались при температуре 65–70 °C в течение 30 мин.

Попытки использовать данные холерные фаги в различных вариантах смесей не были успешными, так как происходило снижение диапазона литической активности и титров фагочастиц до 10^{-5} - 10^{-7} БОЕ/мл, в то время как у монофагов титры сохранялись на уровне 10^{-8} - 10^{-10} БОЕ/мл.

Одним из важных моментов в технологии изготовления диагностических препаратов являются используемые при этом тест-штаммы. До настоящего времени для производства диагностических фагов использовался токсигенный индикаторный штамм *V. cholerae El Tor* 75. Для размножения и контроля новых рас диагностических бактериофагов необходимо было найти новые авирулентные тест-штаммы. Одним из наиболее перспективных тест-штаммов для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов мы использовали нетоксигенную культуру *V. cholerae El Tor* 19546, которая была депонирована в ГКПБ «Микроб» под № КМ-276. Также подобраны ещё два атоксигенных индикаторных штамма для размножения экспериментальных диагностических бактериофагов, которые в настоящее время готовятся к депонированию.

При сравнительном изучении литической активности экспериментальных диагностических холерных бактериофагов (O1, C1, El 1, El 2) и коммерческих диагностических бактериофагов производства

РосНИПЧИ «Микроб» («Классический», «Эльтор») было выявлено, что экспериментальные диагностические бактериофаги более эффективны, так как ими лизировались все штаммы (100%), поступившие в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в 2015 г., а коммерческими диагностическими холерными бактериофагами – только 10,3% штаммов *V. cholerae* O1.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что экспериментальные диагностические холерные фаги могут быть применены для идентификации штаммов холерных вибрионов серогруппы O1. Актуальность использования метода фаговой диагностики заключается в том, что он исключает применение дорогостоящей аппаратуры и большие материальные затраты. Техническая простота и доступность отличают его и позволяют в кратчайший срок (12-18 ч) получить ответ.

Библиографический список

1. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В. и др. Современные подходы к мониторингу холеры // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 26 – С. 10–16.
2. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Гаевская Н.Е. и др. Характеристика холерных фагов, выделенных из поверхностных водоёмов и стоков г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. С. 168–172.
3. Ломов Ю.М., Сомова А.Г., Кудрякова Т.А. Холерные фаги. – Ростов-на-Дону; 1990. – 159 с.
4. Овчинникова М.М., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И., Грачёва И.В. Изучение некоторых причин фагоре-зистентности эпидемически неопасных штаммов *V. cholerae* eltor к бактериофагу диагностическому холерному stx // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2010. – Вып. 23. – С. 62–66.
5. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms // Nat Rev Microbiol. – 2010. – Vol. 8, N 5. – P. 317–327.
6. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction // Curr Opin Microbiol. – 2005. – Vol. 8, N 4. – P. 466–472.
7. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение / Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – М.: Науч. мир, 2012. – 636 с.
8. Адамс М. Бактериофаги: Пер. с англ. – М., 1961. – 522 с.
9. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – 170 с.
10. Ackerman H.B. // Microbiol. Sci. . – 1987. – Vol.4, N17. – P.210–221.

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕРФЕРОНИДУЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ДЕЛЬТАФЕРОН В СОСТАВЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

**С.Г. Гамалей¹, А.В. Батенева¹, О.С. Иванова¹, Г.М. Левагина¹, Л.Д. Медикова²,
М.П. Богрянцева², Е.Д. Даниленко¹**

¹Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск Новосибирской обл.; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Ежегодно во многих странах мира регистрируют сезонные вспышки эпидемии гриппа и острых респираторных инфекций (ОРВИ). Каких-либо кардинальных клинических признаков, отличающих пандемический грипп от сезонного, на ранних стадиях развития заболевания не выявлено. Практическим врачам зачастую невозможно с уверенностью диагностировать ту или иную респираторную инфекцию у конкретного больного, тем более что в ряде случаев имеет место смешанная инфекция. Поэтому на вооружении у клиницистов должны быть препараты, одинаково эффективные для лечения как гриппа, так и других ОРВИ. Арсенал существующих противовирусных препаратов довольно значителен. Однако проблема эффективного лечения вирусных инфекций далека от своего решения, поскольку вирусы гриппа имеют тенденцию мутировать и «ускользать» из-под медикаментозного контроля. Место проникновения респираторных вирусов и основное место их репродукции – слизистая носовой

полости и верхних дыхательных путей, поэтому необходимость первоочередной защиты именно этих клеток очевидна [1].

Известно, что интерферон гамма (ИФН-гамма) является важным фактором стимуляции клеточного иммунного ответа и обеспечивает индукцию важнейших механизмов противовирусной защиты [2]. Другими эффективными противовирусными и иммуномодулирующими агентами являются индукторы интерферона, повышающие уровень эндогенных интерферонов разных типов.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработаны технологии получения рекомбинантного аналога ИФН-гамма человека с повышенной устойчивостью к протеазам, препарата Дельтаферон [3], и двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) из клеток *Saccharomyces cerevisiae* [4]. Предложен дизайн молекулярной конструкции, так называемой «вирусоподобной частицы», содержащей в качестве активных компонентов Дельтаферон и дсРНК (ВПЧ–Дельтаферон) [5], получена ее лекарственная форма для интраназального применения.

Цель исследования: изучение влияния препарата Дельтаферона в составе молекулярной конструкции на уровень интерферона крови, тканей верхних дыхательных путей и легких мышей при интраназальном введении.

Материалы и методы. В экспериментах использовали препарат ВПЧ–Дельтаферона для интраназального введения (лиофилизат). Содержимое одного флакона включало 0,47 мг белка, 0,069 мг дсРНК, специфическая активность препарата составляла $4,0 \cdot 10^6$ МЕ/мг белка.

Исследования проведены на 50 половозрелых белых беспородных мышах ICR, самках, массой 22–26 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. До эксперимента и в ходе исследования животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении на сбалансированном пищевом рационе. Животные были разделены на 3 экспериментальные группы, по 15 особей в каждой. Мышам опытных групп вводили препарат ВПЧ–Дельтаферон для интраназального введения однократно, двукратно или трехкратно в дозах $5 \cdot 10^4$ МЕ/кг (10^3 МЕ на мышь) и $5 \cdot 10^6$ МЕ/кг (10^5 МЕ на мышь) в объеме 10 мкл на 20 г массы тела. Животным контрольной группы интраназально вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Интактную (без введения препаратов) группу составляли 5 животных.

Образцы крови, ткани носоглотки и легких мышей забирали через 3 ч после первого, второго и третьего введения препаратов. Титры интерферона в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов тканей определяли в биологическом тесте на культуре клеток мышинных фибробластов L–929 [6]. В качестве тест–вируса использовали вирус энцефаломиокардита (ЕМС), штамм «Колумбия» в дозе 100 ЦПД₅₀, полученный из Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации. Об активности экспериментальных образцов судили по подавлению цитопатического действия тест–вируса в культуре клеток, которое оценивали микрометодом в 96–луночных полистироловых планшетах с плоским дном.

За титр интерферона принимали величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, обеспечивающему 50%-ную защиту клеточных культур от цитопатического действия 100 ЦПД₅₀ тест–вируса.

Результаты исследования

Результаты исследования свидетельствуют о том, что препарат ВПЧ–Дельтаферон при одно-, двух- или трехкратном интраназальном применении в дозах $5 \cdot 10^4$ и $5 \cdot 10^6$ МЕ/кг проявлял противовирусную активность в отношении вируса ЕМС на клетках L–929, что свидетельствует о наличии в образцах интерферонов. Выраженность эффекта зависела от дозы, кратности введения и вида биологического образца (табл.).

Титры ИФН в сыворотке крови мышей после трехкратного введения препарата в дозе $5 \cdot 10^4$ МЕ/кг в два раза превышали значения показателя после его однократного введения. Уровень показателя после первого, второго и третьего введения повышался по сравнению с контролем в 11, 13 и 22 раза соответственно. Еще более выраженным было увеличение титров ИФН после введения препарата в дозе $5 \cdot 10^6$ МЕ/кг. Однако нарастания содержания сывороточного ИФН при увеличении количества введений в этом случае не отмечено, более того, наблюдали снижение показателя, возможно, связанное с развитием состояния невосприимчивости при введении высокой дозы индуктора.

Титры ИФН в сыворотке крови, супернатантах гомогенатов легких и носоглоток мышей, взятых через 3 ч после 1–, 2– и 3–кратного интраназального введения препарата ВПЧ–Дельтаферон

Препарат, доза	Титры ИФН								
	Сыворотка крови			Легкие			Носоглотка		
	1кр.	2кр.	3кр.	1кр.	2кр.	3кр.	1кр.	2кр.	3кр.
Физиологический раствор	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
ВПЧ–Дельтаферон 5*10 ⁴ МЕ/кг	1:179	1:205	1:358	1:307	1:205	1:461	1:410	1:410	1:333
ВПЧ–Дельтаферон 5*10 ⁶ МЕ/кг	1:717	1:614	1:563	1:973	1:614	1:128	1:717	1:282	1:363
Интактные	1:16								

Динамика изменения содержания ИФН в ткани легких мышей после интраназального введения ВПЧ–Дельтаферона была аналогична наблюдаемой в сыворотке крови. Титры ИФН в гомогенатах легких мышей, которым вводили препарат в дозе 5*10⁴ МЕ/кг 1–, 2– и 3–кратно, превышали контрольный уровень соответственно в 19, 13 и 29 раз. Наиболее значительным увеличением титров ИФН при введении препарата в высокой дозе (5*10⁶ МЕ/кг) было в случае однократного введения (в 61 раз по сравнению с контрольным показателем). При последующих введениях повышение показателя было менее выраженным: титры ИФН после 2-го и 3-го введения были выше контрольных значений в 38 и 8 раз соответственно.

Результаты изучения влияния интраназальной формы препарата ВПЧ–Дельтаферон на содержание ИФН в ткани носоглотки мышей свидетельствуют о многократном повышении противовирусной активности гомогенатов. Одно–, двух– и трехкратное введение препарата в дозе 5*10⁴ МЕ/кг вызывало увеличение титров ИФН более чем в 20 раз. Значения показателя после введения препарата в дозе 5*10⁶ МЕ/кг возрастали еще более значительно (в 45, 18 и 23 раза соответственно). Как видно из представленных данных, и в этом случае наблюдалось ослабление индуцирующего влияния препарата при повторном введении.

Таким образом, препарат ВПЧ–Дельтаферон для интраназального применения обладал способностью повышать уровень эндогенных интерферонов в сыворотке крови, ткани носоглотки и легких мышей. Тот факт, что новая лекарственная форма препарата ВПЧ–Дельтаферон обладает способностью усиливать продукцию интерферона не только в области введения, но и в крови, свидетельствует о наличии у препарата как местного, так и системного действия.

Библиографический список

1. Гапонюк П.Я., Дорошенко Е.М. Роль российского препарата ГРИППФЕРОН в лечении и профилактике гриппа и других ОРВИ // Поликлиника. – 2008. – №5. – С. 22–26.
2. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). – М.: Гэотар–Медиа, 2005. – 356 с.
3. Татьков С.И., Смирнова О.Ю., Цивковский Р.Ю. и др. Мутантный γ -интерферон человека с укороченным С–концом и его свойства // Доклады РАН. – 2000. – Т.372, №6. – С. 833–835.
4. Патент РФ № 2558256. Способ получения двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсРНК) из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / Аликин Ю.С., Подгорный В.Ф., Лебедев Л.Р., Азаев М.Ш.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». – Заявка 2014119351/10 (030572) от 13.05.2014; опублик. 27.07.2015. Бюл. № 21.
5. Коровина О.С., Корнеев Д.В., Левагина Г.М. и др. Исследование физико-химических свойств нового препарата дельтаферона в составе молекулярной конструкции // Биотехнология. – 2012. – № 2. – С. 73–77.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. – М: Гриф и К, 2012. – 944 с.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ НА ЭТАПЕ СИНХРОНИЗАЦИИ

С.Е. Гостищева, Н.В. Абзаева, Д.А. Будыка, Г.Ф. Иванова, А.А. Зуенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Россия

В Российской Федерации для специфической профилактики чумной инфекции зарегистрирована вакцина чумная живая, которая успешно применяется на протяжении более 80 лет. В настоящее время эта вакцина остается наиболее эффективным профилактическим противочумным препаратом в России. Важным преимуществом препарата является его способность после однократной прививки относительно быстро индуцировать специфический иммунитет против основных форм (бубонной и легочной) чумной инфекции продолжительностью до 1 года.

Препарат вакцины чумной живой производится в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора в соответствии с Промышленным регламентом ПР 01897080-09-09, в котором выделены технологические этапы (стадии). При неизменности самих стадий технологического процесса представляются возможными изменения внутри этапов, в конечном итоге влекущие за собой улучшение качества конечного продукта по показателю жизнеспособности.

При производстве чумной вакцины используется такой прием, как синхронизация биомассы после смыва с плотной питательной среды, то есть выдерживание при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ 48 ч, в течение которого происходит накопление клеток, находящихся в стационарной фазе роста, как наиболее устойчивых.

При смыве биомассы с аппарата культивирования микроорганизмов Шестеренко (АКМ-Ш) последовательно используются две емкости со стабилизатором (средой высушивания). После синхронизации биомасса из двух емкостей сводится в одну, разбавляется стабилизатором до регламентированной концентрации 50–100 млрд. м.к./мл (при необходимости) и разливается по ампулам.

Однако полученные при смыве суспензии значительно отличаются по показателям концентрации. Так, в первой емкости смывается 100–130 млрд/мл микробов в суспензии и 25–35 млрд/мл во второй. Соответственно разнится соотношение количества смытых микробных клеток со стабилизатором, а также количество продуктов метаболизма, непременно попадающих в полученный материал. При этом условия синхронизации бактериальной суспензии в емкостях существенно различаются из-за разницы показателей густоты микробной взвеси в них, а также, очевидно, вследствие различий в содержании в них продуктов жизнедеятельности клеток вакцинного штамма.

Для стандартизации процесса синхронизации авторами предложено усовершенствование биотехнологии производства чумной вакцины путем получения и изучения культуры, синхронизированной в идентичных условиях. Для достижения этого сведение (соединение) двух смытых биомасс производили непосредственно после смыва. Полученная единая по концентрации микробная взвесь проходила синхронизацию при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч, после чего разводилась средой высушивания и разливалась по ампулам в объеме 1 и 2 мл.

Изготовленные экспериментальные серии препарата после лиофилизации и герметизации были проверены на соответствие регламентированным нормам. Данные по показателям качества экспериментальных серий (жизнеспособность, термостабильность, потеря в массе при высушивании) сравнивали с данными коммерческих серий, полученных из того же АКМ-Ш.

Анализ полученных результатов показал, что наиболее высокие показатели жизнеспособности регистрировали у экспериментальных серий, разлитых в ампулу по 1 мл $(43,6\pm 1,1\%)$, и $38,4\pm 3,2\%$ у серий, разлитых по 2 мл. Контрольные (коммерческие) серии по данному показателю соответствуют регламентированным нормам (не менее 25%) и составляют $33,8\pm 2,4\%$ для вакцины, разлитой по 1 мл, и $28,3\pm 3,1\%$ для вакцины, разлитой по 2 мл. Ранее проведенные исследования уже показывали очевидное преимущество препарата со сниженным объемом в ампуле по показателю жизнеспособности. Полученные данные еще раз подтверждают преимущество вакцины, разлитой по 1 мл.

Что касается показателя термостабильности (срок, в течение которого в препарате сохраняется 50%

живых микробных клеток по отношению к первоначальному числу), то как экспериментальные, так и контрольные серии не выходили за пределы нормы (не менее 4 сут). Однако экспериментальные образцы, разлитые по 1 мл, показали наиболее высокий результат – 23,4 сут, разлитые по 2 мл – 13,5 сут. Коммерческие серии по 1 мл стабильны в течение 10,3 сут, по 2 мл – 12,1 сут.

Остаточная влажность (потеря в массе при высушивании) у всех проверенных серий находилась в пределах 1,5–2,0%, что полностью соответствует регламентированным нормам.

Исходя из вышеизложенного, ясно, что при объединении происходит стандартизация вакцинной взвеси по концентрации и соотношению микробных клеток с количеством стабилизатора, что позволяет оптимизировать процесс синхронизации, а полученный из такой микробной взвеси полуфабрикат показывает более высокие жизнеспособности после лиофилизации.

Повышение требований к фармацевтической системе качества в развитии надлежащей производственной практики лекарственных препаратов для человека требует, в том числе, совершенствования биотехнологии их производства. В контексте сказанного, а также в связи с усложнившейся эпидемической обстановкой в природных очагах чумы, безусловно актуальным становится совершенствование (стандартизация) биотехнологии производства чумной вакцины как профилактического препарата.

Библиографический список

1. Абзаева Н.В., Зуенко А.А., Фисун А.А. и др. Получение препарата вакцины чумной живой со сниженным числом доз путем оптимизации некоторых технологических этапов // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Матер. VI Всероссийской науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора, 22-24 октября 2014 г., г. Ставрополь. – Ставрополь, 2014. – С. 114–115.
2. Анисимова Т.И. Оценка качества и перспективы стандартизации чумных вакцин // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 1979. – Вып. 2 (66). – С. 25–28.
3. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Гостищева С.Е. и др. Биотехнология стабилизации живых микроорганизмов в биомассе и в препарате чумной вакцины // Инфекция и иммунитет. – 2016. – № 1. – С. 87–92.
4. Будыка Д.А. Научно-методические основы совершенствования живой чумной вакцины: Дис.... докт. мед. наук. – Ставрополь, 2002. – 279 с.
5. Красикова М.А. Влияние отдельных этапов производства на качество чумной живой сухой вакцины // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Алма-Ата, 1968. – 20 с.
6. Промышленный регламент на производство вакцины чумной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций ПР 01897080-09-09. – Ставрополь, 2009. – 252 с.
7. Свиридова Л.С. Влияние соотношения защитной среды и микробной суспензии на жизнеспособность вакцины ЕВ при высушивании и хранении // Матер. науч. конф. по природной очагов. и профилактик. чумы. – Алма-Ата, 1963. – С. 207–208.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ И ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА РИДОСТИНА ПРИ НЕПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ

**Е.Д. Даниленко, Л.Р. Лебедев, Л.Н. Шишкина, С.Г. Гамалей, Е.С. Цыпленкова,
Г.М. Сысоева, А.В. Батенева, М.О. Скарнович**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Грипп и ОРВИ по-прежнему остаются слабо контролируемыми заболеваниями из-за высокой изменчивости антигенной структуры циркулирующих вирусов и гетерогенности возбудителей. В связи с этим одним из подходов в борьбе с респираторными инфекциями, который не теряет своей актуальности, является использование стимуляторов неспецифической резистентности (интерферон и его индукторы).

Особое место среди индукторов интерферона (ИФН) занимают двуспиральные РНК (дсРНК) синтетического и природного происхождения. Лечебно-профилактические свойства дсРНК продемонстрированы на широком спектре вирусных инфекций [1–3]. Разработанный в ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора индуктор интерферона Ридостин (Регистрационный № 95/43/5), содержащий в виде активного начала двуспиральную рибонуклеиновую кислоту из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в настоящее время успешно используется в терапии различных форм герпетической, хламидиозной инфекций, гриппа и ОРВИ. В ходе клинических испытаний было показано, что применение этого препарата на ранней стадии заболевания приводит к сокращению длительности и тяжести гриппозной инфекции. Мазь Ридостина оказывала выраженное профилактическое действие у лиц, относящихся к группе повышенного риска [3].

Лечебно-профилактическая эффективность Ридостина продемонстрирована при его использовании в инъекционной или мазевой форме. Лекарственной формы препарата для интраназального применения в настоящее время не существует. В то же время хорошо известна важная роль слизистых оболочек в создании иммунного барьера, препятствующего проникновению и репродукции инфекционных агентов. Достоинством интраназального способа введения является то, что высокий уровень действующего начала создается в верхних дыхательных путях и легких, то есть, в «воротах» инфекции, что может приводить к усилению эффекта индуктора.

Надо сказать, что недостатком нативных препаратов нуклеиновой природы является быстрое разрушение нуклеазами, в том числе нуклеазами крови, что снижает эффективность их применения. В настоящее время существует ряд методических приемов, позволяющих увеличить длительность циркуляции двуспиральных РНК в организме. К ним можно отнести получение композиций либо конъюгатов дсРНК с полимерами [4], полианионами [2], включение их в корпускулярные средства доставки [5, 6].

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора был разработан дизайн молекулярной конструкции, представляющей собой двухслойную частицу, которая содержит в центральной части двуспиральную дрожжевую РНК, покрытую оболочкой из конъюгата полиглокин-спермидин [7]. Было показано, что эта конструкция обеспечивает повышение ферментативной устойчивости дсРНК.

Целью данной работы являлось исследование иммуномодулирующих и противовирусных свойств препарата дсРНК в составе транспортной формы и свободной дсРНК при интраназальном применении.

Образцы молекулярной конструкции были получены способом, описанным ранее [7]. Сохранность структуры дсРНК в составе конструкции, ее ферментативную стабильность исследовали методами электрофореза в 1%-ном геле агарозы.

Иммуномодулирующие свойства препаратов дсРНК оценивали на белых беспородных мышах по влиянию на динамику продукции цитокинов (ИФН- α , ФНО- α) в тканях верхних и нижних дыхательных путей, активность альвеолярных макрофагов. Концентрацию ИФН- α и ФНО- α в гомогенатах тканей носоглотки и легких мышей, взятых через 5 и 24 ч после введения, определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов «Mouse IFN-alpha Platinum ELISA» и «Mouse TNF-alpha Platinum ELISA» («eBioscience», Австрия). Окислительно-восстановительную активность альвеолярных макрофагов, полученных из бронхо-альвеолярной лаважной жидкости, оценивали в НСТ-тесте [8].

Противовирусные свойства препаратов исследовали на модели гриппозной инфекции у мышей, которую воспроизводили интраназальным введением вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2) в дозе 10 ЛД₅₀. Препарат дсРНК вводили интраназально (15 мг/кг) или внутривентриально (5 мг/кг) трехкратно, за 24 ч, через 1 и 2 сут после заражения. Противовирусную активность препаратов тестировали по показателям динамики гибели мышей, продолжительности жизни и количеству выживших.

Электрофоретический анализ образцов дсРНК-содержащих конструкций в геле агарозы показал, что подвижность дсРНК в составе конструкций снижалась по сравнению с подвижностью свободных дсРНК на 30–40%, что свидетельствует об образовании комплексов.

Оценка устойчивости препаратов дрожжевой дсРНК в транспортной форме при хранении (при +4 °С и при минус 18 °С в течение 2 мес) показала отсутствие каких-либо изменений в их электрофореграммах относительно контрольного препарата. В сравнительных экспериментах было установлено, что дсРНК в составе конструкций более устойчива к действию деградирующих факторов сыворотки крови, чем свободная дсРНК. То есть, дсРНК в составе частиц отличается повышенной стабильностью по сравнению с исходным препаратом.

Исследование иммуномодулирующих свойств препаратов показало, что однократное интраназальное введение препарата неинкапсулированной дсРНК приводило к усилению синтеза ИФН- α и ФНО- α в легких мышей. Достоверное повышение уровня показателей было отмечено через сутки после введения, при этом уровень ИФН- α увеличился до 178% по отношению к контролю, ФНО- α – до 203%. Существенных отличий в содержании ИФН- α и ФНО- α в гомогенатах тканей носоглотки мышей опытной и контрольной групп ни в один из сроков не обнаружено.

Введение препарата дсРНК вызывало достоверное повышение показателей активности макрофагов опытных мышей в НСТ-тесте ($0,197 \pm 0,004$ о.е. при контрольном уровне показателя $0,121 \pm 0,008$ о.е.). Эти результаты хорошо согласуются с данными по увеличению продукции в легких ФНО- α и могут свидетельствовать об усилении не только окислительно-восстановительной функции альвеолярных макрофагов, но и их способности продуцировать цитокины.

Интраназальное введение препарата дсРНК, так же как и в случае внутрибрюшинного применения, приводило к повышению выживаемости инфицированных мышей (коэффициент защиты – 41,7%) и средней продолжительности их жизни (на 3,6 сут). Достоверных различий в показателях продолжительности жизни мышей, получавших препарат интраназально или внутрибрюшинно, не обнаружено.

Препарат дсРНК в составе конструкции при интраназальном способе введения также обладал способностью повышать как число выживших мышей (коэффициент защиты–21,7), так и среднюю продолжительность их жизни (на 2,4 дня). Защитный эффект дсРНК-содержащей конструкции был более слабым, чем дсРНК, что, возможно, связано с быстрой элиминацией частиц из носоглотки и, следовательно, необходимостью введения в структуру полисахаридной оболочки дополнительных факторов тропности.

Таким образом, установлено, что интраназальное введение препарата дсРНК приводит к локальному повышению активности факторов неспецифической резистентности дыхательных путей и противовирусной устойчивости мышей в отношении вируса гриппа. Двуспиральная РНК в составе молекулярной конструкции сохраняла свои противовирусные свойства. Полученные данные позволяют говорить о перспективности использованного методического подхода для создания новой лекарственной формы дсРНК непарентерального применения для профилактики и лечения гриппа.

Библиографический список

1. Saravolac E.G., Sabuda D., Crist C. et al. Immunoprophylactic strategies against respiratory influenza virus infection // *Vaccine*. – 2001. – Vol. 19, N 17–19. – P. 2227–2232.
2. Wong J.P., Christopher M.E., Salazar A.M. et al. Nucleic acid-based antiviral drugs against seasonal and avian influenza viruses // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – P. 3175–3178.
3. Сысоева Г.М., Масычева В.И., Даниленко Е.Д. Перспективы использования индукторов интерферона в лечении и профилактике гриппа и ОРВИ // *Вестник РАМН*. – 2004. – Т. 11. – С. 33–38.
4. Patent US 4349538. Nuclease-resistant hydrophilic complex of polyriboinosinic-polyribocytidylic acid / Hilton B. Levy; Assignee The United States Of America As Represented By The Secretary Of The Department Of Health And Human Services. – Application Number US 06/208,029 ; Filing Date 07.12.1979 ; Published Date 14.09.1982.
5. Yuan X., Li L., Rathinavelu A. et al. SiRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2006. – Vol. 6, N 9–10. – P. 2821–2828.
6. Katas H., Chen S., Osamuyimen A.A. et al. Effect of preparative variables on small interfering RNA loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-chitosan submicron particles prepared by emulsification diffusion method // *J. Microencapsul.* – 2008. – Vol. 25, N 8. – P. 541–548.
7. Патент РФ № 2190018. Молекулярный вектор для доставки генов в клетки-мишени / Сизов А.А., Лебедев Л.Р., Масычева В.И., Даниленко Е.Д.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». – Заявка 2000121671 от 14.08.2000; опубл. 27.09.2002.
8. Rook G.A., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon // *J. Immunol. Methods*. – 1985. – Vol. 82, N 1. – P. 161–167.

ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ ПРИ ОСПОПРИВИВАНИИ: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, СХЕМ ВАКЦИНАЦИИ И ОСЛОЖНЕНИЙ

О.С. Ермилова¹, З.И. Гинько², С.В. Маренникова¹, В.А. Белявская¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²МСЧ 163 Федерального медико-биологического
агентства, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Ликвидация натуральной оспы (НО) в глобальном масштабе остается главным триумфом медицины за всю историю человечества. С 1980 г. по решению ВОЗ всеобщая иммунизация населения была прекращена [1]. Но угроза новых вспышек этого заболевания остается из-за возможных атак биотерроризма и высвобождения вируса из захоронений при подтаивании мерзлотных грунтов. Кроме того, население планеты становится все более восприимчивым к вирусу, так как увеличивается доля неиммунных лиц. Основным резервом экстренной массовой вакцинации остаются вакцины первого и второго поколения, хотя они не вполне соответствуют современным требованиям безопасности из-за риска осложнений [1, 3]. Разрабатываются более безопасные вакцины, но их протективные свойства изучены только на модельных животных. Стремясь повторить успех оспопрививания, ученые создают на основе вируса осповакцины рекомбинатные вакцины против других инфекционных и неинфекционных заболеваний (рак, диабет, атеросклероз) и даже старения, но пока без видимого успеха [4]. Возникает необходимость более углубленного изучения молекулярных механизмов вакцинального процесса с использованием современных подходов и методов, чтобы ответить на один из наиболее интригующих вопросов, касающийся вакцинации в целом и оспопрививания в частности: почему иммунизация осповакциной сопровождается у одних людей при однократном введении вакцин экстраординарной эффективностью (пожизненной (более 50 лет) циркуляцией специфических АТ и клеток иммунной памяти)), причем при отсутствии стимуляции природным антигеном, у других – не достигает желаемого эффекта при многократных ревакцинациях, а у третьих – сопровождается тяжелыми осложнениями.

Новое направление науки – вакциномика, возникшее на стыке молекулярной вирусологии, иммунологии и персонализированной медицины, базируется на достижениях генетики, таких как секвенирование генома человека и открытие внутривидового ресурса его изменчивости – однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), и использует высокопроизводительные «омиксные» технологии [3]. Вакциномика рассматривает гетерогенность иммунных реакций в ответ на вакцину как особенность реактивности организма, определяемой генотипическими особенностями иммунной системы, реализуемыми в фенотипические под влиянием внешних факторов среды. Выявлены ассоциативные связи между эффективностью иммунизации, риском осложнений и полиморфизмов генов главного комплекса гистосовместимости, цитокинов и др. Изучается влияние на показатели эффективности вакцинации других факторов, влияющих на реактивность организма на вакцину: статуса здоровья, возраста, половой, этнической, географической принадлежности. Полученные на одних популяциях закономерности проверяются («амплифицируются») на других с тем, чтобы выявить молекулярные механизмы базовых реакций иммунитета [3].

Ранее нами впервые на популяции русских инициировано создание регистра лиц, иммунизированных осповакциной. Создана и постоянно пополняется база первичных данных, банк биологических образцов (сыворотки, геномная ДНК) (n= 246 человек на текущий момент), проведена оценка влияния осложнений разной степени тяжести на эффективность вакцинации, определяемой по наличию и характеру поствакцинальных реакций [5].

Целью настоящего пилотного исследования, проводимого на ограниченной выборке, является изучение вируснейтрализующей активности сывороток крови лиц разного пола и возраста, вакцинированных первично и ревакцинированных с разной степенью кратности.

Материалы и методы

В исследования были включены 85 человек, иммунизированных вакциной оспенной живой сухой (производства ФГУП «НПО Микроген» в соответствии с МУ 3.3.1.2044–06). Впервые вакцинированных лиц прививали двухэтапным способом, повторно вакцинированных лиц прививали в один этап. Возраст обследованных – от 21 до 58 лет ($37,39 \pm 7,61$), мужчин – 64 человека, женщин – 21 человек (соотношение 3:1). Группа сравнения в количестве 5 человек прививок перед обследованием не получала. Работа одобрена Этическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определение титра специфических антител проводили в реакции нейтрализации вируса осповакцины, штамм Л-ИВП (из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) по методу бляшек на культуре клеток Vero, используя двукратные разведения сывороток. Титры рассчитывали по методу Спирмена-Кербера. Статистическую обработку данных проводили с помощью Statistica 6.0. Значимость различий по показателю нейтрализующей активности в группах сравнения оценивали с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при 95%-ном уровне надежности ($p \leq 0,05$).

Результаты

Изучение влияния демографических факторов на специфическую активность сывороток выявило превышение показателя активности у женщин по сравнению с мужчинами. В группе лиц до 30 лет этот показатель в 1,5 раза ниже, чем у лиц старше 31 года ($p=0,002$). (табл. 1).

Таблица 1.

Вируснейтрализующая активность сывороток крови мужчин и женщин разных возрастных групп

Группы сравнения	Возраст (M \pm SD)	Средний геометрический титр, (M \pm SD)	95%-ный ДИ	Среднее количество вакцинаций
Мужчины (64 чел)	35,78 \pm 7,65	5,82 \pm 1,28*	5,50; 6,14	2,09 \pm 1,42
Женщины (21 чел)	42,29 \pm 5,04	6,40 \pm 1,33*	5,79; 7,00	3,86 \pm 2,89
До 30 лет (17 чел)	26,65 \pm 2,55	5,12 \pm 1,17**	4,52; 5,72	1,0
От 31 года (68 чел)	40,07 \pm 5,88	6,18 \pm 1,26 **	5,87; 6,48	2,90 \pm 2,1

Примечание: M - среднее значение показателя; SD - стандартное отклонение от среднего; * - недостаточное отличие от показателя у мужчин ($p=0,08$); ** - достоверное отличие от показателей возрастной группы до 30 лет ($p=0,002$); n - количество вакцинированных, у которых проводилось измерение характеристики.

Для оценки влияния схемы и кратности вакцинации на уровень вируснейтрализующих антител все участники были поделены на три группы. В первую группу вошли лица, получавшие вакцинацию регулярно, с перерывом не более 3–5 лет, работающих с НО. Во вторую группу вошли ревакцинированные лица более чем с 30-летним перерывом после первичной вакцинации (до 1979 г.р.). Третья группа представлена впервые вакцинированными лицами (табл. 2).

Таблица 2.

Вируснейтрализующая активность сывороток крови первично и ревакцинированных лиц

Группы сравнения	Возраст (M \pm SD)	Соотношение мужчин и женщин	Средний геометрический титр, (M \pm SD)	95%-ный ДИ
Группа регулярной вакцинации (32 чел)	42,16 \pm 7,53	17/14	6,30 \pm 1,14*	5,88; 6,72
Группа с перерывом в вакцинации (26 чел)	40,27 \pm 7,07	20/6	6,29 \pm 1,41	5,72; 6,86
Группа первично вакцинированных (27 чел)	29,19 \pm 6,93	25/1	5,15 \pm 1,06* ($p=0,001$)	4,72; 5,57

Примечание (см. табл. 1).

Различия в титрах защитных антител в группах первичной вакцинации и повторных вакцинаций без учета пола и возраста статистически значимы. После первичной вакцинации у большинства вакцинированных лиц формируется защитный уровень гуморальных антител к ВОВ. Последующая ревакцинация, даже с перерывом более 30 лет, увеличивает уровень защитных антител в 1,5 раза.

Помимо местных реакций, анализ которых был проведен нами ранее [5], при вакцинации наблюдается общая реакция организма: гиперемия, температура, головная боль и т.д. В табл. 3 представлено сравнение титра нейтрализующих антител к ВОВ у лиц с зафиксированным локальным лимфаденитом и без него. Наличие подобной сопутствующей реакции является признаком распространения вакцинального агента за пределы места инокуляции.

Таблица 3.

Вируснейтрализующая активность у лиц с осложнениями (лимфадениты) и без осложнений

Группы сравнения	Средний геометрический титр, (M±SD)	95%-ный ДИ	Соотношение мужчин и женщин
С лимфаденитом (30 чел)	5,76±1,46	5,12; 6,31	28/2
Без локального лимфаденита (55 чел)	6,08±1,21	5,75; 6,40	36/19

Примечание (см. табл.1)

У лиц с лимфаденитами показатель специфической активности сывороток был меньше, чем без осложнений.

Закключение. Статистически значимые различия наблюдаются в группах между молодыми первичной и регулярной вакцинации. Внутри групп мы наблюдаем значительную разницу при использовании одной вакцины, соблюдении единой схемы вакцинации, у лиц одного возраста и пола. Подобные различия могут быть объяснены разным уровнем в реактивности каждого индивида на вакцину, которые могут быть обусловлены, в том числе, и генотипическими различиями между вакцинированными лицами. Полученные данные позволят в дальнейшем на более широкой выборке провести поиск молекулярно-генетических маркеров эффективной и безопасной вакцинации для разработки новых и усовершенствования имеющихся вакцин и схем иммунизации.

Авторы приносят благодарность Л.Ф. Бакулиной, В.Г. Сальник за помощь в экспериментальной работе.

Библиографический список

1. Научный обзор исследований вируса натуральной оспы, 1999–2010 гг. – ВОЗ, 2011.
2. Haralambieva I.H., Ovsyannikova I.G., Kennedy R.B., et al. Race and sex-based differences in cytokine immune responses to smallpox vaccine in healthy individuals // Hum Immunol. – 2013. – Vol. 74, N 10. P. 1263–1266.
3. Ovsyannikova I.G., Poland G.A. Vaccinomics: Current Findings, Challenges and Novel Approaches for Vaccine Development // AAPS J. – 2011. – Vol. 13, N 3. – P. 438–448.
4. Verardi P.H., Titong A., Hagen C.J. A vaccinia virus renaissance: new vaccine and immunotherapeutic uses after smallpox eradication // Hum Vaccin Immunother. – 2012. – Vol. 8, N 7. P. 961–970.
5. Ермилова О.С., З.И. Гинько, В.А. Белявская и др. Анализ особенностей течения вакцинального процесса у лиц, привитых оспенной живой вакциной, при первичной и повторных вакцинациях // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – №1. – С. 75–78.

СРЕДСТВО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНОЙ РНК БАКТЕРИОФАГА ф6

В.В. Ермолаев, В.П. Клименко, Я.С. Гогина, А.В. Батенева, Г.М. Сысоева, С.Г. Гамалей,
Л.Р. Лебедев, Е.Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск Новосибирской обл., Россия

Использование стимуляторов неспецифической резистентности является одним из современных апробированных подходов в борьбе с гриппом и другими вирусными инфекциями. Сравнительные исследования показали, что среди известных препаратов индукторов интерферона (поли И:Ц, циклоферон, кагоцел, амиксин, ТАУК, ридостин и др.) наиболее выраженной способностью к индукции интерферона обладают препараты двуспиральных РНК [1]. Двуспиральные РНК (дсРНК) являются агонистами рецепторов TLR3, усиливают синтез интерферонов и ряда других цитокинов, активируют макрофаги и нейтрофилы, натуральные киллеры, усиливают Т- и В-клеточный иммунный ответ, вызывают формирование противовирусной защитной реакции как на клеточном, так и организменном уровне [2, 3]. Перспективным источником дсРНК, как было показано ранее [2], может служить бактериофаг ф6, размножающийся на культуре клеток *Pseudomonas phaseolicola*.

Цель исследования – получение экспериментальных образцов двуспиральной РНК, выделенной из бактериофага ф6, и исследование ее биологической активности.

Материалы и методы

Бактериофаг ф6 и штамм *P. phaseolicola* НВ10У были получены из Коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Биомассу *P. phaseolicola* нарабатывали методом глубинного культивирования в жидкой среде на основе рыбного гидролизата (НИИ питательных сред, Махачкала), в колбах на термостатируемой качалке. Полученную культуру инфицировали суспензией бактериофага ф6. Из полученных фаголизатов удаляли клеточный дебрис центрифугированием (6000g, 15 мин) и проводили концентрирование бактериофага в 10%-ном растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) в присутствии 3%-ного натрия хлорида. Биомассу фага собирали центрифугированием. Выделение и анализ чистоты двуспиральной РНК проводили по методу [4] в собственной модификации.

Иммуномодулирующие свойства препарата фаговой дсРНК оценивали по уровню интерферониндуцирующей активности и влиянию на функцию фагоцитов. Препарат вводили самкам белых беспородных мышей однократно внутривентрально в дозе 8 мг/кг. Через 5 и 24 ч после введения у мышей забирали на анализ кровь и перитонеальные макрофаги.

Концентрацию ИФН-альфа в сыворотке крови мышей определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов «Mouse IFN-alpha Platinum ELISA» («eBioscience», Австрия). Оценку окислительно-восстановительной активности клеток-фагоцитов проводили в монослойной культуре перитонеальных макрофагов. Действие препаратов на функциональную активность макрофагов оценивали с помощью НСТ-теста [5] с собственными модификациями.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., USA). Для оценки значимости межгрупповых различий использовали U-критерий Манна-Уитни с критическим уровнем значимости (p), равным 0,05.

Результаты исследования

Как известно, культура *P. phaseolicola*, «хозяин» бактериофага ф6, непатогенна для человека и животных, хорошо растёт на синтетических, природных и полусинтетических питательных средах без потребности в факторах роста. Выращивание культуры в наших экспериментах проводили на жидкой среде на основе рыбного гидролизата при оптимальных для данной культуры температурных условиях (23–27 °C).

В ходе отработки метода культивирования было показано, что инфицирование клеток *P. phaseolicola*

НВ10У в первой половине экспоненциальной фазы роста приводило к двукратному увеличению выхода фага по сравнению с инфицированием на стадии стационарного роста культуры (3,5 г/л против 1,8 г/л). Это можно объяснить тем, что в стационарной фазе снижается количество пилесодержащих клеток, а, как известно, одной из особенностей бактериофага является то, что в клетку он проникает через клеточные пили.

Процесс очистки дсРНК состоял из следующих стадий:

- депротеинизация в 1%-ном растворе додецилсульфата натрия в присутствии хлороформа;
- фракционирование препарата в растворах 2,5 и 4 М хлористого лития.

Полученную дсРНК фага ф6 после осаждения 4 М хлористым натрием растворяли в изотоническом растворе и дополнительно очищали гель-фильтрацией на колонке с Сефакрилом S-200. Выход дсРНК составлял до 20 мг из 1 л культуры, чистота препарата – 95%.

Таблица 1.

Уровень интерферона-альфа в сыворотке крови мышей после однократного внутрибрюшинного введения препарата дсРНК фага ф6

Препарат, доза	Содержание ИФН-альфа в крови, пг/мл	
	5 ч после введения	24 ч после введения
дсРНК фага ф6, 8 мг/кг	2000 ± 236	222 ± 116
Физиологический раствор	0	0

Таблица 2.

Влияние дсРНК фага ф6 на метаболическую активность перитонеальных макрофагов мышей при однократном внутрибрюшинном введении

Препарат, доза	Количество макрофагов/мл, *10 ⁶	Уровень восстановленного НСТ, о.е. * 100	Количество макрофагов/мл, *10 ⁶	Уровень восстановленного НСТ, о.е. * 100
	5 часов после введения		24 часа после введения	
дсРНК фага ф6, 8 мг/кг	3,3±0,1*	24,1±3,1	2,2±0,2	36,1±2,2*
Физиологический раствор	2,4±0,3	17,9±2,8	2,4±0,3	13,7±2,1

* – различия достоверны, по отношению к показателям контроля (физиологический раствор), $p \leq 0,05$.

Результаты изучения интерферониндуцирующей активности дсРНК фага ф6 свидетельствуют о том, что препарат вызывал повышение ИФН-альфа в крови, при этом максимальный уровень стимуляции наблюдался через 5 ч после введения (табл. 1). Несмотря на снижение значений показателя в крови мышей через 24 ч после инъекции, эффект от введения препарата и в этот срок оставался выраженным.

Помимо усиления интерфероногенеза, фаговая дсРНК обладала способностью повышать активность перитонеальных макрофагов, которую оценивали по уровню их окислительно-восстановительной активности в НСТ-тесте. Стимулирующий эффект препарата был отмечен через 5 ч после введения и усиливался к концу первых суток. Показатели НСТ-теста в опытной группе мышей в эти сроки превышали контрольные показатели на 34 и 163% соответственно (табл. 2).

Таким образом, показано, что разработанные и оптимизированные методы культивирования, выделения и очистки позволяют получать образцы дсРНК бактериофага ф6 высокой степени чистоты, отличающейся выраженными интерферон- и фагоцитстимулирующими свойствами. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки на основе фаговой дсРНК нового лекарственного средства для профилактики и лечения вирусных инфекций.

Библиографический список

1. Оспельникова Т.П., Миронова Т.В., Полосков В.В. и др. Влияние индукторов интерферона на цитокиновый профиль // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 37–40.
2. Носик Н.Н., Пугачев В.Г., Ершов Ф.И. Двунитевая РНК фага ф6: интерферон-индуцирующие и противовирусные свойства // Антибиотики и химиотерапия. – 1990. – Т. 35, №3. – С. 25–27.
3. Аликин Ю.С., Телегина Ю.В., Лебедев Л.Р. и др. Синтез и исследование свойств биочастиц, содержащих противовирусный индуктор интерферона дсРНК и апротинин // Биофарм. ж. – 2013. – Т. 5, № 6. – С. 3–9.
4. Лебедев Л.Р., Аликин Ю.С., Рослякова Е.Ю. и др. Выделение и очистка двуспиральной рибонуклеиновой кислоты из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Биофарм. ж. – 2014. – Т. 6, № 6. – С. 32–38.
5. Rook G.A., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon // J. Immunol. Methods. – 1985. – Vol. 82, N 1. – P. 161–167.

АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЕ УСИЛЕНИЕ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА (БВВЭ) И ФЕНОМЕН УСКОРЕННОЙ ГИБЕЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ – ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ

Н.М. Zubavichene, О.В. Пьянков, Е.Ф. Бочаров

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

В настоящей работе проведена попытка изучения антителозависимого усиления тяжести течения геморрагической лихорадкой Эбола (БВВЭ) и феномена ускоренной гибели в эксперименте на морских свинках, инфицированных летальным и нелетальным штаммами вируса Эбола.

В работе использовали следующие вирусные антигены:

– вирус Эбола (ВЭ), штамм Заир Mayinga, полученный из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (далее нелетВЭ) в виде вируссодержащей культуральной жидкости с концентрацией вируса 10^5 БОЕ/мл. Штамм обладает слабой патогенностью для морских свинок, вызывает у них нелетальную инфекцию. Инфицирующая доза составила 30–50 ЛД₅₀ на 1 животное, способ инфицирования внутрибрюшинный. Всего инфицировано 10 морских свинок.

– вирус Эбола, штамм Заир К-5 (далее летВЭ), летальный для морских свинок, получен адаптацией нелетВЭ к морским свинкам путем последовательных пассажей, представляет собой 10%-ный гомогенат печени инфицированных морских свинок с концентрацией вируса 10^5 БОЕ/мл. Инфицирующая доза составила 30–50 ЛД₅₀ на 1 животное, способ инфицирования внутрибрюшинный. Всего инфицировано 10 морских свинок.

– очищенный цельновирионный препарат вируса Эбола (инВЭ), штамм Заир Mayinga. Иммунизацию 20 морских свинок инВЭ проводили внутримышечно в дозе 100 мкг на животное. Срок иммунизации – 30 суток, после чего 10 морских свинок одновременно с неиммунными морскими свинками было инфицировано летальным штаммом вируса Эбола Заир К-5. Инфицирующая доза составила 30–50 ЛД₅₀ на 1 животное, способ инфицирования внутрибрюшинный.

В качестве отрицательного контроля для снятия фоновых показателей использовали группу интактных морских свинок в количестве 8 голов. В опытах использовали 48 голов морских свинок Hartly массой 200–250 г. При выполнении экспериментальных исследований все болезненные процедуры проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Инфицированных животных содержали в помещениях, обеспечивающих уровень биобезопасности (BSL-4). На каждую экспериментальную точку брали 6 морских свинок. Уход, наблюдение и измерение ректальной температуры осуществляли ежедневно в течение 21 сут (максимальный инкубационный период).

В литературе описаны неудачи от применения первых инаktivированных цельновирионных вакцинных препаратов вируса Эбола при экспериментальной БВВЭ на лабораторных животных (морские

свинки, низшие приматы). Суть неудач состояла не только в отсутствии протекции этих кандидатных инактивированных вакцин при последующем инфицировании ВЭ, но и в регистрации феномена ускоренной гибели вакцинированных животных по сравнению с неиммунными инфицированными ВЭ животными. До последнего времени в научной литературе нет объяснения феномену антителозависимой ускоренной гибели для БВВЭ. В нашем эксперименте при воспроизведении этого эффекта мы сняли ряд показателей во всех группах морских свинок, а именно температурную реакцию, показатели гемолитической активности комплемента, титры антител против вируса Эбола в РСК, а также учитывали сроки инкубационного периода, периода лихорадочного состояния и сроки гибели морских свинок.

Как видно из представленных в таблице данных, в группе морских свинок, предварительно иммунизированных инактивированным цельновирионным антигеном ВЭ, мы обнаружили в РСК комплементсвязывающие антитела в разведениях 1/32–1/64. И именно в этой группе серопозитивных морских свинок мы наблюдали укорочение инкубационного периода в 1,5 раза, более выраженную температурную реакцию, достоверно более высокие показатели ГАК в первые 24 ч после инфицирования, достоверно более низкие показатели ГАК (около 0) через 7 суток после инфицирования и более ранние сроки гибели животных. Все выше перечисленное позволяет говорить об антителозависимом усилении тяжести заболевания БВВЭ и эффекте ускоренной гибели инфицированных летВЭ морских свинок.

Таблица.

Характеристики инфекционного процесса болезни, вызванной вирусом Эбола, у вакцинированных и невакцинированных морских свинок

Группы морских свинок	Показатели тяжести инфекционного процесса БВВЭ				
	Начало лихорадочного периода (сутки)	ГАК (ЕД) через 24 часа после инфицирования	ГАК (ЕД) через 7 сут после инфицирования	Сроки гибели (сутки)	Титры антител в РСК до инфицирования летВЭ
Вакцинированные без последующего инфицирования летВЭ	нет	39,2±5,3	55,0±3,5	нет гибели	1/32 – 1/64
Вакцинированные с последующим инфицированием летВЭ	3–4	103,6±6,5	5,4±3,9	7–8	1/32 – 1/64
Неиммунные инфицированные летВЭ	5–7	82,2±5,9	19,2±3,9	10–14	0
Неиммунные инфицированные нелетВЭ	8–13	39,2±5,3	87,5±5,5	нет гибели	0
Отрицательный контроль	нет	39,2±5,3	38,6±5,7	нет гибели	0

В 2003 и 2010 гг. вышли научные статьи о том, что компоненты классического пути активации комплемента $C1 \rightarrow C1q + C1s$ способствуют более массовому сцеплению вирусных частиц с рецепторами клеток Vero при инфицировании монослоя этих клеток в процессе культивирования. Установленный факт позволил авторам получать более высокую концентрацию вируса при культивировании на культуре клеток, что в свою очередь увеличивает выход вирусных частиц в процессе наработки вируса, а также позволяет увеличить чувствительность реакции нейтрализации вируса на культуре клеток почти в 100 раз. Мы же в свою очередь можем предположить, что факт активации системы комплемента и повышение ГАК в первые 24 ч у инфицированных летВЭ морских свинок в присутствии противовирусных антител приводит к более множественному проникновению вирусных частиц в клетки-мишени, что приводит к отягощению клинических проявлений БВВЭ и ускоренной гибели инфицированных морских свинок.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ФОРМЫ АНАЛОГА ИНТЕРФЕРОНА ГАММА

О.С. Иванова, Г.М. Левагина, С.Г. Гамалей, А.В. Батенева, М.П. Богрянцева, Е.Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск Новосибирской обл., Россия

Разработка новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения вирусных инфекций по-прежнему не теряет своей актуальности. Одним из перспективных средств борьбы с вирусами гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций является интерферон гамма (ИФН-гамма) [1]. Как известно, вирус гриппа субтипа А/Н5N1 («птичьего» гриппа) подавляет продукцию интерферона гамма в организме, что способствует молниеносному развитию болезни и летальному исходу на 5–8-й день. Введение препаратов интерферона гамма способно стимулировать клеточный иммунный ответ, препятствует вирусной репродукции. Противовирусные свойства препарата рекомбинантного ИФН-гамма человека Ингарона продемонстрированы авторами работы, показавшими, что препарат снижал концентрацию вирусов гриппа H5N2 и H5N1 в культуре клеток Vero на 1,0–3,5 lgID₅₀/мл [2].

Широкое клиническое использование препаратов интерферона гамма сдерживается сложностью технологии его получения вследствие того, что рекомбинантный белок образует в бактериальных клетках нерастворимые тельца включения [3]. В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора была разработана технология получения препарата Дельтаферон, который представляет собой аналог рекомбинантного ИФН-гамма человека, имеющий делецию 10 аминокислот на С-конце молекулы и аминокислотные замены в 129, 130 и 131 положениях (арг129-лиз130-арг131 на гли129-сер130-ала131) [4, 5]. Было показано, что структурный аналог ИФН-гамма синтезируется в клетках штамма-продуцента в растворимой форме, что позволило существенно увеличить выход целевого продукта в процессе его получения. Помимо этого, Дельтаферон вследствие модификации структуры белковой молекулы отличался повышенной устойчивостью к протеазам по сравнению с ИФН-гамма. В экспериментах на лабораторных животных было показано, что Дельтаферон сохранял биологические свойства, присущие полноразмерному белку. Этот факт является основанием для разработки лекарственного препарата на основе аналога ИФН-гамма и применения его по тем же показаниям, по которым в настоящее время используются препараты генно-инженерного ИФН-гамма.

Парентеральный способ введения – основной путь, используемый в настоящее время для препаратов интерферона гамма. Однако известно, что системное применение интерферонов в высоких дозах приводит к развитию побочных эффектов, таких как лихорадка, тошнота, рвота, проявлениям нейротоксичности [6]. Очевидно, что более перспективным способом применения является непарентеральный, обеспечивающий повышенную концентрацию действующего начала в области инфицирования. Поскольку первым сайтом контакта вируса гриппа с организмом хозяина, главным объектом инфекции и воспаления является эпителий слизистой оболочки дыхательных путей, можно предположить, что интраназальное введение ИФН-гамма обеспечит наибольшую эффективность при наименьшем числе неблагоприятных реакций.

Цель данной работы состояла в выборе рецептуры, получении образцов жидкой и лиофилизированной интраназальной форм Дельтаферона, исследовании их физико-химических и биологических свойств.

На основании анализа литературных данных были выбраны следующие компоненты интраназальной формы Дельтаферона: в качестве стабилизатора – поливинилпирролидон, биологически совместимый полимер, улучшает растворимость лекарственных веществ, пролонгирует их действие при высвобождении из лекарственной формы; в качестве антиоксиданта – трилон Б.

Оценка стабильности Дельтаферона в составе интраназальных форм электрофорезом в 12%-ном ПААГ в денатурирующих условиях [7] показала, что в образцах как жидкой, так и лиофильно высу-

шенной формы белок не подвергался деградации при хранении в течение суток при температурах минус 4 °С, +6 °С и +20 °С. При этом препарат сравнения Дельтаферон был стабилен лишь при хранении при 6 °С. То есть, введение пролонгатора и антиоксиданта способствовало повышению температурной стабильности Дельтаферона при хранении.

Дельтаферон в составе как жидкой, так и лиофильно высушенной интраназальной формы сохранял противовирусную активность в культуре клеток L-68 в отношении тест-вируса энцефаломиокардита ЕМС штамм «Колумбия» [8] ($1,9 \cdot 10^6$ и $3,9 \cdot 10^6$ МЕ/мг соответственно). Исследование образца лиофильно высушенной интраназальной формы Дельтаферона при хранении при температуре +6 °С в течение года подтвердило сохранность биологических свойств белка ($3,2 \cdot 10^6$ МЕ/мг).

Изучение иммуномодулирующих свойств интраназальной лекарственной формы Дельтаферона показало, что однократное интраназальное введение препарата в дозе 50 тыс. МЕ на мышь не приводило к существенному изменению в течение суток веса лимфоидных органов (тимус, селезенка, глоточные лимфоузлы), веса и макроскопической картины легких. Препарат не оказывал влияния на содержание ИФН-γ в крови мышей, ткани трахеи и легких через 3 и 24 ч после введения. В то же время интраназальная форма Дельтаферона вызывала повышение концентрации ИФН-γ в ткани носоглотки мышей опытной группы (на 39% по сравнению с контролем, через 3 ч после введения), и тенденция к сохранению повышенного уровня показателя была отмечена через сутки после введения.

Таким образом, разработана рецептура лекарственной формы Дельтаферона для интраназального применения, получены образцы жидкой и лиофилизированной форм. Показано, что белок в составе новых лекарственных форм отличался повышенной температурной стабильностью при хранении. Интраназальная форма Дельтаферона проявляла противовирусную активность в культуре клеток и обладала способностью вызывать усиление продукции эндогенного ИФН-γ в ткани верхних дыхательных путей мышей, что может быть существенно для реализации его противовирусной активности.

Полученные данные важны с точки зрения разработки новых лечебно-профилактических средств на основе аналога интерферона гамма человека. Продолжение работ в этом направлении позволит получить новое лекарственное средство для комплексной терапии и профилактики инфекции, вызываемой вирусом гриппа, в том числе его особо опасными штаммами А/Н1N1 и А/Н5N1 для применения в здравоохранении.

Библиографический список

1. Katze M. G., He Y., Gale M. Jr. Viruses and interferon: A fight for supremacy // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 675–687.
2. Шмелев В.А. Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа 1 – противои инфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты. – М: ИД «Медпрактика-М», 2008. – 536 с.
3. Сологуб Т.В., Эсауленко Е.В., Деева Э.Г., Йолла И. Гамма – интерферон: обоснование и перспективы применения в инфекционной патологии // *Медлайн.* – 2006. – № 3. – С. 21–23.
4. Татьков С.И., Смирнова О.Ю., Цивковский Р.Ю. Мутантный γ-интерферон человека с укороченным С-концом и его свойства // *Докл. РАН.* – 2000. – Т. 372, № 6. – С. 833–835.
5. Патент РФ № 2326944. Способ получения и препарат аналога рекомбинантного интерферона гамма человека / Мирошников П.Н., Лебедев Л.Р., Масычева В.И.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». – Заявка 2006129453 от 14.08.2006; опубл. 20.06.2008.
6. Гуревич К.Г. Разработка систем интраназальной доставки лекарственных средств // *Качественная клиническая практика.* – 2002. – №1. – С. 2–5.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
8. Yousefi S., Escobar M.R., Gouldin C.W. A practical cytopathic effect/dye-uptake interferon assay for routine use in the clinical laboratory // *Am. J. Clinical Pathol.* – 1985. – Vol. 83. – P. 735–740.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ ПОЛИЭПИТОПНЫЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИЧ-1

О.Н. Каплина, Д.В. Антонец, Е.В. Старостина, Е.А. Боробова, Л.И. Карпенко, С.И. Бажан

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Создание вакцины против ВИЧ-инфекции имеет чрезвычайно актуальное значение и требует новых подходов к разработке эффективных анти-ВИЧ вакцин. Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора было проведено сравнительное исследование иммуногенности ряда искусственных полиэпитопных ВИЧ-специфических вакцинных конструкций, спроектированных с использованием различных стратегий процессинга и презентации антигенов.

Целью данной работы было выявить наиболее эффективные ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие полиэпитопные Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1.

Материалы и методы

Для конструирования целевых полиэпитопных конструкций были выбраны десять известных или предсказанных CD8⁺ цитотоксических Т-клеточных эпитопов (ЦТЛ), а также один CD4⁺ Т-хелперный эпитоп (Тх). Дизайн иммуногенов проводили таким образом, чтобы все выбранные ЦТЛ-эпитопы были рестриктированы молекулами МНС I класса человека (HLA-A*0201) и мыши (H-2D). В качестве Т-хелперного эпитопа был выбран универсальный пептид PADRE. Для предсказания Т-клеточных эпитопов и для проектирования искусственных полиэпитопных конструкций использовалось разработанное в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора оригинальное программное обеспечение TEpredict и PolyCTLDesigner. С использованием выбранных эпитопов были спроектированы следующие варианты поли-CTL-эпитопных иммуногенов:

Конструкция G1, в составе которой взаимное расположение эпитопов, а также спейсерные последовательности между эпитопами были оптимизированы с помощью программы PolyCTLDesigner для эффективного протеасомного процессинга полиэпитопа и для связывания освободившихся эпитопов с TAP.

Конструкция G2 – полностью деоптимизированный поли-CTL-эпитопный иммуноген (по версии PolyCTLDesigner) без каких-либо спейсерных последовательностей.

Конструкция G3 – неоптимизированный поли-CTL-эпитопный иммуноген с добавлением спейсерных остатков лизина (K) или аргинина (R) между эпитопами (согласно Livingston et al. [1]).

Конструкция G4 – неоптимизированный поли-CTL-эпитопный иммуноген с добавлением одной и той же спейсерной последовательности, состоящей из консенсусного мотива ADLV (по Toes et al. [2]).

Конструкция G5 – случайно сгенерированная последовательность поли-CTL-эпитопный иммуноген без каких-либо спейсерных последовательностей.

Иммунизация экспериментальных животных

В качестве экспериментальной модели животных использовали мышей-самцов линии BALB/c. Мышей иммунизировали в/м, трижды с интервалом в 28 и 14 дней. Забой производили на 7-й день после третьей иммунизации. Животных разделили на семь групп, которым вводили: пять ДНК-вакцинных конструкций (pcDNA-Ubq_G1, pcDNA-Ubq_G2, pcDNA-Ubq_G3, pcDNA-Ubq_G4, pcDNA-Ubq_G5), pcDNA-TCI и G0 – векторная плазмида pcDNA3.1 (отрицательный контроль). Доза вводимых ДНК-вакцинных конструкций – 100 мкг/животное.

Определение количества цитокинов методом IFN-γ ELISpot Количество цитокинов определяли на основе реакции IFN-γ ELISpot по стандартной методике в коммерческой тест-системе фирмы BD. В качестве клеток-эффекторов использовали спленоциты иммунизированных животных в концентрации 2х10⁶/мл. Для специфической стимуляции спленоцитов использовали комплекс пептидов, входящих в состав каждой конструкции (20 мкг/мл). Подсчет спотов осуществляли с помощью ELISpot-reader.

Результаты

Для получения ДНК-вакцинных конструкций гены, кодирующие спроектированные иммуногены, были клонированы в векторной плазмиде pcDNA-cassette. В составе этой плазмиды целевые гены экспрессируются совместно с 5'-концевой последовательностью, кодирующей N-концевой убиквитин (Ubq) для нацеливания синтезируемых внутри клетки иммуногенов на протеасому. В результате были получены пять ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих целевые Т-клеточные иммуногены (pcDNA-Ubq_G1, pcDNA-Ubq_G2, pcDNA-Ubq_G3, pcDNA-Ubq_G4, pcDNA-Ubq_G5).

Получены доказательства экспрессии целевых генов в клетках 293Т, трансфицированных полученными ДНК-вакцинными конструкциями.

Проведено сравнительное исследование иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций *in vivo* после трёхкратной иммунизации мышей. Иммуногенность каждой вакцинной конструкции оценивали с помощью реакции ELISpot путём определения количества антиген-специфичных CD8⁺ Т-спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на стимуляцию пептидами входящими в состав каждой конструкции. Максимальный выброс цитокинов при стимуляции пептидами наблюдался у конструкции G3. Соотношение IFN- γ -продуцирующих клеток при стимуляции пептидами по отношению к спонтанному уровню составляло в среднем по группе 14,4.

Результаты исследования иммуногенности вакцинных конструкций, полученные нами в мышинной системе, были подтверждены китайскими участниками проекта, которые показали, что полиэпитопная конструкция G3 является наиболее иммуногенной. Для иммунизации мышей они использовали протокол, согласно которого первые три иммунизации проводились с использованием ДНК-вакцинных конструкций, а заключительная четвертая иммунизация – с использованием рекомбинантных вирусов осповакцины VVT (Vaccinia Viruse Tiantan), кодирующих целевые иммуногены.

Учитывая, что полученные ДНК-вакцинные конструкции были спроектированы с использованием эпитопов, рестриктированных молекулами МНС I класса человека (HLA-A*2:01) и мыши (H-2D), в дальнейшем планируется провести исследование полученных вакцинных конструкций в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo* с использованием культур периферических МНК человека.

Выводы

Показано, что в мышинной системе наиболее иммуногенной конструкцией оказалась плазида pcDNA-Ubq_G3, кодирующая иммуноген G3, структура которого была спроектирована по Livingston et al. [1].

Библиографический список

1. Livingston B.D., Newman M., Crimi C. et al. Optimization of epitope processing enhances immunogenicity of multiepitope. DNA vaccines // Vaccine. – 2001. – Vol. 19. – P. 4652–4660.
2. Toes, R.E., Nussbaum, A.K., Degermann, S. et al. Discrete Cleavage Motifs of Constitutive and Immunoproteasomes Revealed by Quantitative Analysis of Cleavage Products // J. Exp. Med. – 2001. – Vol. 194. – P. 1–12.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ ИММУНОГЕНОВ, СПОСОБНЫХ ИНДУЦИРОВАТЬ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ИЗОЛЯТОВ ВИЧ-1

Л.И. Карпенко, А.П. Рудометов, А.Н. Чикаев, Д.Н. Щербаков, А.Ю. Бакулина, О.Н. Каплина, Н.С. Щербакова, Н.Б. Андреева, А.А. Ильичев

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Стремительное распространение эпидемии СПИДа во всем мире (не исключая Россию) обуславливает необходимость создания эффективной вакцины для профилактики ВИЧ-инфекции. Несмотря на колоссальные ресурсы, затраченные на получение вакцины и острейшую конкуренцию в этой сфере, поставленная задача так и остается нерешенной по сегодняшний день. Традиционные подходы, основанные на использовании убитых или аттенуированных вирусов, а также субъединичных антигенов, оказались либо неэффективны, либо неприемлемы из соображений безопасности. Надежды на успех ученые сегодня связывают с появлением принципиально новых типов вакцин, для их создания необходимы антигены новых поколений.

Одно из перспективных направлений в создании новой генерации эффективных и безопасных иммуногенов основано на получении скафолдов (каркасных белков), экспонирующих линейные эпитопы ВИЧ-1 или их имитаторы, узнаваемые широконейтрализующими антителами (bNAbs).

В качестве носителя в первую очередь мы рассматривали частицы бактериофага M13, экспонирующие пептиды, отобранные в результате аффинной селекции с bNAbs VRC01.

Вторым кандидатом в качестве белка-носителя был выбран искусственный белок TBI (T- and B-cell immunogen), включающий в себя пять В-клеточных, а также четыре Т-клеточных эпитопа из белков Env и Gag из ВИЧ-1. В этом белке мы заменили ряд В-клеточных эпитопов на пептиды-имитаторы эпитопов, узнаваемых bNAbs VRC01, 10E8 и Z13e1. Модифицированный белок получил название newest TBI. Ген, кодирующий newest TBI, был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a+. Разработанная нами схема очистки рекомбинантного белка включала: фракционирование содержимого клеточного материала в неденатурирующих условиях; дробную экстракцию в мочеvine; выделение целевых фракций белков с помощью металл-хелатной хроматографии. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка, пригодный для иммунизации лабораторных животных, который был охарактеризован с помощью электрофореза (ЭФ), иммуноблоттинга и масс-спектрометрии.

Третьим кандидатом в качестве белка-носителя являлся белок *YkuJ* из *Bacillus subtilis*. Этот белок выбран с помощью компьютерного моделирования, его третичная структура совпадала со структурой эпитопов, узнаваемых bNAbs 10E8. Две копии фрагмента эпитопа, узнаваемого 10E8, были встроены в *YkuJ*. Рекомбинантный белок был назван DNI. Ген, кодирующий белок DNI, был синтезирован и клонирован в составе плазмиды pET21a. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка, пригодный для иммунизации лабораторных животных, который был охарактеризован с помощью ЭФ и иммуноблоттинга.

Четвертый кандидат в качестве белка-носителя – вирусоподобные частицы HBsAg. Были получены химерные варианты HBsAg, несущие пептиды-имитаторы, узнаваемые bNAbs VRC01. Полученные белки охарактеризованы и наработаны в препаративном количестве для проведения иммунизации лабораторных животных для оценки их способности индуцировать нейтрализующие антитела.

Одним из главных показателей эффективности вакцины, является оценка ее способности индуцировать ВИЧ-нейтрализующие антитела. В настоящее время проводится анализ вируснейтрализующей активности полученных сывороток с использованием технологии псевдотипированных вирусов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФН 14-14-00660.

ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ НА АПОПТОЗ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНОГО ВАКЦИННОГО ПРОЦЕССА

А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, Т.Н. Щуковская, С.А. Бугоркова

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

Одним из актуальных направлений оптимизации схем иммунизации против особо опасных бактериальных инфекций можно считать поиск средств, способных снижать проявления остаточной вирулентности живых вакцин и потенцировать реакции клеточного иммунитета в ответ на введение в организм иммуногенных препаратов.

В последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к применению для этой цели иммуномодуляторов, действие которых избирательно направлено на активацию и регуляцию функций клеток врождённого иммунитета – фагоцитов [1–3].

К иммуномодуляторам, воздействующим на рецепторы и функциональную активность клеток врождённого иммунитета, относится азоксимера бромид (полиоксидоний). Полиоксидоний стимулирует пролиферацию лимфоцитов, усиливает продукцию специфических антител при противочумной вакцинации [4].

Остаточная вирулентность культур вакцинного штамма туляремиального микроба, определяемая в соответствии с действующими нормативными документами в опытах на мышах [5], может проявляться патоморфологическими изменениями в органах и тканях животных, но возможно развитие повреждения лишь на уровне изменения функционального состояния клеток иммунной системы. К таким нарушениям можно отнести функциональные изменения, приводящие к апоптозу.

Влияние вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ на процессы апоптоза и пролиферации спленоцитов и макрофагов при моделировании противотуляремиального вакцинного процесса в настоящее время недостаточно исследовано и не изучалось в условиях направленной иммуномодуляции.

Цель данной работы – оценить влияние иммуномодулятора (полиоксидония) на реактивность клеток иммунной системы мышей линии Balb/c, иммунизированных культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Мышей линии Balb/c массой 18–20 г подкожно иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе 10^4 м.к., а также в сочетании с полиоксидонием. Части интактных мышей инокулировали только полиоксидоний. В качестве контрольных животных были взяты интактные мыши.

ПО (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) вводили животным подкожно за 60 мин до вакцинации в дозе 4 мкг.

На третьи и 21-е сутки иммуногенеза мышей умерщвляли декапитацией, забирали кровь, селезенку, содержимое брюшной полости после выполнения процедуры перитонеального лаважа. Спленоциты (СП) выделяли общепринятыми методами. Макрофаги селезёнки (МС) и перитонеальные макрофаги (ПМ) получали соответственно из суммарной фракции СП и перитонеальной жидкости методом адгезии на пластиковых чашках Петри после инкубации в течение 2 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Методом проточной цитометрии исследовали характер распределений отдельных клеток по клеточному циклу для определения относительного содержания (в %) пролиферирующих и апоптотических клеток. Для этого иммунокомпетентные клетки фиксировали 70%-ным этанолом, окрашивали раствором, содержащим 50 мкг/мл пропидия йодида (MP Biomedicals, LLC, Germany), 100 мкг/мл РНКазы (Thermo Scientific, Lithuania-Литва), 0,1%-ный Triton X-100 (MP Biomedicals, LLC, Germany) [6] и анализировали на проточном цитометре CyAn ADP.

Титр сывороточных антител у иммунизированных против туляремии мышей Balb/c определяли в реакции агглютинации объемным методом согласно инструкции производителя туляремиального диагностикума (ФГУП «НВО «Микроген»).

Пролиферативная активность СП у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, повыша-

лась на 3-и сутки иммуногенеза вдвое относительно контроля ($19,0 \pm 0,8\%$ и $8,6 \pm 0,5\%$ соответственно, $p < 0,05$), но на 21-е сутки данный показатель возвращался к норме. Пролиферация ПМ активировалась на 3-и и 21-е сутки ($9,8 \pm 0,4\%$ и $18,6 \pm 0,4\%$ соответственно, $p < 0,05$) против $1,7 \pm 0,3\%$ в контроле, а МС только на 3-и сутки с последующим резким снижением данного показателя к 21-м суткам до значения более низкого, чем в контроле ($14,7 \pm 0,4\%$ и $7,6 \pm 0,6\%$ соответственно, $p < 0,05$). Под влиянием живых клеток вакцинного штамма туляремийного микроба у животных 2-й группы активировался уровень апоптотических МС ($24,9 \pm 2,4\%$ против $10,3 \pm 0,6\%$ в контроле, $p < 0,05$), что в условиях подавления их пролиферации на 21-е сутки иммуногенеза сопровождалось дисбалансом этих двух процессов в клеточной популяции.

Введение полиоксидония интактным животным не оказывало активирующего влияния на апоптоз ПМ и СП, но уже с 3-х суток иммуногенеза отмечали активацию процесса пролиферации МС по сравнению с контролем ($23,9 \pm 0,01\%$ и $14,7 \pm 0,4\%$ соответственно, $p < 0,05$), а к 21-м суткам усиливался и апоптоз этих клеток (с $10,3 \pm 0,6\%$ до $21,2 \pm 0,7\%$).

При исследовании методом проточной цитометрии клеток иммунной системы у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на фоне премирования полиоксидонием были выявлены важные особенности их реакции на иммунизацию живыми клетками туляремийного микроба, связанные с иммуномодулирующим эффектом используемого иммуномодулятора. У животных этой группы пролиферация СП активировалась на 3-и сутки в большей степени, чем у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ ($26,1 \pm 1,0\%$ и $19,0 \pm 0,8\%$ соответственно, $p < 0,05$), достоверность различий показателей сохранялась до 21-х суток иммуногенеза. Кроме того, у животных этой группы, благодаря описанному выше модулирующему эффекту полиоксидония на макрофаги, регистрировали на 21-е сутки резкое снижение доли ПМ в апоптозе по сравнению с животными, иммунизированными *F. tularensis* 15 НИИЭГ ($1,2 \pm 0,1\%$ и $22 \pm 0,4\%$ соответственно, $p < 0,05$), а также не наблюдали в этот срок выраженного дисбаланса процессов апоптоза и пролиферации в популяции МС, наблюдаемого у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Титры специфических антител у мышей, иммунизированных против туляремии на фоне премирования полиоксидонием, были от 1:320 до 1:640, что существенно превышало титры антител у животных, иммунизированных *F. tularensis* 15 НИИЭГ (1:80).

Таким образом, установлено, что полиоксидоний, введенный интактным лабораторным животным, принципиально не изменяет функциональное состояние лимфоцитов и не влияет на уровень их пролиферативной активности, но при сочетанном применении этого иммуномодулятора с *F. tularensis* 15 НИИЭГ у мышей линии Balb/c усиливается продукция специфических антител на фоне более длительной функциональной активации спленоцитов и снижения интенсивности повреждения макрофагов в селезенке и брюшной полости.

Библиографический список

1. Каральник Б.В., Пономарёва Т.С., Дерябин П.Н. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины // Журн. микробиол. – 2014. – №6. – С. 108–112.
2. Ключева С.Н., Щуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц // Российский иммунологический журнал. – 2015. – № 9 (2). – С. 201–208.
3. Ляпина А.М., Полянина Т.И., Ульянова О.В. и др. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. <http://www.science-education.ru/102-5729>.
4. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // Цитокины и воспаление. – 2004. – № 3. – С. 41–47.
5. Саяпина Л.В., Соловьёв Е.А., Горяев А.А., Бондарев В.П. Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ в условиях длительного хранения // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – № 2. – С. 87–91.
6. Bi Y., Du Z., Yang H. et al. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *yscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway // Scand. J. Immunol. – 2009. – Vol. 70, N 4. – С. 358–367.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ «КомбиВИЧвак»

**В.И. Кузубов¹, Н.Н. Рындюк¹, З.И. Гинько¹, Р.П. Алейников¹, И.В. Василевич¹,
А.Н. Сергеев², Е.А. Нечаева², А.А. Ильичев², Л.И. Карпенко²**

ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 163 Федерального медико-биологического агентства», Кольцово Новосибирской обл., ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирской обл., Россия

Конец XX – начало XXI века ознаменовался новыми открытиями в области генетики, биологии и медицины и, как следствие – разработкой высокоэффективных вакцин нового поколения.

Сейчас во многих странах мира проводят работы, направленные на получение вакцин, способных защитить человечество от названных тяжелых инфекций.

В комплексе исследований, связанных с разработкой новых вакцин, важное место занимает пред-регистрационная оценка безопасности и эффективности этих препаратов в клинических испытаниях, т.е. оценка вакцин при введении их людям.

ФГБУЗ МСЧ №163 ФМБА России с 2006 г. является базой для клинических испытаний новых вакцин.

Клинические испытания проводят по специально разработанному протоколу. Протокол клинических испытаний проходит экспертную оценку различными учреждениями и специалистами и на конечном этапе одобряется Комитетом по этике при Министерстве здравоохранения России.

В ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработана кандидатная рекомбинантная вакцина против ВИЧ-1 «КомбиВИЧвак», которая обладает рядом уникальных свойств. Аналогов такой разработки в мире не имеется.

В период с июня 2010 по сентябрь 2011гг. на базе ФГБУЗ МСЧ №163 ФМБА России проводилась I фаза клинических испытаний кандидатной вакцины против ВИЧ-1/СПИД «КомбиВИЧвак».

Основной целью I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак» явилась оценка реактогенности, безопасности и иммуногенной активности вакцины и выбор оптимальной схемы иммунизации для решения вопроса о целесообразности перехода к расширенным клиническим испытаниям (II фаза).

В ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России было проведено скрининговое обследование кандидатов в добровольцы.

В результате проведенного скрининга для проведения испытаний были сформированы 2 группы из лиц обоего пола по 15 человек в возрасте от 20 до 45 лет.

В июне 2010 г. была начата поэтапная вакцинация добровольцев. На первом этапе были провакцинированы и помещены на 3-е суток в стационар МСЧ №163 под круглосуточное наблюдение первые 5 человек из 1-ой опытной группы. После наблюдения оставшиеся 10 человек 1-ой группы и 15 человек 2-ой группы были также госпитализированы в стационар и провакцинированы.

Продолжительность клинического исследования составила 12 и 13 мес в зависимости от кратности введения вакцины.

В результате клинического исследования получены результаты, свидетельствующие о хорошей переносимости и безопасности вакцины. Проведенные анализы продемонстрировали, что вакцина «КомбиВИЧвак» индуцирует как гуморальный, так и клеточный ВИЧ-специфический иммунный ответ, а также указывали на способность вакцины индуцировать ВИЧ-нейтрализующие антитела.

В настоящее время ведется подготовка к проведению 2-й фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак».

ВАКЦИНОМИКА КЛЕЩЕВОГО ВИРУСНОГО ЭНЦЕФАЛИТА: ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РЕАКТИВНОСТИ МАКРООРГАНИЗМА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

С.Л. Лутова¹, Ю.В. Туманов², М.И. Воевода¹, В.А. Белявская²

¹НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Введение. Высокоэффективным методом профилактики клещевых нейроинфекций является вакцинация в осенне-зимний период. Однако у части вакцинируемых даже при оптимальных схемах и сроках вакцинации уровень специфических антител оказывается ниже необходимого для защиты, что требует не только дальнейшего совершенствования вакцин, но и индивидуального подхода к вакцинации. С современной точки зрения эффективность иммунного ответа определяется индивидуальной структурной вариабельностью генома и воздействием факторов, приводящих к развитию вторичного иммунодефицита. Анализ связи между генотипами, формирующими наследственную составляющую реактивности организма, и эффективностью вакцинального иммуногенеза является предметом исследований вакциномии, нового направления на стыке вакцинологии с персонализированной медициной, базирующегося на применении высокопродуктивных «омиксных» технологий. Наиболее распространенной формой генетической вариабельности и ресурсом внутривидовой изменчивости являются «простые» мононуклеотидные и короткие делеционно-инсерционные полиморфизмы, в том числе устойчивость к инфекции, выраженность индивидуального и коллективного иммунитета. Показано наличие связи полиморфизма генов иммунного ответа (прежде всего генов системы МНСI и МНСII, цитокинов, хемокинов и ассоциированных с ними генов с эффективностью вакцинаций против различных вирусных инфекций (корь, краснуха, натуральная оспа, гепатит В и др.). Для клещевого вирусного энцефалита, такие исследования проводятся впервые нами на русской популяции, хотя существуют данные о влиянии генетического полиморфизма, например CCR5(w/del) на восприимчивость к развитию заболевания и тяжести исхода заболевания у белых канадцев [1, 2].

Хемокиновый рецептор CCR5 – важный регулятор иммуногенеза и патогенеза вирусных инфекций, особенно для инфекций, вызываемых РНК вирусами, при которых он считается «узловым» (crossroad) регулятором. Делеционный полиморфизм (w/del32) в структурной части гена является функциональным: у лиц – носителей гетерозигот плотность активного рецептора на поверхности клеток в 2 раза меньше чем у гомозиготных носителей аллеля «дикого» типа. В русской популяции доля таких носителей составляет 11–17% , а гомозиготного варианта не более 1%.

Широкому внедрению современных геномных технологий в науку и практику препятствует недостаток знаний о молекулярных механизмах и связи генотипов с эффективностью вакцинации. Поэтому актуальной является оценка влияния на реактивность организма модулирующих факторов: факторов среды (вредные привычки, психоэмоциональные стрессы), демографических факторов (влияние пола, возраста), состояние здоровья на момент вакцинации, поскольку недостаточно понимание закономерностей влияния на иммунитет модулирующих факторов, таких как популяционные, половозрастные особенности, факторы среды обитания (вредные привычки), показатели здоровья (частота респираторных инфекций в предшествующий период), цитокиновый статус и т.п.).

Цель – Оценка влияния функционального полиморфизма гена CCR5 (w/del32) (и других факторов реактивности организма (половозрастная принадлежность, статус курения, статус здоровья (хронические заболевания, психо-эмоциональный стресс), цитокиновый статус на эффективность поствакцинального гуморального иммунитета.)

Материалы и методы. Использовали вакцину “Энцевир” (вакцина против клещевого энцефалита

культуральная (очищенная концентрированная инактивированная) сорбированная жидкая, производство НПО "Микроген", Томск). Было вакцинировано 100 добровольцев (58 мужчин и 42 женщины) в возрасте от 15 до 30 лет, ранее не вакцинированных и не имевших (по результатам анкетирования) контактов с клещами. Вакцину применяли по рекомендованной производителем схеме. Через месяц после вакцинации брали пробы венозной крови для исследования эффективности вакцинации, определения концентрации цитокинов, выделения геномной ДНК. Специфические антитела (IgG) против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «ВектоВКЭ-IgG-стрип» («Вектор-Бест», Кольцово Новосибирской обл.). Уровень цитокинов IL-4 и IFNG в сыворотке крови после вакцинации определяли методом ИФА с помощью диагностических наборов, производство «Вектор-Бест».

Геномную ДНК выделяли из периферических клеток крови по стандартной методике с фенольной экстракцией. Полиморфизм CCR5 (w/del32) определяли методом аллель-специфичной ПЦР. Контрольной группой, соотношенной по полу и возрасту с опытной группой, при проведении геномных исследований служила специальная выборка (n=200), полученная из репрезентативной для русского населения Новосибирска выборки (n=10 000), сформированной в рамках международных программ (НИИ терапии).

Обработку данных проводили с помощью программ Excel 2000 (Microsoft), Statistica 5.0 (StatSoft Inc.) и SPSS 11. Для статистического анализа использовали вычисление среднего арифметического и геометрического, частот, стандартной ошибки, сравнение с помощью критериев Стьюдента (для величин с непрерывным распределением) и «Хи-квадрат» (для величин с альтернативным распределением), проводили многомерный факторный анализ.

Результаты

Протективный иммунный ответ зафиксирован у 85,8% женщин и 86,3% мужчин, причем у 61,9% женщин и 51,7% мужчин он был высоким. Низкий (ниже указанного производителем вакцины) уровень защитных антител IgG к ВКЭ был выявлен у 14,2% женщин и 13,7% мужчин, среди которых 42,9% курят по 20 сигарет в день в среднем около 5 лет, 78,6% страдают хроническими заболеваниями (компенсированный тонзиллит, бронхит, пиелонефрит и т.д.), 85,7% подвержены стрессовым факторам.

Для оценки влияния возраста на эффективность вакцинации были выделены три группы: первая – возраст от 15 до 20 лет (n=24 человека), вторая – от 21 года до 25 лет (n=21) и третья – от 26 до 30 лет (n=55). При сравнении эффективности вакцинации в разных возрастных группах по среднегеометрическому значению и среднему отклонению выявлены достоверные отличия ($p=0,0007$) в первой и третьей группах (1 группа – $76,086 \pm 88,58^*$, 3 группа – $176,55 \pm 64,24^*$, 2 группа – $153,4 \pm 54,66$), критерий Стьюдента $t=3,529$. Гендерных различий по изучаемым параметрам между мужчинами и женщинами по изучаемому параметру не обнаружено.

В общей линейной модели с использованием пакета программ SPSS-11 были обнаружены статистически значимые ассоциативные связи между уровнем специфических IgG и частотой респираторных инфекций (в предшествующий вакцинации период), а также уровнем IL-4. Статус курения и уровень IFNG не влияли на эффективность вакцинации «Энцевиром».

У носителей делеционного варианта (del 32) гена CCR5 уровень специфических IgG по среднегеометрическому был в 1,9 раза ниже, чем у носителей «дикого» аллеля ($81,34 \pm 51,03$ по сравнению с $154,45 \pm 67,32$, $p = 0,089$). Ранее было показано, что анализируемый делеционный полиморфизм является фактором риска развития тяжелого (со смертельным исходом) течения клещевого вирусного энцефалита, но не фактором предрасположенности к развитию заболевания после укуса клеща у канадцев [2]. Для уточнения роли полиморфизма гена CCR5 (w/del) в популяции русских необходимы дальнейшие исследования на расширенной выборке. Обнаруженная нами ассоциация между содержанием ИЛ-4 в сыворотке и уровнем специфических антител свидетельствует о перспективности изучения полиморфизма этого гена в расширенных исследованиях.

Заключение. В пилотных исследованиях на ограниченных выборках в результате работы было выявлено влияние возраста и частоты респираторных инфекций в предшествующий вакцинации период на выраженность поствакцинального иммунитета против клещевого вирусного энцефалита; предположена перспективность дальнейшего изучения полиморфизма гена CCR5 в роли геномного маркера

успешной вакцинации в популяции русских Сибирского региона, диагностическая ценность количественного показателя, перспективными молекулярными маркерами успешной вакцинации могут служить количественный показатель интерлейкина-4 в сыворотке крови и, вероятно, SNP этого гена.

Библиографический список

1. Grygorczuk S., Osada J., Parczewski M. et al. The expression of the chemokine receptor CCR5 in tick-borne encephalitis // J. Neuroinflammation. – 2016. – Vol. 13:45 DOI 10.1186/s12974-016-0511-0.
2. Kindberg E., Mickiene A., Ax C. et al. A Deletion in the Chemokine Receptor 5 (CCR5) Gene Is Associated with Tickborne Encephalitis // J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 197, N 2. – P. 266–269.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ АНАЛОГА БЕТА-ГЛЮКАНА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *CANDIDA ALBICANS*, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ

А.Л. Матвеев¹, Я.А. Хлусевич¹, Л.А. Кухаренко¹, Н.Э. Нифантьев², Н.В. Тикунова¹

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

²ФГБУН Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Инфекции, вызванные грибами родов *Candida*, *Aspergillus* и *Cryptococcus*, все чаще вызывают осложнения, особенно у иммунодефицитных и госпитализированных пациентов. Современная противогрибковая терапия является дорогостоящей и может вызывать серьезные побочные эффекты, в том числе приводя к появлению устойчивых штаммов. Например, известно, что применение химиотерапии для лечения системного кандидоза примерно у 40% пациентов не влияет на развитие инфекции, из-за этого общая смертность от этой инфекции составляет около 40–50% [1, 2]. Кроме того, широко распространенный хронический кандидозный вульвовагинит очень часто не чувствителен к современным противогрибковым методам лечения [3]. Появление штаммов, устойчивых к разработанным антимикотикам, сделало актуальной разработку антигрибковых вакцин, терапевтических средств нового поколения и разработку новых высокочувствительных тест-систем.

Одной из сложностей для выявления и профилактики кандидозов в России является отсутствие своевременной высокочувствительной диагностики. Основной и наиболее чувствительный подход – это создание ИФА-тест системы на основе моноклональных антител, связывающих синтетический аналог β -1,6-глюкана *Candida albicans*. Такие антитела помимо применения в диагностике также могут являться перспективными для создания нового поколения антимикозных терапевтических препаратов.

В настоящее время наиболее перспективным вариантом терапии кандидозов является интегрированный подход с использованием рекомбинантных антимикозных протективных антител совместно с классическими химиотерапевтическими антимикозными препаратами [4–7]. Среди патогенных грибов наиболее часто встречаются штаммы *Candida albicans*. На животных моделях показано, что антитела против маннана, присутствующего в клеточной стенке этого микроорганизма, обеспечивают протективный иммунитет [5]. Моноклональные антитела против β -1,6-глюкана *C. albicans* также продемонстрировали протективную активность в мышинной модели. Кроме того, сконструированы протективные антитела против β -1,3-глюкана *C. albicans* [8], в том числе и получаемые в растительных клетках [9]. Такие антитела являются перспективными для создания оригинальной ИФА тест-системы.

β -1,3-глюкан является основным компонентом клеточной стенки грибов и составляет от 30% до 80% от массы клеточной стенки. Он представляет собой разветвленный полимер, который состоит из основной и боковых цепей. Основная цепь, так же как и боковые, состоит из молекул глюкозы, соединенных бета-1,3-связями. Боковые цепи в β -1,3-глюкане соединены с основной цепью бета-1,6-связями [10–12]. Известно, что в растворе β -1,3-глюкан может существовать в виде одноцепо-

чечной спиральной формы, а также может образовывать стабильные трехцепочечные спирали [13, 14]. β -1,3-Гликановая спираль придает эластичность и прочность клеточной стенке грибов. Глюканы синтезируются β -1,3-глюкансинтетазой, ферментом с несколькими трансмембранными доменами, из уридиндифосфат-глюкозы (UDP-глюкозы) [15]. β -1,3-Глюкансинтетаза является главной мишенью при создании противогрибковых агентов. В настоящее время широко используются эхинокандины для лечения аспергиллеза и кандидоза [16].

Для получения моноклональных антител против олигосахаридного микоантигена бета-глюкана взрослые мыши линии BALB/c были иммунизированы конъюгатом синтетического бета-глюкана с бычьим сывороточным альбумином, с использованием в качестве адьюванта Фрейнда (антиген синтезирован в Институте органической химии РАН). Иммунизация была проведена 4 раза с интервалом в 2–4 недели. Эффективность иммунизации контролировали с помощью ИФА, при этом на первых этапах в качестве антигена использовали конъюгат бета-глюкана с биотином, а в качестве отрицательного контроля – биотин. Через 3 дня после последней иммунизации клетки из селезенки и лимфоузлов иммунизированных мышей были гибридизованы с миеломной линией SP2/0. Для отбора целевых гибридом клетки после гибридизации культивировали на селективной среде, содержащей НАТ-добавку. После анализа культуральной жидкости на наличие требуемых МКА с помощью ИФА отдельные клоны были получены методом предельных разведений. В итоге было получено 5 гибридомных линий клеток, продуцирующих специфические МКА против бета-глюкана.

Библиографический список

1. Enoch D.A., Ludlam H.A., Brown N.M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options // J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 55. – P. 809–818.
2. Kanafani Z.A., Perfect J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46. – P. 120–128.
3. Sobel J.D. Management of patients with recurrent vulvovaginal candidiasis // Drugs. – 2003. – Vol. 63. – P. 1059–1066.
4. Casadevall A., Dadachova E., Pirofski L.A. Passive antibody therapy for infectious diseases // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P. 695–703.
5. Matthews, R.C., Burnie, J.P. Recombinant antibodies: a natural partner in combinatorial antifungal therapy // Vaccine. – 2004. – Vol. 22. – P. 865–871.
6. Cassone A., De Bernardis F., Torosantucci A. An outline of the role of anti-*Candida* antibodies within the context of passive immunization and protection from candidiasis // Curr. Mol. Med. – 2005. – Vol. 5. – P. 377–382.
7. Ostrosky-Zeichner L., Casadevall A., Galgiani J.N. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond // Nat. Rev. Drug Discov. – 2010. – Vol. 9. – P. 719–727.
8. Cassone A; Torosantucci A Protective anti-glucan antibodies with preference for β -1,3-glucans European patent #1789448 B1. – 2013.
9. Capodicasa C., Chiani P., Bromuro C. et al. Plant production of anti- β -glucan antibodies for immunotherapy of fungal infections in humans // Plant Biotechnol. J. – 2011. – Vol. 9. – P. 776–787.
10. Klis F. M., Sosinska G. J., de Groot P. W. J., Brul S. Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence // FEMS Yeast Research. – 2009. – Vol. 9. – P. 1013–1028.
11. Latgé J.-P. The cell wall: A carbohydrate armour for the fungal cell // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 66. – P. 279–290.
12. Lesage G., Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – Vol. 70. – P. 317–343.
13. Bohn J. A., BeMiller J. N. (1,3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: A review of the structure-functional activity relationship // Carbohydr. Polym. – 1995. – Vol. 28. – P. 3–14.
14. Laroche C., Michaud P. New developments and prospective applications for β (1,3) glucans // Recent Patents on Biotechnology. – 2007. – Vol. 1. – P. 59–73.
15. Frost D. J., Brandt K., Capobianco J., Goldman R. Characterization of (1,3)- β glucan synthase in *Candida albicans*: Microsomal assay from the yeast or mycelia morphological forms and a permeabilized whole-cell assay // Microbiology. – 1994. – Vol. 140. – P. 2239–2246.
16. Chen S. C.-A., Slavin M. A., Sorrell T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections // Drugs. – 2011. – Vol. 71. – P. 11–41.

ОПЫТ ОЦЕНКИ ИЗМЕНЕНИЙ НАПРЯЖЕННОСТИ АУТОИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ПРОТИВ ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ И СЕЗОННОГО ГРИППА

**А.В. Матвейчев, М.В. Талаева, М.И. Цыганова, Е.В. Мохонова, З.И. Никитина,
В.Н. Коптелова, В.А. Лапин**

*ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия*

Острые респираторные инфекции бактериальной и вирусной этиологии представляют собой социально значимую проблему, эффективно решаемую с помощью профилактической вакцинации. Однако растущая активность противовакцинаторских движений, имеющих целью повсеместный отказ от вакцинации, существенно снижает охват населения профилактическими прививками и ставит под угрозу общественное здоровье. Одним из основных тезисов противников вакцинации является предположение о существенной недооценке влияния профилактических вакцин на протекание аутоиммунных реакций и значимом повышении риска развития аутоиммунных заболеваний при проведении массовых кампаний по вакцинации. Данная точка зрения имеет ряд сторонников [1, 2, 4] и противников [3, 5–7] среди ученого сообщества, и до сих пор является остродискуссионной. Существующая же неоднозначность мнений активно используется антивакцинаторами в собственных целях. Принимая во внимание существование разнонаправленных мнений в отношении степени влияния вакцинных препаратов на аутоиммунный ответ, а также активность противовакцинаторских движений, нами было принято решение экспериментально оценить изменение широкого спектра маркеров, связанных с течением аутоиммунных реакций, в крови лиц, вакцинированных против социально значимых респираторных инфекций.

Исследуемым материалом являлись образцы сыворотки и цельной крови лиц, получивших профилактическую вакцинацию против пневмококковой инфекции (вакцина «Пневмо-23», группа – военнослужащие, ср. возраст 19.48 ± 0.2 лет, $n=54$) и сезонного гриппа 2014–15 гг. (вакцина «Гриппол», группа – медицинские работники и пациенты гастроэнтерологического профиля, ср. возраст 48 ± 12 лет, $n=31$). У лиц, вакцинированных против пневмококка, кровь забирали на 20, 65, 110, 153, 192, 246, 276, 319 дни, в образцах оценивали содержание ревматоидного фактора (РФ), аутоантител классов IgM и IgG к нативной ДНК (анти-ДНК-IgM/IgG) и кардиолипину (анти-КЛ-IgM/IgG), антител класса IgG к циклическому цитруллинному пептиду (анти-CCP), тиреоглобулину (анти-ТГ) с помощью иммуноферментного анализа и РПГА. Сравнение вели с группой невакцинированных лиц того же половозрастного состава ($n=24$). У лиц, вакцинированных против сезонного гриппа, оценивали содержание РФ, анти-ДНК-IgM/IgG, анти-КЛ-IgM/IgG, анти-ТГ, высоко- и низкомолекулярных циркулирующих иммунных комплексов (ВМС и НМС ЦИК), свободного ферритина. Также проводили оценку содержания Т-хелперов 17 типа (Th17) как клеток фенотипа CD4+CD161+, а также Т-регуляторных клеток (Т-рег) с фенотипом CD4+CD25+FoxP3+ методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Сравнение вели между указанными показателями у невакцинированных лиц и лиц, получивших вакцинацию (забор крови через 3–6 мес после вакцинации). Статистическая обработка производилась с помощью U-критерия Манна-Уитни (титры ревматоидного фактора и аутоантител к тиреоглобулину) или непарного t-критерия Стьюдента (все остальные данные).

В ходе проведения работ было установлено, что введение вакцины «Пневмо-23» не вызывало у вакцинированных лиц изменения содержания анти-ТГ, анти-CCP, а также РФ. В то же время были обнаружены достоверные изменения в продукции анти-ДНК и анти-КЛ. Так, начиная со срока в 105 дней с момента вакцинации индекс титра анти-ДНК-IgM (ОД образца/ОД внутреннего контроля - средней ОД клинически здоровых доноров крови различных возрастных групп, $n=100$) испытывал исходно недостоверную тенденцию к возрастанию, которая со срока в 192 дня приобретала достоверность. Превышение средних значений индекса над уровнем контроля составило для даты в 192 дня – 1,25 раза, для даты 246 дней – 1,3 раза, для даты 276 дней – 1,4 раза ($p \leq 0,05$) (индекс титров для контрольной

группы составлял $1,75 \pm 0,09$ усл. ед.). К 315-му дню показатель опускался до значений, не отличимых от контроля. Содержание анти-ДНК-IgG достоверно превышало контрольные значения только к 105 дню ($2,13 \pm 0,07$ группа вакцинированных против $1,85 \pm 0,09$ группы контроля, $p \leq 0,05$, отличие в 1,15 раза), и далее снижалось до значения контроля. Содержание аутоантител к КЛ практически сразу же после вакцинации (начиная с первой временной точки – 20 дней) повышалось выше контрольных значений как для IgM, так и IgG (анти-КЛ-IgM – $1,94 \pm 0,05$ группа вакцинированных и $1,64 \pm 0,09$ группа контроля, анти-КЛ-IgG – $1,8 \pm 0,07$ группа вакцинированных и $1,61 \pm 0,09$ группа контроля, $p \leq 0,05$). Впоследствии содержание обоих классов анти-КЛ у группы вакцинированных лиц оставалось достоверно выше уровня контрольной группы на протяжении всего срока наблюдения (до 319 дня включительно), находясь в районе значения индекса 2. Следует, однако, отметить, что ни один из участников исследования не был за время наблюдения госпитализирован по причине развития аутоиммунных заболеваний, что свидетельствует об отсутствии клинически значимых патологий, индуцированных вакциной.

Учитывая неоднозначность данных, полученных в работе с вакциной против пневмококка, в работу с вакциной против гриппа “Гриппол” мы включили, наряду с оценкой аутоантител, оценку факторов клеточного аутоиммунитета. Согласно полученным нами данным, введение вакцины “Гриппол” не приводило к достоверным изменениям в содержании данных факторов (средний индекс для анти-ДНК-IgM у лиц контрольной группы составил $2,37 \pm 0,18$, у вакцинированных лиц $2,17 \pm 0,13$; средний индекс для анти-ДНК-IgG у лиц контрольной группы составил $1,75 \pm 0,1$, у вакцинированных лиц $1,69 \pm 0,05$; средний индекс для анти-КЛ-IgM у лиц контрольной группы составил $1,87 \pm 0,13$, у вакцинированных лиц $1,9 \pm 0,07$; средний индекс для анти-КЛ-IgG у лиц контрольной группы составил $2,14 \pm 0,16$, у вакцинированных лиц $2,02 \pm 0,15$). Также не изменялось под действием “Гриппола” содержание РФ. Содержание ферритина испытывало тенденцию к снижению, которая, однако, не являлась достоверной (среднее содержание ферритина у лиц контрольной группы составило $343,75 \pm 49$ мкг/л, у вакцинированных лиц $279,47 \pm 37,8$ мкг/л). Так же не оказывала влияния вакцинация на образование ЦИК (среднее содержание ВМС ЦИК у лиц контрольной группы составило $386,4 \pm 52,46$ усл. ед., у вакцинированных лиц $356 \pm 11,18$ усл. ед.; среднее содержание для НМС ЦИК у лиц контрольной группы составил $117,8 \pm 27,8$ усл. ед. у вакцинированных лиц $78,31 \pm 11,18$ усл. ед., обе тенденции к понижению не достоверны). Лабораторные нормы при этом составляют для ВМС ЦИК 380 условных единиц, для НМС ЦИК – 50 условных единиц.

Оценка содержания Th17 и T-reg – значимых участников формирования аутоиммунного гомеостаза – виделась нам актуальной задачей как в связи с упомянутой выше неоднозначностью данных по вакцине “Пневмо-23”, так и в связи с необоснованно малым количеством работ, затрагивающих вопрос оценки влияния клеточных механизмов на аутоиммунный гомеостаз вакцинированных. Нами было показано, что введение вакцины “Гриппол” не оказывало влияния на процентное содержание исследуемых субпопуляций. Так, в крови лиц контрольной группы содержалось в среднем $2,76 \pm 0,31\%$ CD4+CD25+FoxP3+ T-регуляторных клеток, для группы вакцинированных лиц данное значение составляло $2,7 \pm 0,4\%$. Содержание CD4+CD161+ Th17 у контрольной группы составляло $9,66 \pm 0,8\%$, у вакцинированных лиц – $10,11 \pm 0,9\%$.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что введение вакцин против пневмококковой инфекции и сезонного гриппа не вело, в пределах исследуемых групп, к развитию клинически выраженной аутоиммунной патологии. В то же время вакцина “Пневмо-23” приводила к стойкому повышению содержания аутоантител к кардиолипину и транзиторному – аутоантител к ДНК, тогда как вакцина “Гриппол” не демонстрировала подобного эффекта. Полученные исследования поддерживают точку зрения относительно высокой безопасности введения профилактических вакцин и верности общепринятой оценки рисков вакцинации, однако мы считаем, что работы в области оценки безопасности вакцинации должны быть продолжены с расширением числа участвующих лиц и с вовлечением различных социальных и профессиональных групп.

Библиографический список

1. Girard M. Autoimmune hazards of hepatitis B vaccine // *Autoimmun. Rev.* – 2005. – Vol. 4. – P. 96–100.
2. Geier D.A., Geier M.R. A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization // *Autoimmunity.* – 2005. – Vol. 38, N 4. – P. 295–301.
3. Farez M.F., Correale J. Immunizations and risk of multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. // *J.*

Neurol. – 2011. – Vol. 258, N 7. – P. 1197–1206.

4.Hernán M.A., Jick S.S., Olek M.J., Jick H. Recombinant hepatitis B vaccine and the risk of multiple sclerosis: A prospective study // Neurology. – 2004. – Vol. 63. – P. 838–842.

5.Mikaeloff Y., Caridade G., Suissa S., Tardieu M. Hepatitis B vaccine and the risk of CNS inflammatory demyelination in childhood // Neurology. – 2009. – Vol. 72. – P.873–880.

6.Sadovnick A.D., Scheifele D.W. School-based hepatitis B vaccination programme and adolescent multiple sclerosis // Lancet. – 2000. – Vol. 355. – P. 549–550.

7.Stratton K., Almario D.A., McCormick M.C., Editors. Immunization Safety Review: Hepatitis B vaccine and demyelinating neurological disorders (Free Executive Summary). – Washington, DC: The National Academies Press, 2002. – 120 p.

ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ ПО МАССОВОЙ ИММУНИЗАЦИИ НАСЕЛЕНИЯ В ОЧАГЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ОСОБО ОПАСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Т.Ю. Михалева, В.И. Кузубов, З.И. Гинько, Н.Н. Рындюк, В.И. Чернов

*ФГБУЗ «Медико-санитарная часть №163 Федерального медико-биологического агентства»,
Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Вакцинопрофилактика натуральной оспы с помощью живых оспенных вакцин (1–2-е поколения), которая осуществлялась в прошлом во всем мире, обеспечила индивидуальный и коллективный иммунитет к возбудителю этой особо опасной инфекции. Обязательное оспопрививание было единственным эффективным способом сократить заболеваемость и предотвратить эпидемию.

В совокупности с созданной системой активного противозидемического надзора вакцинация населения привела к ликвидации натуральной оспы в мире, в связи с чем в 1980 г. иммунизация против этого заболевания была прекращена.

В мире официально существуют 2 коллекции штаммов вируса натуральной оспы, с которыми ведутся работы в Сотрудничающих Центрах ВОЗ.

При регистрации очагов инфекционных заболеваний в ряде случаев для их локализации и ликвидации необходимо проведение массовой иммунизации населения, находящегося в границах очага.

Проведение научно-исследовательских работ с коллекциями этого патогена диктует необходимость создания одной из основных мер защиты – иммунитета к натуральной оспе путем вакцинации лиц с повышенным риском заражения.

В части подготовки к данным мероприятиям сотрудниками ФГБУЗ МСЧ №163 ФМБА России (МСЧ №163) проведена следующая работа:

- существует запас оспенных вакцин в необходимом количестве;
- для проведения иммунизации имеются в достаточном количестве бифуркационные иглы и приобретен безыгольный инъектор;
- созданы и обучены способам вакцинации бригады медицинских работников;
- определены пункты вакцинации;
- созданы памятки прививаемым против натуральной оспы.

Экстренной вакцинопрофилактике при подтверждении диагноза натуральной оспы подлежат:

- 1) группы риска (медицинские и другие работники, задействованные в ликвидации эпидемического очага);
- 2) лица, находившиеся в прямом или непрямом контакте с больным или умершими от этого заболевания, а также их вещами.

Круг лиц, подлежащих вакцинации, может быть расширен по эпидемическим показаниям.

Для профилактики натуральной оспы на сегодняшний день в России могут применяться вакцины 1–2-го поколения.

МСЧ № 163 совместно с ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) уделяют особое внимание созданию не имеющих аналогов в мире средств профилактики натуральной оспы перорального применения.

Таким образом, МСЧ №163 имеет все необходимое для ликвидации очага натуральной оспы и совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора участвует в разработке ультрасовременных средств профилактики этого заболевания.

РАЗРАБОТКА ЖИВОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ТРИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СЕЗОННОГО ГРИППА

**Е.А. Нечаева¹, Т.Ю. Сенькина¹, И.Ф. Радаева¹, Н.Б. Думченко¹, Т.М.Свириденко¹,
Н.В.Жилина¹, Ю.С.Нечаев¹, М.П. Богрянцева¹, С.В.Усова¹, Л.Г. Руденко²**

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Перспективность борьбы с гриппом с помощью вакцинации признается специалистами всего мира, что отражено в решениях Всемирной организации здравоохранения, рекомендациях Комитета США по практике иммунизации и официальных документах Минздрава России. В последние годы значительно возрос интерес к живой гриппозной вакцине. Живые гриппозные вакцины включены в глобальный план ВОЗ по подготовке к пандемии, поскольку именно они стимулируют все звенья противогриппозного иммунитета [2, 10]. Другие преимущества живых вакцин – интраназальный путь введения, возможность быстрой наработки больших объемов вирусного материала, быстрота проведения массовой вакцинации, а также возможность защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа.

В последние годы активно обсуждается вопрос о переводе производства гриппозных вакцин на перевиваемые клеточные линии, что сделает производство независимым от поставок куриных эмбрионов и позволит в короткие сроки нарабатывать большие объемы вирусной биомассы. К настоящему времени существует несколько перевиваемых клеточных линий, аттестованных для их использования в качестве субстрата для производства вакцин. Преимуществом клеточной линии MDCK является ее высокая чувствительность к вирусам гриппа, способность поддерживать их репликацию на высоком уровне в присутствии бессывороточных сред и др.

Материалы и методы

Вакцинные штаммы A/17/Боливия/2013/6585(A/H1N1), A/17/Швейцария/2013/1(H3N2) и B/60/Пхукет/2013/26 получены в Институте экспериментальной медицины реассортацией холодоадаптированных доноров аттенуации A/Leningrad/134/17/57(H2N2) и B/СССР/60/69 с эпидемически актуальными штаммами. В качестве «диких» родительских штаммов использованы эпидемически актуальные штаммы вируса гриппа типа A/H1N1, A/H3N2 и B, рекомендованные ВОЗ для подготовки вакцин против гриппа. В качестве клеточного субстрата применяли перевиваемую линию клеток почки нормальной взрослой самки коккер-спаниеля MDCK из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для культивирования клеток использовали питательную среду Игла MEM (ГУП «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Россия) и сыворотку крови плодов коровы (Invitrogen, США); для наработки вируса бессывороточную питательную среду для культивирования клеток MDCK и Vero (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Клетки выращивали в питательной среде Игла MEM с добавлением 5%-ной сыворотки крови плодов коровы, наработку вируса проводили в бессывороточной среде в присутствии трипсина в концентрации 2–4 мкг/мл [6]. Ежедневно оценивали морфологию клеток, выход клеточного материала, отбирали пробы вирусосодержащего материала. Специфическую активность вирусосодержащих сборов определяли титрованием на кури-

ных эмбрионах [5] и выражали в $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2$ мл. Вирусосодержащие сборы собирали, освобождали от клеточного детрита, добавляли стабилизатор, разливали в ампулы по 0,2 мл и подвергали лиофилизации. После высушивания материала ампулы заполняли аргоном и запаивали. Полученные серии готовой формы вакцины контролировали на подлинность, специфическую и гемагглютинирующую активность [5], стерильность, отсутствие аномальной токсичности, физико-химические свойства, pH [1], содержание остаточной клеточной ДНК [4], содержание гентамицина сульфата, потерю в массе при высушивании [8]. Для определения подлинности использовали гомологичную типоспецифическую сыворотку гриппозную для РТГА по ТУ 938941-00-44429427-2008 и диагностикум гриппозный для РТГА (ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», С.-Петербург, Россия).

Результаты и обсуждение

Вакцинные штаммы депонированы в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Согласно паспорта, специфическая активность лиофилизированных вакцинных штаммов А/17/Боливия/2013/6585 (А/Н1N1), А/17/Швейцария/2013/1 (Н3N2) и В/60/Пхукет/2013/26 составляла 8,0 – 8,2 $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2$ мл, гемагглютинирующая активность – 1:32-1:512 с 1%-ными куриными эритроцитами, гемагглютинин и нейраминидаза были идентичны эпидемически актуальным штаммам. Безвредность реассортантов доказана при подкожном и внутривенном введении мышам и морским свинкам, а также по результатам клинических испытаний.

Живую культуральную тривалентную гриппозную вакцину получали на основе культуры клеток MDCK. Ранее во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора были созданы и заложены на хранение при температуре жидкого азота посевные и рабочие банки клеток MDCK. Банки аттестованы в соответствии с национальными и международными требованиями ВОЗ, получено решение Комитета иммунобиологических препаратов МЗ РФ на использование их в производстве иммунобиологических препаратов [7].

Клетки MDCK культивировали при температуре $37 \pm 0,5$ °C. Через 2–3 суток из сосудов удаляли питательную среду, клетки отмывали бессыывороточной питательной средой, вносили вирусосодержащий материал из расчета 0,1–0,0001 ЭИД_{50} вируса на клетку. Затем в культуральные сосуды вносили бессыывороточную питательную среду и трипсин в концентрации 2–4 мкг/мл и продолжали культивирование зараженных клеток в течение 3–5 суток, поддерживая температуру 33 ± 1 °C. На 3–5 сутки было получено максимальное количество вируса, специфическая активность вирусосодержащих сборов составляла 7,8–9,5 $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2$ мл. Вирусосодержащие сборы собирали в стерильную емкость, в культуральный сосуд вносили порцию свежей питательной среды, равной объему слитой вирусосодержащей жидкости. На 3–5 сутки собирали второй вирусосодержащий сбор. Для получения лиофилизированной формы вакцины вирусосодержащие сборы объединяли, подвергали фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры, вносили стабилизатор, разливали в ампулы по 0,2 мл и подвергали лиофилизации в стандартном режиме в течение 48 ч. После высушивания материала ампулы заполняли аргоном и запаивали. На ампулы наклеивали этикетки с названием и дозой вакцины, ампулы укладывали в пачки картонные, далее передавали на режимное хранение.

На основании проведенных исследований были разработаны проект Фармакопейной статьи предприятия и Лабораторный регламент «Вакцина гриппозная тривалентная культуральная живая, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения» ЛР № 05664012-029-14. По разработанной технологии были получены 3 экспериментальные серии вакцины, которые прошли контроль в ОБТК ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на соответствие требованиям нормативной документации. Вакцина имела вид аморфной массы светло-коричневатого цвета, растворялась в течение 30 сек при внесении в ампулу 0,5 мл (1 доза) дистиллированной воды при встряхивании. При растворении вакцина имела вид прозрачной жидкости без осадка и посторонних включений, показатель pH составлял 6,9. Потеря в массе при высушивании вакцины составляла 0,8%. При определении подлинности было показано, что вакцина взаимодействовала с гомологичными типоспецифическими сыворотками и не взаимодействовала с гетерологичными сыворотками других типов и подтипов вируса гриппа. Образцы живой культуральной гриппозной вакцины были стерильны, не содержали микоплазм и посторонних вирусов. Специфическая активность вируса гриппа в вакцине составляла (7,93 – 8,0) $\lg \text{ЭИД}_{50}/0,2$ мл. В тесте «ускоренного старения» показана термостабильность вакцины [3]. Содержание остаточной клеточной ДНК составляло менее 10 нг в дозе вакцины, что соответствует требованиям ВОЗ [9]. Изучение

стабильности свойств вакцины в течение 12 мес хранения при температуре 4–8 °С подтвердило сохранение специфической активности и других показателей на уровне исходных.

Выводы

В результате проведенных исследований впервые в России разработана живая культуральная тривалентная вакцина против сезонного гриппа. Получены 3 экспериментальные серии вакцины, которые по всем изученным показателям соответствовали требованиям нормативной документации. Технология является универсальной и может быть использована для получения живой культуральной вакцины на основе различных штаммов вируса гриппа.

Библиографический список

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XII издание, часть 1. – М., 2007. – 697 с.
2. Гриппозные вакцины: документ по позиции ВОЗ, ноябрь 2012 года // <http://www.who.int/wer.2012.№47>, P. 461–476.
3. Методические рекомендации: определение стабильности отраслевых стандартных образцов (ОСО) и других МИБП ускоренным методом. М.: «ГИСК им. Л.А. Тарасевича», 2003. – 8 с.
4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания 4.1/4.2.588-96. – М., 1998. – 128 с.
5. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. МУК 3.3.2.1758-03.
6. Нечаева Е.А., Сенькина Т.Ю., Радаева И.Ф. и др. Способ получения живой культуральной вакцины против вируса гриппа // Патент РФ № 2420314, 2011.
7. Радаева И.Ф., Колокольцова Т.Д., Нечаева Е.А. и др. Создание и аттестация банков перевиваемых клеток MDCK для производства гриппозной вакцины // *Вопр. вирусол.* – 2005. – № 2. – С. 43–46.
8. ФС 42-3874-99. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов.
9. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biological. WHO TRS № 927. – Geneva, 2005.
10. World Health Organization. Initiative for Vaccine Research (IVR). Options for Live Attenuated Influenza Vaccines In the Control of Epidemic and Pandemic Influenza 12–13 June 2007. Available at: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/influenza/meeting_120707/en/index.html.

ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНАЦИИ НА ПОСЛЕДСТВИЯ ЭПИДЕМИЙ ОСОБО ОПАСНЫХ И СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИЙ (УНИВЕРСАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ)

Л.Ф. Низолenco, А.Г. Бачинский

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Математические модели могут быть полезны для получения качественных и количественных оценок динамики эпидемий инфекционных заболеваний и в частности, влияния стратегий противодействия. Разработанная в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора детерминистическая модель описывает развитие эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных и социально значимых инфекций и доступна по адресу: <http://epimod.vector.nsc.ru> и <http://vector-epimod.ru>. Подробное ее описание опубликовано ранее [1]. В данной работе демонстрируются возможности модели для исследования влияния вакцинации на последствия эпидемий на примере оспы, сезонного гриппа, а также болезни, вызванной вирусом Эбола, – БВВЭ (гипотетическая вакцина), выбранной в качестве примера из-за активизации работ по созданию ранее не существовавшей лицензированной вакцины.

Влияние иммунитета на динамику эпидемии при моделировании реализуется, прежде всего, за счет изменения эффективной скорости трансмиссии R_e , которая определяется как "среднее число инфициру-

емых от одного больного". Используемый обычно параметр R_0 обозначает число инфицируемых одним больным в полностью чувствительной популяции при отсутствии мер противодействия. Уменьшение значения R_e по сравнению с R_0 достигается, в частности, за счет влияния уровня коллективного иммунитета. Прежде всего, иммунные лица могут быть менее чувствительными к инфекции. Во-вторых, у них может быть снижена инфекционность. В-третьих, доля тяжелых форм (если таковые имеются) у них может быть ниже, чем у неиммунных. Соответственно, если долю иммунных лиц в популяции обозначить через P , то зависимость значения R_e от этой величины можно выразить формулой:

$$R_e = R_0 * [P * S + (1 - P)] * [P * (Q * H + (1 - Q) * E) + (1 - P) * (q + (1 - q) * E)] \quad (1)$$

Выражение в первых квадратных скобках задает снижение чувствительности к инфекции за счет иммунных лиц: $S \leq 1$ – доля чувствительности к инфекции иммунных по сравнению с неиммунными. Выражение во вторых квадратных скобках задает снижение напряженности инфекционного фона, формируемого больными: Q и q – доля тяжелых форм среди иммунных и неиммунных соответственно; $E \leq 1$ – отношение заразности больного легкой формой к заразности больного тяжелой формой заболевания; $H \leq 1$ – отношение заразности иммунных больных тяжелой формой заболевания к заразности неиммунных. Таким образом, R_e снижается по отношению к R_0 с увеличением числа иммунных, и при некотором уровне коллективного иммунитета может стать меньше единицы, так что эпидемия будет затухать даже без других мер противодействия. В соответствии с формулой (1), для сезонного гриппа при $R_0 = 1,5$ это происходит, если вакцинировано 30 и более процентов населения. Для БВВЭ с $R_0 = 2$ (если предполагаемая эффективность вакцины задавалась равной 70%), доля вакцинированного населения должна составлять 50% и более. Для натуральной оспы с $R_0 = 8$ без дополнительных мер противодействия эпидемия не способна развиваться лишь при условии вакцинации более 90% населения. (Подробнее о значениях R_0 см. «Описание инфекций» на сайте модели.)

Для оценки влияния уровня коллективного иммунитета на последствия эпидемий был спланирован и проведен следующий вычислительный эксперимент. Для моделируемых инфекций рассчитывали динамику эпидемий при массовом начальном инфицировании и разных уровнях коллективного иммунитета. Кроме вакцинации применялся ряд других интервенций – три уровня противоэпидемических мероприятий (ПЭМ1–3), определяющих скорость выявления и изоляции (наблюдения) инфицированных, контактных и подозрительных на заболевание лиц, карантин, лечение заболевших.

Эффективность мер противодействия определялась наличием либо отсутствием ресурсных ограничений. Задаваемый объем ресурсов соответствовал Новосибирской области (население – 2 762 237; доля городского населения – 78,7%; число медицинских работников, занятых в ликвидации эпидемии – 2130; мест строгой изоляции – 905; мест в изоляторах для контактных – 1060 [2, 3]).

В табл. 1 приведены результаты расчетов на сотый день развития эпидемии для случая, когда вакцинация проведена предварительно, и к началу эпидемии иммунитет полностью сформирован. Начальное число зараженных определялось дозой возбудителя, соответствующей инфицированию 500 человек в полностью не иммунной популяции. Эти инфицированные лица распределялись между иммунными и неиммунными пропорционально уровню коллективного иммунитета. Число инфицируемых снижалось в классе иммунных в силу их меньшей чувствительности к инфекции.

В первой строке каждой ячейки табл. 1 данные соответствуют наличию ресурсных ограничений, которые не снимаются ни при каких условиях, во второй – варианту, когда ограничения снимаются при полной мобилизации всех ресурсов.

Грипп и натуральная оспа оказываются весьма чувствительными к уровню коллективного иммунитета. При наличии других мер противодействия для оспы критическим оказывается повышение доли вакцинированных с 20 до 40%. Это приводит к снижению числа инфицированных в 50 раз. Для гриппа к сходному эффекту (снижение числа инфицированных почти в 20 раз) приводит увеличение доли вакцинированных с 0 до 20%. Ресурсов Новосибирской области недостаточно для борьбы с этими инфекциями при меньшей доле вакцинированных. Только при 60% иммунных в популяции эпидемия оспы ограничивается настолько, что недостаток ресурсов практически не проявляется. В случае гриппа аналогичная ситуация возникает при 40% иммунных.

Таблица 1.

Расчетное число инфицированных и число умерших для разных уровней коллективного иммунитета при профилактической массовой вакцинации

Возбудитель	Начальный уровень коллективного иммунитета, %					
	0	20	40	60	80	100
Оспа $R_0 = 8$	538891; 22276 4011; 481	120272; 5343 2702; 320	2302; 282 1740; 200	1065; 118 1048; 116	598; 59 598; 59	237; 12 237; 12
Грипп $R_0 = 1,5$	869927; 2585 166164; 469	47138; 138 39812; 116	16351; 49 16311; 48	3108; 9 3108; 9	759; 2 504; 1	117; 0 117; 0
БВВЭ $R_0 = 2$	986; 738 986; 738	759; 541 759; 541	565; 374 565; 374	419; 244 419; 244	273; 120 273; 120	164; 26 164; 26
БВВЭ(2)* $R_0 = 2$	4220; 2779 1284; 965	1562; 1143 929; 665	815; 553 647; 429	497; 293 453; 263	288; 125 281; 121	165; 22 166; 23

*Ситуация с БВВЭ в случае жесткого дефицита ресурсов.

Что же касается БВВЭ, результаты моделирования еще раз подтверждают, что ресурсов развитых стран достаточно, чтобы противостоять эпидемии. В условиях, когда число мест изоляции больных почти вдвое превышает число первично инфицированных, а система ПЭМ разворачивается оперативно, больные оказываются изолированными раньше, чем успевают инфицировать других. Таким образом, превентивная вакцинация населения городов России нецелесообразна.

Если искусственно создать дефицит ресурсов, уменьшив все их показатели в 10 раз, уровень коллективного иммунитета начинает играть гораздо более важную роль (см. последнюю строку табл. 1). С возрастанием охвата населения прививками на каждые 20%, число инфицированных и умерших сокращается в среднем в два раза. Недостаток ресурсов перестает сказываться только в случае, если вакцинируется более 80% населения.

Поскольку для БВВЭ стратегии вакцинации окончательно не отработаны, дополнительно оценивалась зависимость динамики эпидемии от сроков и охвата реактивной вакцинацией. Для сравнения аналогичные расчеты проводились для натуральной оспы при наличии ресурсных ограничений. В обоих случаях задавался начальный уровень коллективного иммунитета 10%.

Эффект реактивной вакцинации в случае БВВЭ для Новосибирской области весьма незначителен. В табл. 2 представлены уровни снижения числа жертв эпидемии за счет вакцинации в различных условиях. Видно, что даже если массовая иммунизация населения начинается сразу после появления больных со специфическими симптомами (11 день расчетов), разница в числе заболевших при нулевой и стопроцентной вакцинации не превышает 5%. Связано это, видимо, именно с отсутствием ресурсных ограничений. Последний случай инфицирования отмечался на 23 день расчетов, и таким образом, вакцинация просто не успевала оказать какое-либо влияние на ход эпидемии. Если искусственно создать дефицит ресурсов, уменьшив все их показатели в 10 раз, эпидемия не заканчивается за время расчетов и число инфицированных к моменту их окончания при нулевой и стопроцентной вакцинации различается более, чем вдвое. Таким образом, в случае жесткого дефицита прочих ресурсов, вакцинация может оказаться весьма полезной мерой для борьбы с эпидемией.

Таблица 2.

Снижение числа жертв эпидемии БВВЭ в Новосибирской области при стопроцентном охвате реактивной вакцинацией по сравнению с нулевым

Время формирования поствакцинального иммунитета	начало массовой вакцинации на 16 день расчетов		начало массовой вакцинации на 11 день	
	инфицировано	умерло	инфицировано	умерло
14 дней	Меньше на 0,8%	5%	2,5%	9,7%
7 дней	0,8%	5,2%	5%	10,4%

Эффект вакцинации, проводимой в ходе эпидемии в Новосибирской области, для натуральной оспы к сотому дню расчетов более выражен. Однако, как и ожидается, он оказывается менее значительным, чем в случае вакцинации превентивной. Даже если реактивная вакцинация начинается сразу после появления больных со специфическими симптомами, число инфицированных при стопроцентном охвате вакцинацией только в 6 раз меньше, чем при нулевом (48511 против 290592), тогда как в случае, если коллективный иммунитет сформирован заблаговременно, число инфицированных снижается в несколько тысяч раз (см. табл. 1).

Библиографический список

1. Бачинский А.Г., Низолenco Л.Ф. Универсальная модель локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций // Проблемы особо опасных инфекций – 2014. – №2. – С. 44–47.
2. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения Новосибирской области в 2012 году» [Электронный ресурс] режим доступа: <http://54.rosпотреbnadzor.ru/document/>.
3. Новосибирскстат. [Электронный ресурс] режим доступа: http://novosibstat.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_ts/novosibstat/ru/statistics/population/.

МОДЕЛЬНАЯ БИОСИСТЕМА «МЫШЬ АУТБРЕДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ICR ЦЕНТРАЛЬНОАФРИКАНСКИЙ ШТАММ V79-1-005 ВОО» ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ

**А.С. Овчинникова, Ал.А. Сергеев, Д.О. Галахова, К.А. Титова, Ар.А. Сергеев,
О.С. Таранов, Л.Е. Булычев, А.П. Агафонов, А.Н. Сергеев**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской области, Россия*

Многие исследователи используют различные виды животных в качестве модельных для оспы обезьян с целью оценки эффективности противооспенных препаратов: иммунодефицитных мышей [1, 3], сусликов [6, 8], чернохвостых луговых собачек [2, 4, 9], сонь Келлена [7] и приматов [5, 10]. Однако эти виды модельных животных имеют те или иные существенные недостатки с точки зрения возможности их выращивания в неволе, дороговизны, удобства и адекватности их применения.

Целью настоящих исследований явился поиск доступного модельного животного для оспы обезьян с целью оценки лечебно-профилактической эффективности разрабатываемых противооспенных препаратов.

В работе были использованы вирусологические, гистологические, электронно-микроскопические и статистические методы.

В результате проведенных экспериментальных исследований по интраназальному (и/н) заражению дозами 4,0–5,5 lg БОЕ (бляшкообразующая единица) вируса оспы обезьян (ВОО) мышей ICR, кроликов и мини-свиней были установлены лишь у мышей некоторые клинические признаки заболевания: гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти. 50%-ная инфицирующая доза (ИД₅₀) ВОО для этих животных, оцениваемая по наличию внешних клинических проявлений, составляла 4,8 lg БОЕ, а ИД₅₀, оцениваемая по наличию вируса в легких мышей через 7 сут после заражения (п/з) с учетом 10%-ной его аппликации в респираторном тракте животных, равна 1,4 lg БОЕ. При изучении динамики распространения ВОО в организме и/н зараженных мышей 25 ИД₅₀ (определенная по наличию вируса в легких мышей) было обнаружено максимальное накопление патогена в носовой полости, легких и головном мозге: 5,7±0,1; 5,5±0,1 и 5,3±0,3 lg БОЕ/мл соответственно. Основные гистологические изменения у и/н инфицированных ВОО мышей напоминали таковые у других модельных животных для оспы обезьян, но ограничивались в основном воспалительно-деструктивными изменениями в органах респираторного тракта. При проведении электронной микроскопии органов и тканей этих животных зарегистрированы факты присутствия и размножения патогена в традиционных для

ВОО первичных клетках мишенях (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах в органах респираторного тракта), а также в некоторых других клетках организма (эндотелиоцитах, ретикулярных клетках, клетках соединительной ткани). При изучении оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов на мышах, и/н инфицированных дозой 3,4 lg БОЕ (10 ID₅₀ рассчитанной по регистрации наличия вируса в легких) ВОО отмечено, что количество обработанных препаратами НИОХ14 (7-[N`-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) и ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[*f*]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид) аутбредных мышей с зарегистрированным содержанием ВОО в легких через 7 сут п.з. достоверно ниже, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Было установлено, что НИОХ-32 (Гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксibenзамид) значимо не отличался по этому признаку от контроля. При этом использование НИОХ-14 и ST-246 в одинаковых дозах не выявило существенных различий между этими препаратами по эффективности действия.

Таким образом, с применением мышей и центральноафриканского штамма V79-1-005 ВОО на примере трех химически синтезированных соединений (ST-246, НИОХ-14 и НИОХ-32) подтверждено наличие противовирусного эффекта, ранее отмеченного многими исследователями на других модельных биосистемах, что свидетельствует о возможности использования модельной биосистемы «мышь аутбредной популяции ICR \rightarrow центральноафриканский штамм V79-1-005 ВОО» для оценки защитного действия препаратов от оспы обезьян.

Библиографический список

1. Americo J.L., Moss B., Earl P.L. Identification of wild-derived inbred mouse strains highly susceptible to monkeypox virus infection for use as small animal models // J. Virol. – 2010. – Vol. 84, N 16. – P. 8172–8180.
2. Hutson C.L., Olson V.A., Carroll D.S. et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus // J. Gen. Virol. – 2009. – Vol. 90. – P. 323–333.
3. Hutson C.L., Abel J.A., Carroll D.S. et al. Comparison of West African and Congo Basin monkeypox viruses in BALB/c and C57BL/6 mice // J. Plos One. – 2010. – Vol. 5, N 1. – e8912.
4. Hutson C.L., Carroll D.S., Self J. et al. Dosage comparison of Congo Basin and West African strains of monkeypox virus using a prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease // Virology. – 2010. – Vol. 402. – P. 72–82.
5. Parker S., Handley L., Buller R.M. Therapeutic and prophylactic drugs to treat orthopoxvirus infection // Future Virol. – 2008. – Vol. 3. – P. 595–612.
6. Sbrana E., Xiao S.Y., Newman P.C., Tesh R.B. Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease // Amer. J. Trop. Med. Hygiene. – 2007. – Vol. 76, N 1. – P. 155–164.
7. Schultz D.A., Sagartz J.E., Huso D.L., Buller R.M. Experimental infection of an African dormouse (*Graphiurus kelleni*) with monkeypox virus // Virology. – 2009. – Vol. 383. – P. 86–92.
8. Tesh R.B., Watts D.M., Sbrana E. et al. Experimental infection of ground squirrels (*Spermophilus tridecemlineatus*) with monkeypox virus // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 1563–1567.
9. Xiao S.Y., Sbrana E., Watts D.M. et al. Experimental infection of prairie dogs with monkeypox virus // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 11. – P. 539–545.
10. Zaucha, G., Jahrling P.B., Geisbert T.W. et al. The pathology of experimental aerosolized monkeypox virus infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) // Lab. Invest. – 2001. – Vol. 81. – P. 1581–1600.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК ЭБОЛА И МАРБУРГ В МЕДИКО-САНИТАРНОЙ ЧАСТИ № 163 ФМБА РОССИИ

В.Г. Орловский, В.И. Кузубов, З.И. Гинько

*ФГБУЗ «Медико-санитарная часть №163 Федерального медико-биологического агентства»,
Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Геморрагические лихорадки Эбола и Марбург относятся к особо опасным вирусным инфекциям. Они известны карантинным и противоэпидемическим службам всех стран мира как заболевания с высоким уровнем летальности. Лихорадки эндемичны для стран Южной и Центральной Африки, однако заболевания возникали и в других странах в виде завозных единичных случаев и эпидемических вспышек (внутрибольничных и внутрилабораторных). Для России опасность возникновения ВГЛ связана не только с вероятностью заноса инфекции из эндемичных районов, но и с возможностью выноса вируса за пределы лабораторий при авариях или заражении персонала научных учреждений, выполняющих исследования с вирусами Эбола и Марбург.

В настоящее время не подлежит сомнению существенная роль иммунопрепаратов в активном подавлении фазы вирусемии при геморрагических лихорадках Эбола и Марбург. Возможность нейтрализации вирусов Эбола и Марбург специфическими гетерологичными иммуноглобулинами была показана при постановке *in vitro* реакции нейтрализации. Применение плазмы и сыворотки крови реконвалесцентов, а также гетерологичных иммуноглобулинов, полученных от иммунизированных животных, для профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Марбург в настоящее время является наиболее перспективным.

При испытаниях препаратов на добровольцах было показано, что однократное в/м (дробно, по Безредко) введение 6 мл гетерологичных иммуноглобулинов (лошадиных и козьих) не вызывало побочных реакций. Лошадиный и козий иммуноглобулины были рекомендованы Минздравом для экстренной профилактики и лечения сотрудников НИИ в случае их лабораторного инфицирования вирусами Эбола и Марбург.

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора занимается изучением геморрагических лихорадок Эбола и Марбург с конца 80-х годов и по настоящее время.

Медико-санитарная часть № 163 ФМБА России осуществляет медицинское сопровождение научных исследований в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (профилактические осмотры сотрудников, вакцинация, выявление и изоляция подозрительных на заболевание, обследование, лечение и т.д.)

С 1987 по 1994 гг. для профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Марбург в МСЧ № 163 использовался козий иммуноглобулин (разработка ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), после 1994 г. и по настоящее время используется лошадиный иммуноглобулин (разработка Вирусологического центра НИИ микробиологии Министерства обороны Российской Федерации).

За все время исследования геморрагических лихорадок Эбола и Марбург было 13 случаев аварийных ситуаций, которые потребовали введения гетерологичных иммуноглобулинов с целью профилактики и лечения. Иммуноглобулины вводились всегда по методу Безредко. Осложнений при первом введении иммуноглобулинов не было. При повторном введении (2 случая) отмечалась выраженная кожная реакция.

Выводы

1. Иммунные препараты крови человека, а также гетерологичные иммуноглобулины должны применяться для профилактики и лечения геморрагических лихорадок Эбола и Марбург.

2. Гетерологичные иммуноглобулины вводятся однократно по методу Безредко.

3. Эффективность от введения иммуноглобулинов зависит от времени введения препарата и величины инфицирующей дозы вируса.

ПРОТИВОВИРУСНОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SERRATIA*

Д.И. Пучкова, Ж.Б. Ибрагимова, Н.А. Мазуркова И.С. Андреева

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

В связи с широким распространением вирусных заболеваний, вызванных вирусами различной этиологии, в настоящее время особую актуальность имеет поиск средств противовирусной защиты с широким спектром действия против РНК- и ДНК-содержащих вирусов, углубленное изучение вирусных инфекций и создание препаратов, направленных на их подавление.

Известны данные об антивирусной активности панкреатической рибонуклеазы в отношении ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов, а также об их применении в клинике для лечения вирусных заболеваний. Рядом исследователей изучаются антивирусные свойства нуклеаз, выделенных из микроорганизмов, которые обладают более выраженными антивирусными свойствами, чем панкреатическая рибонуклеаза [1 – 3]. Известны сообщения об антивирусной, в частности антигриппозной, активности веществ, имеющих природное происхождение. Так, авторы И.Д. Макаренкова и др. сообщают о способности сульфатированного полисахарида – фукоидана из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* подавлять продукцию высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в течение 24 ч инфекции при профилактической и лечебно-профилактической схемах применения [4]. Показана противовирусная активность препаратов грибного происхождения [5]. В настоящее время нуклеазы из бактерий *Serratia marcescens* используют для лечения вирусных заболеваний [6].

Нами изучено несколько штаммов из рода *Serratia* на содержание метаболитов, обладающих противовирусной активностью широкого спектра действия.

Штаммы, использованные для получения противовирусного средства, изолированы из образцов донных осадков озера Байкал. Для поиска использовали метод высева на плотные среды, содержащие ДНК, и метод электрофореза в агарозном геле с использованием в качестве субстратов фаговых ДНК и РНК. Методом скрининга на селективных средах отобраны 4 штамма: Dg-91, Dg-98, Bp-868, Az-372, обладающие высокой нуклеазной активностью. Штаммы являются факультативными анаэробами, хорошо растут при температуре 30–37°C. Согласно результатам определения нуклеотидной последовательности 16S рРНК бактерии данной группы отнесены к роду *Serratia*. В результате изучения совокупных данных по фенотипическим и геномным признакам штаммы Dg-91, Dg-98, Bp-868, Az-372 были отнесены к виду *Serratia plymuthica*. Данные штаммы хранятся в «Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под регистрационными номерами: B-1288 (*Serratia plymuthica* Dg-91), B-1297 (*Serratia plymuthica* Dg-98), B-1296 (*Serratia plymuthica* Bp-868), B-1285 (*Serratia plymuthica* Az-372).

Данные штаммы были изучены нами на противовирусную активность в отношении вируса гриппа человека А/Aichi/2/68(H3N2) и гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) [7]. В качестве ДНК-содержащих вирусов в работе использовали ортопоксвирусы: вирус осповакцины (ВОВ, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей (ВОМ, штамм К-1), а также вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2, штамм MS), полученные из «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Концентрация вирусов на культуре клеток Vero по разным экспериментам составляла (4,4–5,5) lgТЦД₅₀/мл (50% тканевых цитоплазматических доз в мл).

Бактерии содержат метаболиты, обладающие противовирусной активностью в профилактической схеме в культуре клеток MDCK относительно вируса гриппа птиц А/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) и вируса гриппа человека А/Aichi/2/68(H3N2) (индексы нейтрализации *in vitro* составили 2,5–6,0 и 2,4–5,0 lg соответственно) [7].

Для тестирования токсичности и противовирусной эффективности бактериальных метаболитов относительно ортопоксвирусов и вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из «Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Противовирусная активность КЖ штаммов в культуре клеток Vero в отношении ДНК-содержащих вирусов

№ образца (препарата)	Штамм	Индекс нейтрализации вируса (ИН), Ig под действием КЖ штаммов		
		оспы мышей (ВОМ)	Осповакцины (ВОВ)	простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2)
11-47	Az 372	3,0	1,0	2,0
12-118	Dg 91	2,03	1,2	2,0
12-05	Dg-98	-	2,0	2,0
14-12	Bp-868	-	1,0	2,0
Титр вируса без препарата (контроль), Ig		4,60±0,10	4,47±0,03	5,31±0,19

Роспотребнадзора. Суспензию клеток с концентрацией 1×10^5 кл./мл питательной среды DMEM, содержащей 10%-ные сыворотки крови плодов коровы фирмы «Gibco», вносили в объеме 100 мкл/лунку 96-луночного планшета. Планшеты с клетками помещали в термостат на 4 суток до образования монослоя при температуре 37 °C, 5% CO₂ и 100% влажности.

Для анализа использовали культуральные жидкости (КЖ), полученные после культивирования штаммов в жидких средах LB или S [7].

Результаты анализа противовирусной активности КЖ штаммов представлены в таблице.

Таким образом, в процессе анализа ряда микроорганизмов на наличие метаболитов с антивирусными свойствами были выявлены бактериальные штаммы с противовирусной активностью в профилактической схеме анализа в отношении ДНК и РНК-содержащих вирусов: гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1), а также ДНК-содержащих: вируса оспы мышшей, вируса оспы мышшей и вируса простого герпеса 2-го типа. *Serratia plymuthica* Dg-91, и *Serratia plymuthica* Az-372, B-1285 обладают ингибирующей активностью против вируса гриппа птиц типа А и вирусов ВОМ и ВПГ-2. B-1297 обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа типа А и вирусов ВОВ и ВПГ-2. *Serratia plymuthica* Bp-868 обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа типа А и вируса ВПГ-2. Важно отметить, что при наличии эффективного противовирусного действия исследованные бактериальные штаммы обладают незначительной токсичностью относительно клеток MDCK и Vero.

Полученные результаты позволяют считать данные штаммы перспективными в целях разработки препаратов широкого спектра действия для профилактики и лечения вирусных заболеваний.

Библиографический список

1. Нуклеазы микроорганизмов / Под ред. А.М. Безбородова. – М: Наука, 1974. – 328 с.
2. Nucleases /ed. by S.M. Linn, R.J. Roberts. – Cold Spring Harbor, 1993. – 1982 p.
3. Иванов А. В, Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н. Препарат против бешенства. Патент РФ № 2420309, Бюл №16 от 10.06.2011 г.
4. Макаренко И.Д., Дерябин П.Г., Львов Д.К. и др. Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Laminaria japonica* в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (H5N1) // Вопр. вирусол. – 2010. – Т. 55, №1. – С. 41–45.
5. Разумов И.А., Косонова Т.А., Казачинская Е.В. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов // Антибиотики и Химиотерапия – 2010. – Т. 55, № 9–10. – С 56.
6. Детиненко Л. Д., Клименко В.П., Подгорный В.Ф., Аликин Ю.С «Средство "Эндоглоукин" для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляции развития пчелиных семей». Патент РФ № 2038776, опубл. 09.07.1995 г.
7. Пучкова Л.И., Афонина В.С., Андреева И.С., Селиванова М.А., Мазуркова Н.А., Макаревич Е.В. Штамм бактерий *Serratia plymuthica*, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А (его варианты). Патент № 2551316 RU Бюл. № 14 от 20.05.2015.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЛОБУЛЯРНОГО БЕЛКА *BACILLUS SUBTILIS* В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ЭПИТОПА ВИЧ-1, УЗНАВАЕМОГО ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМ АНТИТЕЛОМ 10E8

А.П. Рудометов¹, Н.Б. Андреева¹, А.Ю. Бакулина², Л.И. Карпенко¹, Д.Н. Щербаков¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, с начала эпидемии ВИЧ-инфекции почти 80 млн. человек заразилось ВИЧ-1, около половины из них погибли от оппортунистических заболеваний. Россия – одна из стран в мире, где число новых заражений ВИЧ-инфекцией и число смертей, связанных с ВИЧ/СПИД, продолжают возрастать. На 31 декабря 2015 г. в России официально зарегистрировано 1 006 388 ВИЧ-инфицированных [1].

В настоящее время основным средством сдерживания эпидемии ВИЧ является высоко активная антиретровирусная терапия (ВААРТ). ВААРТ не способна элиминировать ВИЧ-1 из организма больного, тем не менее в мире выделяются колоссальные финансовые ресурсы на обеспечение всех нуждающихся в ВААРТ, так как это позволяет снизить распространение вируса и продлить жизнь инфицированных ВИЧ-1.

Несмотря на активное изучение ВИЧ-1 до сих пор не разработана вакцина, которая бы защитила от заражения данным вирусом. Однако только разработка и внедрение эффективной вакцинации против ВИЧ-1 даст возможность остановить пандемию ВИЧ-1-инфекции.

В качестве доказательства возможности создания вакцины против ВИЧ-1 можно привести клинические испытания RV144 экспериментальной вакцины против этого вируса, проведенные в Таиланде. Эти испытания показали, что вакцинный препарат ALVAC HIV (vCP1521)/AIDSCAX B/E обеспечивал невысокий, но достоверный уровень защиты (31%). Полученные результаты свидетельствуют о том, что вакцину создать можно, но необходимо проводить работу над повышением ее эффективности.

Принцип действия любой вакцины заключается в формировании устойчивого иммунитета к инфекционному агенту. К сожалению, в случае вируса иммунного дефицита человека классические подходы по созданию вакцины (использование аттенуированного или инактивированного вируса) оказались неэффективны. В связи с этим на первый план выходят альтернативные технологии дизайна иммуногенов.

Одним из перспективных направлений в области разработки вакцин против ВИЧ-инфекции является создание иммуногена, способного воспроизводить стимулировать в организме образование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра первичных изолятов ВИЧ-1 (или bNabs – broadly neutralizing antibodies). bNabs были впервые обнаружены в сыворотках ВИЧ-инфицированных долгожителей (так называемых нон-прогрессоров), у которых в отсутствие применения ВААРТ длительное время не развивается состояние СПИДа [2].

Первым шагом в разработке таких иммуногенов является идентификация эпитопов bNabs. Они могут быть идентифицированы с использованием данных рентгеноструктурного анализа комплекса белков, кодируемых геном env (поверхностных гликопротеинов ВИЧ), в комплексе с bNabs [3, 4]. Помимо этого, в последнее время развиваются компьютерные методы для предсказания эпитопов, узнаваемых bNabs – в том числе нелинейных эпитопов, исходя из данных нейтрализующей активности. Успешность этого подхода была продемонстрирована при предсказании известных ключевых аминокислотных остатков нескольких эпитопов bNabs, а также ключевых аминокислотных остатков эпитопов двух недавно найденных bNabs (PGT 125-128, PGT 130), что впоследствии было подтверждено экспериментально [5].

После идентификации соответствующих антигенных детерминант ВИЧ-1 следует получение иммуногенов, несущих в своем составе эпитопы ВИЧ-1, либо их имитаторы, узнаваемые широконейтрализующими антителами. Это чрезвычайно трудно, так как эпитопы bNabs зачастую являются конформа-

ционными, т.е. представляют собой набор пространственно разобщенных аминокислотных остатков из различных участков вирусного белка, в совокупности формирующих антигенную детерминанту. Тем не менее при помощи компьютерных алгоритмов были спроектированы каркасные белки (или скаффолды), в составе которых эпитопы повторяли природное (нативное) расположение аминокислот вирусного эпитопа в пределах структуры поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1 [6, 7].

В работах последних лет показано, что иммуногены-скаффолды способны индуцировать выработку широконейтрализующих антител [7, 8]. Вполне вероятно, что несколько различных скаффолдов, экспонирующих один и тот же эпитоп, либо один скаффолд, несущий разные варианты одного и того же эпитопа, могут быть использованы в качестве набора иммуногенов для последовательной вакцинации. Мы предполагаем, что подобная стратегия позволит избежать смещения иммунного ответа на сам каркасный белок, а за счет набора перекрывающихся эпитопов сможет направить процесс аффинного созревания антител в сторону формирования bNabs [8].

В нашем исследовании был взят эпитоп, узнаваемый ВИЧ-1 нейтрализующим антителом 10E8. Это широконейтрализующее моноклональное антитело было описано в 2012 г., оно связывается с участком вирусного гликопротеина gp41, при этом не обладает аутореактивностью и не взаимодействует с фосфолипидами в отличие от других антител, связывающихся с этим участком. На панели из 180 псевдовирусов ВИЧ-1 было показано, что антитело 10E8 нейтрализует 98% существующих изолятов ВИЧ-1.

Опираясь на данные, опубликованные ранее Correia et al. и Ofek et al. [7, 9], можно предположить, что ключевым условием корректного иммунного ответа на последовательность включаемого эпитопа, должна быть полная или почти полная имитация его пространственной структуры. Поэтому первой частью работы стал подбор белка – носителя (скаффолда), способного обеспечить это условие. Для этого при помощи классификатора белковых структур SCOP был выбран небольшой глобулярный белок с известной структурой *B. subtilis* YkuJ, конформационная структура концевых участков которого наиболее близка к конформации нативного эпитопа 10E8 и позволяет включить одновременно два эпитопа bNab 10E8.

Структура эпитопа 10E8 определена рентгеноструктурным анализом [10]. С помощью пакета программ Swiss-PdbViewer по аналогии структуры белка YkuJ и эпитопа 10E8, была построена модель белка YkuJ-10E8. Данную конструкцию было решено назвать DNI (*double neutralizing immunogen*).

На компьютерной модели показано, что пространственное расположение включаемых эпитопов не препятствует одновременному связыванию двух Fab фрагментов антитела 10E8.

При проектировании нуклеотидной последовательности, кодирующей DNI, в ее состав были заложены две нуклеотидные последовательности эпитопа bNabs 10E8 по N- и C концам, фланкированные уникальными сайтами рестрикции для клонирования гена в составе плазмиды и возможности изменения нуклеотидной последовательности эпитопов.

Ген, кодирующий белок DNI, был синтезирован и клонирован в составе плазмиды pET21a.

Экспрессию гена, кодирующего белок DNI, оценивали с помощью электрофоретического разделения лизата клеток *E. coli* BL21/pDNI.

Для подтверждения того, что белок DNI связывается с МКА 10E8, проведен вестерн-блот анализ. Он подтвердил, что эпитопы 10E8 в составе белка DNI распознаются МКА 10E8.

Иммуноген был наработан в препаративном количестве и очищен для иммунизации мышей. Полученным препаратом белка DNI проведена иммунизация лабораторных животных (мышей линии BALB/c) по стандартной схеме. Через 10 дней после последней иммунизации проведен забор крови и получена сыворотка.

Иммуногенность рекомбинантного белка DNI определяли по специфической активности полученных сывороток в ИФА. Показано, что антитела из сывороток иммунизированных животных специфически взаимодействуют с рекомбинантным белком DNI.

В настоящее время проводится оценка способности иммунных сывороток нейтрализовать Env-псевдовirusы ВИЧ-1.

Библиографический список

1. Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом [Электронный ресурс] URL: <http://www.hivrussia.ru/> (дата обращения 20.05.2016)
2. McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Cellular immune responses to HIV // Nature. – 2001. – Vol. 410, N 6831. – P. 980–987.
3. Julien J.P., Cupo A., Sok D. et al. Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer // Science. – 2013. – Vol. 342, N 6165. – P. 1477–1483.
4. Zhou T., Georgiev I., Wu X. et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 // Science. – 2010. – Vol. 329, N 5993. – P. 811–817.
5. Ferguson A.L., Falkowska E., Walker L.M. et al. Computational prediction of broadly neutralizing HIV-1 antibody epitopes from neutralization activity data // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 12. – P. 1–16.
6. Azoitei M.L., Correia B.E., Ban Y.E. et al. Computation-guided backbone grafting of a discontinuous motif onto a protein scaffold // Science. – 2011. – Vol. 334, N 6054. – P. 373–376.
7. Correia B.E., Ban Y.E., Holmes M.A. et al. Computational design of epitope-scaffolds allows induction of antibodies specific for a poorly immunogenic HIV vaccine epitope // Structure. – 2010. – Vol. 18. – P. 1116–1126.
8. Rathore U., Kesavardhana S., Mallajosyula V.V. et al. Immunogen design for HIV-1 and influenza // Biochim Biophys Acta. – 2014. – Vol. 1844. – P. 1891–1906.
9. Ofek G., Guenaga F.J., Schief W.R. et al. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – Vol. 107. – P. 17880–17887.
10. Huang J., Ofek G., Laub L. et al. Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody // Nature. – 2012. – V. 491, N 7424. – P. 406–412.

МОДЕЛЬНЫЕ БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ОТ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ, ОСПЫ ОБЕЗЬЯН И ГРИППА ПТИЦ (А/Н5N1)

**Ар.А.Сергеев, А.С. Овчинникова, Ал.А. Сергеев, Д.О. Галахова, К.А. Титова,
О.С. Таранов, Л.Е Булычев, А.С. Кабанов, С.В. Маренникова, Л.Н. Шишкина,
А.П. Агафонов, А.Н. Сергеев**

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Борьба с респираторными инфекциями, в частности вызванными патогенными ортопоксвирусами (вирусы натуральной оспы и оспы обезьян – ВНО и ВОО соответственно) и высокопатогенным вирусом гриппа птиц (в/пат ВГП) А/Н5N1, является одной из приоритетных задач здравоохранения в мире [1, 2]. Успех в противостоянии таким заболеваниям зависит от эффективности разрабатываемых препаратов, для комплексной оценки которой созданы различные биосистемы на основе модельных животных [3 – 6]. В то же время, несмотря на выраженную лечебную и профилактическую активность таких препаратов, полученную при исследовании с использованием существующих модельных биосистем, в ряде случаев они оказываются слабо эффективными при применении на людях [7]. Данное несоответствие связано с отсутствием подходов к оценке прогнозной эффективности модельных биосистем при их разработке. С целью создания адекватных модельных биосистем, позволяющих с высокой точностью прогнозировать для человека эффективность препаратов от инфекционных заболеваний, необходимо разработать комплексную систему оценки их критических характеристик, по которым важно иметь сходство при изучении взаимоотношения двух пар: патоген – вид модельного животного и патоген – человек.

Цель настоящих исследований – разработка для оценки защитной активности препаратов от натуральной оспы, оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1) модельных биосистем, имеющих по крити-

ческим характеристикам сходство с теми, которые наблюдаются в процессе взаимоотношения между соответствующим патогеном и человеком.

В работе были использованы вирусологические, культуральные, гистологические, электронно-микроскопические и статистические методы.

В результате проведенных исследований модельных биосистем: «степной сурок штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь популяции ICR штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь популяции ICR штамм Ind-3a ВНО», «аутбредная мышь популяции ICR российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1» установили наличие у них сходства по критическим характеристикам с теми, которые наблюдаются в процессе взаимоотношения между соответствующим патогеном и человеком.

Учитывая то, что на территории России не было ни одного случая оспы обезьян среди людей и животных, в качестве возбудителя этого заболевания для двух модельных биосистем был использован известный центральноафриканский штамм V79-1-005 ВОО, обладающий (широко признано) более высокой вирулентностью для людей (летальность до 17%), чем западноафриканские штаммы этого вируса (летальность менее 1%), и имеющий высокую инфекционную активность в отношении мышей и сурков в экспериментах *in vivo*: 2,4 (2,0–2,8) и 2,2 (1,0–3,4) lg БОЕ соответственно. Для модельной биосистемы, сориентированной на оценку защитной эффективности препаратов от натуральной оспы, был взят штамм Ind-3a ВНО, который продемонстрировал высокую инфекционность в экспериментах *in vitro* на человеческих первичных клетках-мишенях моноцитах-макрофагах крови ($CI_{D_{50}} = 0,0$ (-0,1–0,2) lg БОЕ и рассчитанная при этом для людей прогнозная величина $ID_{50} = 1,0$ (0,6–1,4) lg БОЕ), а также в экспериментах *in vivo* для мышей (с учетом 10%-ной аппликации этого вируса в легких при интраназальном способе заражения): 1,7 (1,3–2,1) lg БОЕ. Выбор данного штамма для таких исследований был также основан на том, что он был выделен от больного человека в Азии, где располагается большая часть территории России, во время последней эпидемии натуральной оспы (60–70-е годы прошлого столетия) и также имеется в коллекции двух официально существующих в мире (в России и США) Сотрудничающих центров ВОЗ по изучению ВНО. В качестве возбудителя гриппа птиц (А/Н5N1) для соответствующей модельной биосистемы был использован известный российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1, который по прогнозным данным, полученным на основе экспериментов *in vitro* (первичные клетки легкого человека), обладал высокой инфекционной активностью для человека, $ID_{50} = -2,4$ (-2,8–-2,0) lg ЭИД₅₀, и имел самый высокий из восьми исследованных российских штаммов этого вируса показатель вирулентности для мышей при и/н инфицировании: $LD_{50} = -0,9$ (-1,2– -0,6) lg ЭИД₅₀ с учетом 1%-ной аппликации вируса в легких при данном способе заражения. Более того, этот вид животных по такой чувствительности к штамму A/Chicken/Kurgan/05/2005 в/пат ВГП А/Н5N1 не уступал человеку, у которого $ID_{50} \geq -1,4$ (1,0– -1,8) lg ЭИД₅₀ оценена по клиническим признакам заболевания с учетом того, что симптоматика заболевания у инфицированных людей наблюдается только в $\leq 10\%$ случаев.

Взятые для соответствующих модельных биосистем животные (мыши и сурки), при респираторном заражении проявляющие близкую к человеку чувствительность к ВНО, ВОО и в/пат ВГП А/Н5N1, определенную нами экспериментальным и теоретическим путями, можно разделить на 4 категории по основным показателям течения у них инфекционного процесса, вызванного этими возбудителями при и/н заражении:

1) степные сурки при оспе обезьян, которые максимально правдоподобно воспроизводят основную внешнюю клиническую картину заболевания, в том числе летальный эффект, и генерализованный инфекционный процесс у человека или признанных модельных животных, включающий в себя три этапа распространения патогена от органов и клеток-мишеней дыхательного тракта до экстрареспираторных, в том числе систему его доставки, а также патоморфологические изменения в органах и тканях;

2) мыши при гриппе птиц (А/Н5N1), которые воспроизводят частично внешнюю клиническую картину заболевания и генерализованный инфекционный процесс у человека или признанных модельных животных, включающий в себя три этапа распространения патогена от органов и клеток-мишеней дыхательного тракта до экстрареспираторных, в том числе систему его доставки, а также патоморфологические изменения в органах и тканях;

3) мыши при оспе обезьян, которые воспроизводят без внешней клинической картины заболевания генерализованный инфекционный процесс у человека или признанных модельных животных в

части, касающейся первого этапа распространения патогена и частично второго и третьего, включая типы клеток-мишеней, а также патоморфологические изменения в основном в первичных органах-мишенях;

4) мыши при натуральной оспе, которые воспроизводят без внешней клинической картины заболевания инфекционный процесс у человека или признанного модельного животного (*M. fascicularis*) в части, касающейся первого этапа распространения патогена, включая типы первичных клеток-мишеней, а также патоморфологические изменения в первичных органах-мишенях.

В этом смысле сурки, относящиеся к первой категории, могут быть применены в экспериментах с ВОО как для оценки как профилактической (экстренно-профилактической), так и лечебной эффективности препаратов. Мыши могут быть также с успехом использованы для тех же целей, но только в экспериментах с в/пат ВГП А/Н5N1. В то же время данная популяция мышей имеет все основания для участия в экспериментах с ВОО по изучению профилактической (экстренно-профилактической) и лечебно-профилактической активности исследуемых препаратов, а также в экспериментах с ВНО по изучению профилактической (экстренно-профилактической) эффективности средств медицинского назначения. Проведенные исследования с использованием модельных животных (сурки и мыши), а также ВНО (штамм Ind-3a), ВОО (ц/афр штамм V79-1-005 ВОО) и в/пат ВГП А/Н5N1 (российский штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) для оценки эффективности противооспенного и антигриппозного препаратов (ST-246 и Тамифлю соответственно) убедительно продемонстрировали реальную возможность их применения с этой целью.

Таким образом, разработанные модельные биосистемы «степной сурок штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь популяции ICR штамм V79-1-005 ВОО», «аутбредная мышь популяции ICR штамм Ind-3a ВНО», «аутбредная мышь популяции ICR российский в/пат штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005 ВГП А/Н5N1» обладали высокой степенью сходства по критическим характеристикам с теми, которые наблюдаются в процессе взаимоотношения между соответствующим патогеном и человеком. Испытание данных биосистем продемонстрировало их работоспособность на препаратах с известной противооспенной и противогриппозной активностью и возможность их дальнейшего использования для оценки защитной эффективности разрабатываемых средств медицинского применения от натуральной оспы, оспы обезьян и гриппа птиц (А/Н5N1).

Библиографический список

1. Boone S.A., Gerba C.P. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73, N 6. – P. 1687-1696.
2. The infection potential in the domestic setting and the role of hygiene practice in reducing infection/ International Scientific Forum on Home Hygiene, 2002. Available from: <http://www.ifh-homehygiene.org/2003/2library/2lbr00.asp#IFHCONSENSUSPUBLICATIONS>.
3. Bouvier N.M., Lowen A.C. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – P. 1530–1563.
4. Haga T., Horimoto T. Animal models to study influenza virus pathogenesis and control // Open Antimicrob. Agents J. – 2010. – Vol. 2. – P. 15-21.
5. Hutson, C.L., Damon I.K. Monkeypox virus infections in small animal models for evaluation of anti-poxvirus agents // Viruses. – 2010. Vol. 2. – P. 2763–2776.
6. Huggins J., Goff A., Hensley L. et al. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246 // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. – Vol. 53, N 6. – P. 2620–2625.
7. WHO. Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses Revised February 2010 Part II Review of evidence. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_guidelines_pharmaceutical_mngt_part2.pdf

ВЫСШИЕ ГРИБЫ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Т.В. Теплякова, Т.Н. Ильичева, Т.А. Косогова, Г.Г. Ананько

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

С угрозой распространяющихся вирусных инфекций необходимо создание новых эффективных препаратов для защиты людей от вирусов гриппа, иммунодефицита человека, и др. В связи с этим поиск и изучение природных малотоксичных веществ, в том числе из грибов, проявляющих противовирусную активность в отношении РНК и ДНК-содержащих вирусов, является крайне важной и актуальной задачей.

В последние десятилетия возрос научный интерес к высшим грибам, как источнику полисахаридов и полисахарид-протеиновых комплексов, обладающих противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью, установленной японскими учеными [1]. После открытия противоопухолевых соединений стало известно, что противоопухолевые препараты на основе грибов проявляют также и противовирусную активность [2].

Грибы содержат многие другие биологически активные высокомолекулярные и низкомолекулярные соединения (тритерпены, алкалоиды, полипептиды, стеролы, пигменты и др.) не только в плодовых телах, но и в культивируемом мицелии, а также культуральной жидкости, что делает их перспективными для создания фармацевтических продуктов на основе биотехнологии [3].

Результаты скрининга на противовирусную активность образцов из плодовых тел и мицелия грибов, выделенных впервые в чистую культуру из местообитаний Западной Сибири, показали, что водные экстракты из плодовых тел и глубинного мицелия подавляют размножение в культурах клеток вируса иммунодефицита человека 1 типа, вируса простого герпеса 2 типа, вируса Западного Нила, ортопоксвирусов (вируса натуральной оспы, вируса осповакцины, вируса оспы обезьян), вируса гриппа разных субтипов. Результаты коллективной работы по выделению грибов и оценке их противовирусной активности представлены в 60 опубликованных статьях и тезисах, 4-х патентах и в монографии [4]. В настоящее время коллекция лаборатории микологии насчитывает 132 штамма высших грибов из 60 видов, являющихся продуцентами многих биологически активных соединений, которые могут быть получены биотехнологическим способом на основе глубинного или твердофазного культивирования наиболее эффективных штаммов.

По результатам скрининга экстрактов из базидиальных грибов на противовирусный эффект было установлено, что гриб чага *Inonotus obliquus* обладает самым широким спектром противовирусной активности, что связано с присутствием в чаге сложного хромоген-полифенолоксикарбонового комплекса (ПФК), в который входят пигмент меланин, гуминовые кислоты, терпеноиды, стеролы и др. [5].

Эффективность водного экстракта из природной чаги и биомассы гриба на основе глубинного мицелия была показана на культурах клеток в отношении вируса иммунодефицита человека 1 типа [6, 7]; вируса гриппа (H5N1) [8]; вируса натуральной оспы и вируса осповакцины [9]; вируса простого герпеса 2 типа [10].

Гриб с 1959 г. введен в Фармакопею СССР как общеукрепляющее и противоопухолевое средство. В аптечную сеть чага поступает в виде измельченного природного сырья. На основе этого же сырья с 1968 г. (ОАО Татхимфармпрепараты и др.) производят препарат Бефунгин. Поскольку природные ресурсы чаги не безграничны, важным является изучение возможности разработки препаратов на основе биотехнологии штаммов *I. obliquus*, выделенных в культуру.

Одним из соединений, содержащихся в чаге, является пигмент меланин, который считается таким же жизненно-важным фактором клеточного гомеостаза, как белки и ДНК. Установлено, что меланины грибов обладают фото- и радиопротекторным, антиоксидантным и генопротекторным свойствами [5, 11] Меланин, выделенный нами ранее из природной чаги, проявлял противовирусную активность

в отношении вирусов гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005(H5N1) и человека A/Aichi/2/68(H3N2), а также простого герпеса 2 типа, ВИЧ-1, осповакцины [12].

Для получения меланина биотехнологическим способом на основе сравнительной оценки по эффективности и продуктивности был отобран штамм *I. obliquus* F-1244, для которого были подобраны питательная среда и условия культивирования, позволяющие получать в условиях биореактора 22,3 г/л сухой биомассы и 4–5 г меланина (20% от биомассы сухого мицелия). Разработан лабораторный регламент на получение меланина на основе депонированного в Коллекции ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора штамма чаги F-1244.

Учитывая актуальность защиты населения от вируса гриппа, особенно пандемических штаммов, были проведены исследования, которые показали, что при низкой токсичности меланин, полученный на основе глубокой культуры чаги, проявляет противовирусный эффект в отношении вируса гриппа (штамм A/California/07/09(H1N1pdm09), $IC_{50}=9,8$ мкг/мл, $IS=32$). Это согласуется с результатами, полученными ранее, в которых было показано, что водный экстракт из природной чаги, содержащий меланин, подавляет размножение пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009(H1N1)v в культуре клеток MDCK и в легких инфицированных мышей [13].

Таким образом, экстракты из чаги, а также меланин оказывают профилактическое и лечебное действие в отношении вирусов, вызывающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей, включая вирус гриппа птиц и вирус пандемического гриппа. В настоящее время проводятся эксперименты по созданию на основе меланина препарата защитного действия от вирусов гриппа в виде мази или спрея для носа. В периоды распространения инфекций население может использовать дополнительно отвары на основе природной чаги, имеющейся в аптечной сети.

Поскольку препараты на основе чаги также эффективны против вирусов иммунодефицита человека и герпеса, они могут использоваться в сочетании с химиотерапевтическими препаратами. Повышение иммунитета является важным для ВИЧ-инфицированных людей. Учитывая длительность лечения людей с ВИЧ-инфекцией, необходимо вместе с антиретровирусными препаратами использовать препараты на основе грибов, в частности чаги.

Однако, если водный раствор чаги и меланина в опытах на мышах имеет низкую токсичность, то препарат из чаги Бефунгин, содержащий в своем составе соли кобальта, при длительном применении может вызвать кобальтовую интоксикацию и развитие некротизирующей кардиопатии, что было установлено при заболеваемости жителей Канады и США, употреблявших длительное время пиво определенных марок, содержащих соли кобальта [14]. Позднее было показано, что развитие инфарктоподобных очагов в миокарде крыс, наблюдаемое после внутрибрюшинного введения хлористого кобальта (30 мг/кг), связано с метаболическими (токсическими) и ишемическими повреждениями миокардиальных клеток [15].

Эксперимент с Бефунгином, проведенный нами на мышах, также выявил в различных отделах сердца обширные зоны дистрофически измененных кардиомиоцитов, которые способны вызывать клинически значимые нарушения сократительной функции миокарда [4, 16]. Напрашивается вывод, что необходимо отказаться от добавления солей кобальта в экстракт природной чаги, получаемый в условиях фармацевтических предприятий.

Библиографический список

1. Ikekawa T., Nakanishi M., Uehara N. et al. Anti-tumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus* // Jap. J. Cancer Res. – 1968. – Vol. 59. – P. 155–157.
2. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review) // Int. J. of Med. Mushrooms. – 1999. – Vol. 1. – P. 31–62.
3. Вассер С.П. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы // Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера». – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 238–248.
4. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. – Новосибирск, 2014. – 298 с.
5. Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. Получение и использование в медицине меланинов из трутовых грибов // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т. 6. – С. 255–259.
6. Теплякова Т.В., Гашникова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А. Ингибитор репродукции

вируса иммунодефицита человека 1 типа: пат. 2375073 С1 Рос. Федерация. № 2008124179/15; заявл. 11.06.2008; опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34. 14 с.

7.Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогонова М.П. и др. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека // Вопр. вирусол. – 2015. – Т. 60, № 2. – С. 35–38.

8.Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н. и др. Изучение противовирусной активности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов вируса гриппа разных субтипов // Журн. микробиол. – 2011. – № 1. – С. 40–43.

9.Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А. и др. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 3 (113). – С. 99–101.

10.Разумов И.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И. и др. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 58, № 9–10. – С. 8–12.

11.Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. – М: Наука, 1981. – 274 с.

12.Теплякова Т.В., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Булычев Л.Е., Шишкина Л.Н., Мазуркова Н.А., Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Кабанов А.С., Казачинская Е.И., Афонова В.С. Противовирусное средство на основе меланина: пат. 2480227 С2 Рос. Федерация. № 2011127305/15; заявл. 01.07.2011; опубл. 27.04.2013, Бюл. № 12. – 11 с.

13.Филиппова Е.И., Мазуркова Н.А., Кабанов А.С. и др. Противовирусные свойства водных экстрактов, выделенных из высших базидиомицетов, в отношении пандемического вируса гриппа А(Н1N1)2009 // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2; URL: www.science-education.ru/108-8920 (дата обращения: 16.07.2013).

14.Roma J. Cardiac adaptation to insult // Metabolism and Disease. – Ottawa, Canada, 1971. – P. 70.

15.Семенова Л.А., Мартынюк Р.А., Марцинович В.П. Острые повреждения миокарда крыс, вызванные однократным введением хлористого кобальта // COR WASA, Ed. ross. – 1975. – V. 17. – № 2. – P. 146–151.

16.Теплякова Т.В., Казачинская Е.И., Рябчикова Е.И. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и некоторых препаратов из гриба чага (*Inonotus obliquus*) в отношении вируса простого герпеса 2 типа // Современная микология в России. Том 3. Материалы 3-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2012. – С. 418–419.

РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА «ЭНЦЕМАБ», СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

**Н.В. Тикунова¹, А.Л. Матвеев¹, И.К. Байков¹, Я.А. Хлусевич¹, О.В. Стронин²,
Д.А. Бондаренко³, А.Н. Мурашев³**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск; ²Филиал ФГПУ НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации НПО «Вирион», Томск; ³ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал), Пушкино Московской обл., Россия

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), представитель семейства *Flaviviridae*, является высокопатогенным для человека вирусным агентом, способным вызывать заболевание, приводящее к серьезным поражениям нервной системы [1]. В настоящее время для этиотропной терапии клещевого энцефалита применяют в основном сывороточный иммуноглобулин, получаемый из плазмы крови доноров, проживающих в природных очагах заболевания [2]. Этот препарат обладает терапевтическим эффектом особенно при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания, причем введение препарата в 1–2 день после укуса обеспечивает значительно больший лечебный эффект, чем введение в последующие дни. Вместе с тем препарат обладает определенными недостатками, к основным из них можно отнести

высокую стоимость, его дефицит и возможный биологический риск при его применении, связанный с потенциальным наличием в препарате не идентифицированных вирусных агентов, прионов и анормальных антител.

С целью создания альтернативного препарата ранее было сконструировано оригинальное гуманизированное антитело против гликопротеина Е ВКЭ [3]. Сродство сконструированного антитела ch14D5 к белку Е ВКЭ составило $2,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$; индекс нейтрализации (IC₅₀) в экспериментах *in vitro* при 50%-ном ингибировании инфекционности вируса для антитела ch14D5 составил $0,043 \pm 0,028 \text{ мкг/мл}$; степень гуманизации – 98,2%. В экспериментах *in vivo* было показано, что антитело ch14D5 в дозировке 1 мг/кг веса мыши обеспечивало 100%-ную защиту мышей, предварительно инфицированных 240 РЛД₅₀ ВКЭ. На основе суспензионной культуры эукариотических клеток CHO-S был создан стабильный штамм-продуцент гуманизированного антитела ch14D5.

На основе гуманизированного антитела ch14D5 был разработан препарат «Энцемаб», в 1 мл которого титр антител к ВКЭ в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) не менее 1:320 при белковой нагрузке от 2 до 2,1 мг/мл, в то время как коммерческий аналог «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» обеспечивает титр в РТГА лишь не менее 1:80 при белковой нагрузке от 100 до 160 мг/мл.

В ходе проведения доклинических исследований была разработана лабораторная технология получения лекарственного средства, проведено исследование его физико-химических свойств, определены методы контроля качества, составлен Лабораторный регламент и соответствующая Фармакопейная статья лекарственного средства.

С использованием периферийной мышинной модели клещевого энцефалита, разработанной ранее [4], продемонстрировано, что препарат «Энцемаб» обладает специфической противовирусной активностью, существенно превышающей таковую у препарата сравнения – «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита». Проведено исследование способов введения Энцемаба и показано, что препарат более эффективен при внутримышечном введении мышам, инфицированным 200 РЛД₅₀ ВКЭ. Поскольку разработанный препарат на основе гуманизированного антитела против ВКЭ, как и имеющийся коммерческий аналог на основе сывороточных антител, потенциально может быть использован как для экстренной профилактики так и для лечения клещевого энцефалита, была проведена оценка терапевтических свойств Энцемаба. Для этого препарат вводили внутримышечно в дозировках 90 мкг/мышь и 10 мкг/мышь через 1, 2, 3 и 4 суток мышам BALB/c весом 10 г, зараженным внутривенно ВКЭ в дозе ~ 158,5 РЛД₅₀. Исследования показали, что и при введении препарата через 3 суток после инфекции в дозировке 90 мкг/мышь наблюдается терапевтический эффект, даже при такой высокой инфицирующей дозе.

Исследование фармакокинетики было проведено на лабораторных мышах в 1-камерной и 2-камерной моделях. Было показано, что при внутривенном способе введения лекарственного средства (1-камерная модель) период полувыведения составляет $T_{1/2} = 33,85 \pm 3,21 \text{ ч}$, клиренс варьирует от 0,075 до 0,265 мл/ч, среднее время удержания препарата сывороткой крови – 48,85 ч. При внутримышечном способе введения (2-камерная модель) максимальная концентрация лекарственного средства в сыворотке крови достигается через 23 ч после введения, величина максимальной концентрации составила $0,831 \pm 0,011$, период полувыведения составляет $T_{1/2} = 56 \text{ ч}$, клиренс – 0,186 мл/ч, среднее время удержания препарата сывороткой крови – 47,62 ч, абсолютная биодоступность – 95%.

Исследование острой токсичности лекарственного средства на мышах показало, что при однократном и внутримышечном, и внутривенном введении в сравнении с препаратом «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» тестируемый препарат является безопасным в диапазоне изучаемых доз. Исследование хронической токсичности лекарственного средства на крысах показало, что при многократном внутримышечном и внутривенном введении в сравнении с препаратом «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита» тестируемый препарат является безопасным в диапазоне изучаемых доз. В целом было показано, что тестируемое лекарственное средство при всех типах введения было безопасным в диапазоне изучаемых доз, превысивших более чем в 100 раз предполагаемую дозировку для человека в случае острой токсичности.

Изучение иммунотоксических свойств препарата «Энцемаб» показало, что препарат не вызывает изменений иммунитета, выявляемых по уровню титра антител у экспериментальных животных и по

влиянию на лимфоидные органы. Введение Энцемаба в различных концентрациях не сопровождалось изменениями индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в экспериментальных группах в сравнении с контрольной, не сопровождалось изменениями фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и не вызывало кожной анафилаксии у морских свинок. Следовательно, можно полагать, что препарат «Энцемаб» обладает иммунологической безопасностью.

Существуют опасения, что введение терапевтических антител, обеспечивающее пассивную иммунизацию, способно вызвать антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE) [5, 6]. Полагают, что ADE связан с суб-нейтрализующей концентрацией протективных либо наличием непротективных антител в препарате [7, 8]. Чтобы оценить, способно ли антитело ch14D5a вызывать антителозависимое усиление инфекции, была определена и исследована субнейтрализующая дозировка гуманизированного антитела (0,4 – 0,5 мкг/мышь). Введение мышам антитела в этой дозировке не защищало животных от летальных доз ВКЭ. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано отсутствие антитело-зависимого усиления инфекции (ADE) у модельных животных при введении субнейтрализующих доз разработанного лекарственного средства.

Таким образом, может быть сделано заключение о том, что препарат «Энцемаб» обладает высокой противовирусной активностью *in vivo* в отношении вируса клещевого энцефалита, не оказывает токсического эффекта, является безопасным и может быть рекомендован для проведения клинических испытаний.

Библиографический список

1. Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 4301–4306.
2. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (Обзор полувекового опыта) // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2010. – № 1. – С. 53–59.
3. Baykov I., Matveev A., Stronin O. et al. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – P. 3589–3594.
4. Тимофеев А.В., Кондратьева Ю.Ю., Карганова Г.Г., Стефенсон Дж. Протективная активность бактериальной плазмиды, несущей ген неструктурного белка NS1 вируса клещевого энцефалита // *Вопр. вирусол.* – 2001. – Т. 46, № 1. – С. 22–24.
5. Aebi C., Schaad U.B. TBE-immunoglobulins – a critical assessment of efficacy // *Schweiz Med Wochenschr.* – 1994. – Vol. 124, N 42. – P. 1837–1840.
6. Kluger G., Schöttler A., Waldvogel K. et al. Tickborne encephalitis despite specific immunoglobulin prophylaxis // *Lancet*. – 1995. – Vol. 346, N 8988. – P.1502.
7. Bröker M., Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virusendemic area: current positions about post-exposure treatment // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, N 7. – P.863–868.
8. Huisman W., Martina B.E., Rimmelzwaan G.F. et al. Vaccine-induced enhancement of viral infections // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27, N 4. – P. 505–512.

РАЗРАБОТКА БИОСИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЫШЕЙ ICR

**К.А. Титова, Ал.А. Сергеев, А.С. Кабанов, Л.Е. Булычев, Ар.А. Сергеев, Д.О. Галахова,
А.С. Овчинникова, Л.Н. Шишкина, О.С. Таранов, А.П. Агафонов, А.Н. Сергеев**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

В настоящее время в качестве модельного животного для натуральной оспы при оценке эффективности противовирусных препаратов используются лишь приматы: макаки циномогус [1–3]. Однако широкое использование данного вида модельного животного в вирусологических исследованиях проблематично, что связано с их высокой стоимостью, трудоемкостью в содержании, связанной с обе-

спечением надлежащих принципов гуманного обращения с приматами и предупреждения возможных биорисков.

В связи с этим целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования аутбредных мышей популяции ICR в качестве модельных животных для натуральной оспы (НО) применительно к оценке лечебно-профилактической эффективности противооспенных препаратов.

Интраназальное (и/н) введение аутбредным 8–14-суточным мышам популяции ICR (массой 8–10 г) вируса натуральной оспы (ВНО) даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ, не вызвало появления каких-либо внешних клинических признаков заболевания. В связи с этим в экспериментах, касающихся определения показателя чувствительности мышей к ВНО по наличию инфекционного процесса, провели изучение динамики накопления вируса в легких животных, и/н зараженных вирусом в дозе 4,2 lg БОЕ. Отмечено накопление патогена в легких мышей через 25 сут п.з. с максимальным значением этого показателя через 2 и 3 сут п.з., которое составило 4,8 lg БОЕ.

Определено значение показателя ИД₅₀, рассчитанного с учетом данных о наличии вируса в легких каждого животного через 3 сут п.з., которая составила: 2,7±0,4 lg БОЕ. Однако с учетом того, что в легких апплицируется только 10% вирусосодержащего материала, введенного и/н способом [4], ИД₅₀ ВНО для мышей в нашем случае должна быть существенно ниже (на 1,0 lg) и составить 1,7±0,4 lg БОЕ. Это свидетельствует об относительно высокой чувствительности данного вида животных к ВНО, оцененной только с учетом развития инфекционного процесса и приближающейся к таковой у человека (1,0 lg жизнеспособных вирусных частиц, БОЕ), определенной с учетом развития клинической картины заболевания [4].

Проведено изучение диссеминации ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей после и/н инфицирования 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀). Результаты показали, что первичными и практически единственными органами (тканями) размножения вируса у мышей являются легкие и слизистая носа с максимальным уровнем накопления вируса 4,9 и 4,8 lg БОЕ/мл соответственно.

При проведении гистологических и электронно-микроскопических исследований и/н инфицированных ВНО мышей в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀) было отмечено, что основные патоморфологические изменения у этих животных начинали появляться через 5 сут п.з. и были ограничены респираторным трактом (воспалительные и деструктивные очаги в легких, трахее и слизистой носа). Отмечен факт присутствия и размножения ВНО в традиционных первичных клетках мишенях для этого патогена: в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах.

Была проведена оценка эффективности действия противооспенных препаратов ST-246 и НИОХ-14 при их пероральном введении 1 раз в день в дозе 60 мкг/г массы мыши за 1 сут до заражения, в день заражения и далее в течение 2 сут п.з., по показателям изменения продукции вируса в их легких через 3 сут после и/н заражения ВНО в дозе 30 ИД₅₀/гол. Препараты ST-246 и НИОХ-14, полученные методом химического синтеза, ранее продемонстрировали выраженную противооспенную активность на культурах клеток и других видах животных [5–7]. Отмечено, что количество инфицированных мышей, обработанных препаратами ST-246 и НИОХ-14 и зараженных ВНО, через 3 сут п.з., достоверно ниже, чем в контроле (при $p \leq 0,05$).

Таким образом, при и/н заражении ВНО аутбредных мышей популяции ICR даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ, не было обнаружено клинических признаков заболевания. ИД₅₀ ВНО для животных, оцениваемая по регистрации наличия вируса в их легких через 3 сут п.з. с учетом 10%-ной аппликации в них вводимого и/н вируса, была равна 1,7 lg БОЕ и близка к таковой у человека, оцениваемой по развитию клинических проявлений заболевания. Первичными и практически единственными органами (тканями) размножения вируса у мышей, и/н зараженных мышей 30 ИД₅₀ ВНО, являются легкие и слизистая носа с максимальным уровнем накопления вируса 4,9 и 4,8 lg БОЕ/мл соответственно. При этом у мышей, как и у человека, были зарегистрированы сходные патоморфологические изменения в органах респираторного тракта и первичные клетки мишени для ВНО (клетки системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоциты). Использование аутбредных мышей популяции ICR при оценке противовирусной эффективности препаратов НИОХ-14 и ST-246 продемонстрировало адекватность полученных результатов таковым, описанным в научной литературе, что открывает перспективу их применения в качестве модельных животных для НО с целью изучения профилактической активности препаратов.

Библиографический список

1. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J. et al. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. Vol. 101, N 42. P. 15197–15200.
2. Huggins J., Goff A., Hensley L. et al. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246 // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N 6. – P. 2620–2625.
3. Chapman J.L., Nichols D.K., Martinez M.J., Raymond J.W. Animal models of Orthopoxvirus infection // Veterinary Pathology. – 2010. – Vol. 47, N 5. – P. 852–870.
4. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. – М.: Медицина; 1987. – 255 с.
5. Булычев Л.Е., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С. и др. Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2012. – Т. 20. – С. 102–105.
6. Jordan R., Goff A., Frimm A. et al. ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N 5. – P. 1817–1822.
7. Stabenow J., Buller R.M., Schriewer J. et al. A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus // J. Virol. – 2010. – Vol. 84, N 8. – P. 3909–3920.

ПОЛУЧЕНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ОРТОПОКСВИРУСОВ

**Я.А. Хлусевич¹, А.Л. Матвеев¹, И.К. Байков¹, Н.И. Бормотов², Л.Е. Булычев²,
Н.В. Тикунова¹**

¹ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск;

²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Род *Orthopoxvirus* включает два высокопатогенных для человека вируса: вирус натуральной оспы и вирус оспы обезьян. К этому роду относятся и менее патогенные для человека вирусы оспы коров и осповакцины, а также ряд непатогенных для человека вирусов, включая вирус экстремелии [1]. Прививка вирусом осповакцины приводит к формированию у вакцинированных людей длительного иммунитета, однако оспопрививание нередко сопровождается серьезными осложнениями, вероятность возникновения которых велика для лиц со сниженным иммунитетом [2]. Известно, что у ортопоксвирусов поверхностные белки высоко гомологичны, и в ответ на инфицирование модельных животных одного вида различными ортопоксвирусами нарабатывается сходный паттерн специфических антител [3]. Вируснейтрализующие антитела играют важную роль в защите организма от ортопоксвирусной инфекции.

В настоящее время разработано более 40 рекомбинантных антител, обладающих терапевтическим потенциалом для лечения и экстренной профилактики инфекционных заболеваний [4, 5]. В частности, разрабатываются антитела против ортопоксвирусов [6 – 8], к которым относятся вирусы натуральной оспы и оспы обезьян. Создание антител против особо опасных (высоко патогенных) агентов (вирусов) сопровождается необходимостью работы в условиях биобезопасности уровня BSL 3, 4, что накладывает множество ограничений и является ресурсоемким процессом. Использование низко- или непатогенных агентов на первых стадиях отбора рекомбинантных антител могло бы значительно упростить, удешевить, возможно, ускорить процесс создания (разработки) терапевтических антител.

Одним из возможных подходов к разработке терапевтических антител является создание полноразмерных антител человека с использованием методов фагового дисплея [9]. Учитывая высокую патогенность вирусов натуральной оспы и оспы обезьян, была поставлена задача конструирования полноразмерных антител человека, нейтрализующих эти вирусы, на основе вариабельных доменов антител, связывающих слабопатогенный и непатогенный вирусы оспы коров и экстремелии соответственно.

В работе использовали иммунную комбинаторную фаговую библиотеку одноцепочечных антител человека, сконструированную на основе Vh и Vl генов лимфоцитов периферической крови доноров,

вакцинированных вирусом осповакцины. Из этой библиотеки была отобрана панель одноцепочечных антител человека, способных связывать вирус оспы коров, и панель антител, связывающих и вирус экстремелии. При анализе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих эти антитела, было выявлено 13 уникальных антител. Все уникальные антитела были проверены в реакции кросс-реактивного связывания с вирусами экстремелии, осповакцины и оспы коров. Оказалось, что большинство протестированных антител связывало различные ортопоксвирусы без существенной разницы, что свидетельствовало о взаимодействии с группоспецифическими эпитопами ортопоксвирусов. Тестирование антител в реакции ингибирования бляшкообразования в культуре эукариотических клеток *Vero* Е6 показало, что отобранные фаговые scFv антитела способны нейтрализовать вирусы оспы коров, осповакцины и экстремелии. Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора было показано, что часть отобранных антител также способны нейтрализовать и высокопатогенные для человека ортопоксвирусы – вирусы натуральной оспы и оспы обезьян.

При определении белка-мишени вируснейтрализующих антител было показано, что они связывают белок с молекулярной массой около 35 кДа, соответствующий основному иммунодоминантному белку при развитии ортопоксвирусной инфекции у человека. Этот белок кодируется открытой рамкой трансляции Н3L по номенклатуре вируса осповакцины, штамм Копенгаген. Для локализации участка, отвечающего за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами, была создана панель делеционных вариантов белка р35. С использованием одноцепочечных антител человека и полученной панели делеционных вариантов белка р35 был впервые локализован участок этого белка, отвечающий за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами.

Для терапевтических АТ важны корректные посттрансляционные модификации и гликозилирование, поэтому большинство систем экспрессии основано на клеточных линиях млекопитающих [10]. Кроме того, для получения клона, стабильного продуцирующего АТ, необходимо, чтобы плазмиды, содержащие гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи рекомбинантного АТ, также содержали гены, кодирующие разные селективные маркеры. На основе вариабельных доменов одноцепочечных антител, способных нейтрализовать инфекционность ортопоксвирусов, было сконструировано три полноразмерных антитела человека fh1A, fhb9 и fh8E. Для этого на основе коммерческого вектора pcDNA3.1(+) («Invitrogen») были сконструированы оригинальные кассетные векторные плазмиды pCH2g и pCL2h, предназначенные для клонирования V-генов, кодирующих вариабельные домены тяжелых и легких цепей АТ. На основе этих векторов созданы плазмиды, обеспечившие в клетках CHO-K1 продукцию рекомбинантных антител против иммунодоминантного белка р35 ортопоксвирусов. Структура рекомбинантных антител была подтверждена электрофоретически и масс-спектрометрически. Методом поверхностного плазмонного резонанса с помощью оптического биосенсора ProteOn XPR36 показали способность полученных АТ специфически связывать целевой антиген. Кроме того, были определены равновесные константы аффинности антител fh1A, fhb9 и fh8E, которые составили 33 нМ, 27 нМ и 22 нМ соответственно. С использованием полноразмерных антител человека и панели делеционных вариантов белка р35 был подтвержден участок этого белка, отвечающий за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами.

Таким образом, в ходе проделанной работы были получены полноразмерные антитела человека, перспективные для профилактики поствакцинальных осложнений, и локализован участок белка, отвечающий за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами.

Библиографический список

1. Fields' Virology / David Mahan Knipe, Peter M. Howley. – Lippincott Williams & Wilkins, 2007 – P. 3177.
2. Галактионов В.Г. Иммунология. – М.: Изд-во "РИЦ МКД", 2000. – 488 с.
3. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. – М.: KMK Scientific Press Ltd., 1998. – 476 с.
4. Деев С. М., Лебеденко Е. Н., Петровская Л. Е. и др. Неприродные антитела и иммуноконъюгаты с заданными свойствами: оптимизация функций через направленное изменение структуры // Усп. хим. – 2015.– Т. 84, вып. 1. – С. 1–26.
5. Reichert J.M. Antibodies to watch in 2014 // mAbs. – 2014. – Vol. 6, N 1. –P. 5-14.
6. Tikunova N., Morozova V., Batanova T. et al. Phage antibodies from combinatorial library neutralize vaccinia virus // Hum. Antibodies. – 2001. – Vol. 10.– P. 95-99.

7. Tikunova N., Dubrovskaya V., Morozova V. et al. The neutralizing human recombinant antibodies to pathogenic Orthopoxviruses derived from a phage display immune library // *Virus Res.* – 2012. – Vol. 163. – P. 141–150.

8. McCausland M.M., Benhnia MR.-E.-I., Crickard L. et al. Combination therapy of vaccinia virus infection with human anti-H3 and anti-B5 monoclonal antibodies in a small animal model // *Antiviral therapy.* – 2010. – Vol. 15, N 4. – P. 661–675.

9. Huang J.X., Bishop-Hurley S.L., Cooper M.A. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56, N 9. – P. 4569–4582.

10. Mohan C., Kim Y. G., Koo J., Lee G. M. Assessment of Cell Engineering Strategies for Improved Therapeutic Protein Production in CHO Cells // *Biotechnol. J.* – 2008. – Vol. 3, N 5. – P. 624–630.

ПОЛИЭПИТОПНЫЙ ВИЧ-1 ИММУНОГЕН, ВКЛЮЧАЮЩИЙ ИМИТАТОРЫ ЭПИТОПОВ, УЗНАВАЕМЫХ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ АНТИТЕЛАМИ 10E8, Z13e1 и VRC01

**А.Н. Чикаев, А.П. Рудометов, Н.С. Щербакова, Н.Б. Андреева, О.Н. Каплина,
А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко**

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия

Несмотря на то что вирус иммунодефицита человека является одним из самых хорошо изученных вирусов, до сих пор отсутствует эффективное средство профилактики заболевания. Современные способы лечения лишь замедляют прогрессирование ВИЧ-инфекции и её переход в стадию СПИДа. Поэтому создание профилактической анти-ВИЧ вакцины является единственным реальным способом предотвращения эпидемии.

На сегодняшний день большинство ведущих ученых в области исследования ВИЧ сходятся во мнении, что анти-ВИЧ вакцина должна стимулировать выработку нейтрализующих антител широкого спектра действия, или broadly neutralizing antibodies (bnAbs). Такие антитела связываются с консервативными участками вирусных гликопротеинов, не подверженных мутациям, в результате чего, несмотря на сильную генетическую изменчивость вируса, они сохраняют способность эффективно нейтрализовать множество первичных изолятов ВИЧ.

Большинство эпитопов, узнаваемых bnAbs, имеет сложную пространственную организацию, что значительно осложняет теоретический расчет и получение иммуногена, способного повторить структуру нативных эпитопов. Один из подходов, позволяющих избежать этой проблемы, заключается в получении полиэпитопной конструкции, в состав которой входят линейные пептиды имитаторов эпитопов, узнаваемых нейтрализующими антителами. Для поиска пептидных имитаторов антигенных детерминант вируса могут использоваться методы комбинаторной биологии, в частности метод фагового дисплея, который позволяет проводить скрининг пептидных библиотек бактериофагов для идентификации последовательностей, обладающих требуемыми антигенными свойствами. Предполагается, что при иммунизации такая структура будет индуцировать образование одного или нескольких нейтрализующих антител, обладающих сходными с bnAbs-прототипами характеристиками.

При создании полиэпитопного анти-ВИЧ-1 иммуногена за основу был взят разработанный ранее рекомбинантный белок, получивший название TBI (T- and B-cell immunogen). Он содержит 5 В-клеточных и 4 Т-хелперных эпитопа из белков env и gag ВИЧ-1 (Eroshkin et al., 1995), соединенные спейсерными последовательностями. Было решено заменить наименее иммуногенные В-клеточные эпитопы, входящие в состав оригинального варианта TBI, на аминокислотные последовательности, представляющие собой эпитопы, с которыми связываются нейтрализующие ВИЧ-1 антитела 10E8 и Z13e1. Кроме того, в структуру новой конструкции был добавлен линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа,

узнаваемого антителом VRC01, структура которого была определена с помощью технологии фагового дисплея (Chikaev et al., 2015). Перечисленные антигенные детерминанты были выбраны из двух основных районов ВИЧ-1, являющихся мишенями для bNAbs: MPER регион гликопротеина gp41, который играет важную роль в процессе проникновения вируса в клетку-мишень, и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 (CD4bs), входящий в состав гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (Env).

Модифицированный белок получил название newest TBI. Ген, кодирующий newest TBI, был синтезирован и клонирован в составе плазмидного вектора pET21a+. Разработанная нами схема очистки рекомбинантного белка включала фракционирование содержимого клеточного материала в неденатурирующих условиях; дробную экстракцию в мочеvine; выделение целевых фракций белков с помощью металл-хелатной хроматографии. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка, пригодный для иммунизации лабораторных животных, который был охарактеризован с помощью электрофореза, иммуноблоттинга и масс-спектрометрии.

Очищенным препаратом newest TBI были иммунизированы лабораторные животные, полученные антисыворотки охарактеризованы с помощью иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. В настоящее время проводится анализ вируснейтрализующей активности полученных сывороток с использованием технологии env-псевдотипированных вирусов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-14-00660.

РАЗРАБОТКА И ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОЙ СУБСТАНЦИИ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОТИВООСПЕННОГО ПРЕПАРАТА НИОХ-14

**Л.Н. Шишкина¹, А.С. Кабанов¹, О.Ю. Мазурков¹, М.О. Скарнович¹, Н.И. Бормотов¹,
О.А. Серова¹, М.А. Скарнович¹, Ал.А. Сергеев¹, К.А. Титова¹, Ар.А. Сергеев¹,
Л.Е. Булычев¹, Г.М. Сысоева¹, Г.Г. Шими́на¹, С.Г. Гамалей¹, Е.Д. Даниленко¹,
Б.А. Селиванов², А.Я. Тихонов², А.А. Чернонос³**

*¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл.; ²ФГБУН Новосибирский институт
органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск; ³ФГБУН Институт
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

После завершения программы глобальной ликвидации оспы на Земле и отмены вакцинации против оспы в 1980 г. в мире сложилась опасная ситуация, когда более половины человечества не имеет иммунитета против ортопоксвирусных инфекций. Ортопоксвирусы могут вызывать у людей спектр заболеваний в широком диапазоне клинических проявлений. Кроме вируса натуральной оспы (ВНО), способного вызывать тяжелое заболевание с летальностью до 40–60%, особо опасным для человека является вирус оспы обезьян (ВОО), при заражении которым смертность людей достигает 10%. При этом угроза возникновения оспы существует до настоящего времени, поскольку нельзя исключить нелегальное хранение ВНО, реконструкцию жизнеспособного ВНО на основе данных первичной структуры ДНК и преднамеренное использование против населения природных или рекомбинантных штаммов ВНО и ВОО в качестве биологического оружия. В связи с этим необходима разработка эффективных средств лечения инфекций, вызываемых ВНО и другими ортопоксвирусами, патогенными для человека.

В настоящее время в мире не существует препаратов, разрешенных для экстренной профилактики и лечения ортопоксвирусных инфекций. Вместе с тем в США проводятся клинические испытания двух эффективных, биодоступных при пероральном введении противооспенных препаратов: CMX001 – эфирно-липидного аналога цидофовира с активностью на стадии репликации ДНК, и ST-246 – N-{3,5-диоксо-4-азатерацкло[5.3.2.0^{2,6}.0^{8,10}]додек-11-en-4-ил}-4-(трифторметил)бензамида, ингибитора вы-

хода оболочечных форм вируса из клетки. Однако в России отсутствуют надежные лекарственные средства для профилактики и лечения натуральной оспы и оспы обезьян, а также других ортопоксвирусных инфекций, поэтому проблема создания новых эффективных противооспенных препаратов является по-прежнему актуальной.

С 2001 г. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора совместно с рядом научно-исследовательских институтов и университетов проводился поиск новых низкомолекулярных ингибиторов ортопоксвирусов. В общей сложности было протестировано более 7000 соединений. При скрининге и расширенном тестировании полученных соединений было установлено, что по сравнению с другими исследованными соединениями наиболее высокие показатели противовирусной активности в отношении ортопоксвирусов *in vitro* проявила 7-({[(4-трифторметил)фенил]формогидразидо} карбонил)трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6- карбоновая кислота (НИОХ-14) [1, 2].

В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение безвредности, фармакокинетики и противовирусной активности химически синтезированного соединения НИОХ-14 в экспериментах *in vivo* с использованием вируса эктромелии (оспы мышей) и высокопатогенных для человека ортопоксвирусов (вирусов оспы обезьян и натуральной оспы).

В соответствии с разработанным Протоколом доклинических исследований проведено изучение острой и хронической токсичности субстанции препарата, специфической антиортопоксвирусной активности, а также фармакокинетики субстанции препарата НИОХ-14 в экспериментах на животных. В ходе токсикологического исследования показано, что субстанция препарата НИОХ-14 может быть отнесена к классу малоопасных соединений. При однократном и многократном внутрижелудочном введении мышам и крысам обоего пола в эффективной дозе и дозе, в 3 раза ее превышающей, препарат не приводил к гибели лабораторных животных, не вызывал выраженных или длительно сохраняющихся изменений физиологических, гематологических и биохимических показателей. Субстанция препарата НИОХ-14 не проявляла аллергизирующих и мутагенных свойств.

В экспериментах на мышах, инфицированных вирусами эктромелии, оспы обезьян и натуральной оспы, показано, что субстанция препарата НИОХ-14 проявляет высокую эффективность *in vivo* в отношении ортопоксвирусов, в том числе вируса натуральной оспы, сравнимую с эффективностью американского препарата ST-246. Было показано, что при пероральном введении мышам, интраназально зараженным летальной дозой вируса эктромелии, препараты НИОХ-14 и ST-246 достоверно не отличаются по показателю 50%-ной эффективной дозы. «Терапевтическое окно» – время начала ежедневного применения НИОХ-14 составляло 1 – 6 сут после заражения при достижении 100 – 60%-ной выживаемости мышей, инфицированных вирусом эктромелии. Введение НИОХ-14 мышам, инфицированным вирусами эктромелии, оспы обезьян и натуральной оспы, приводило к достоверному снижению доли павших и инфицированных мышей, продукции этих ортопоксвирусов и уменьшению патоморфологических изменений в легких зараженных мышей.

При пероральном введении мышам НИОХ-14 были определены его основные фармакокинетические параметры в сыворотке крови и органах. Было показано, что абсолютная биодоступность НИОХ-14 при его пероральном введении мышам составляла от 22,8 до 39,2%. При пероральном введении мышам НИОХ-14 тканевая доступность препарата в виде активного метаболита ST-246 для легких составляла 100%, для печени – 69,6%, для селезенки – 20,3%, для мозга – 26,8%, для почек – 63,3%. Полученные данные свидетельствуют о высокой абсолютной и тканевой биодоступности химического соединения НИОХ-14, обладающего антиортопоксвирусной активностью.

Таким образом, на основании полученных результатов химически синтезированная субстанция НИОХ-14 может быть рекомендована для разработки на ее основе нового отечественного противооспенного препарата и проведения его дальнейших доклинических и клинических испытаний.

Библиографический список

1. Кабанов А.С., Сергеев Ал.А., Булычев Л.Е. и др. Изучение противовирусной активности химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro* // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 2. – С. 54–59.
2. Mazurkov O.Yu., Kabanov A.S., Shishkina L.N. et al. The new effective chemically synthesized anti-smallpox compound NIOCH-14 // J. Gen Virol. – 2016. – Vol. 97, N 5. – P. 1229–1239.

КАНДИДАТНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ И ДРУГИХ ОРТОПОКСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

С.Н. Якубицкий, И.В. Колосова, Р.А. Максютлов, С.Н. Щелкунов

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, Кольцово Новосибирской обл., Россия*

Вирус натуральной оспы (ВНО) – представитель рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*, вызывает высоко контагиозное заболевание – натуральную оспу. Это одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека со смертностью 20–30%, явившееся причиной гибели только в 20 веке сотни миллионов людей. С 1980 г. по рекомендации ВОЗ во всем мире прекращена массовая вакцинация населения против данной инфекции, так как была подтверждена ликвидация натуральной оспы в результате кампании глобальной вакцинации, хотя угроза возвращения этого заболевания существует и в настоящее время. Отказ от вакцинации также связан с тяжелыми поствакцинальными осложнениями при использовании классической живой вакцины на основе вируса осповакцины (ВОВ), основными из которых являются: поствакцинальный энцефалит, прогрессирующая и генерализованная вакцинация, вакцинальная экзема, миоперикардит и, в редких случаях, смерть.

За прошедшие несколько десятилетий после повсеместного прекращения иммунизации против оспы постоянно увеличивается доля населения, утратившая специфический иммунитет не только против натуральной оспы, но и таких зоонозных ортопоксвирусных инфекций, как оспа коров, оспа обезьян, оспа буйволов. Об этом свидетельствуют участвовавшие в последние годы в разных географических регионах мира многочисленные вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей, обусловленные близкими родственниками ВНО. Кроме того, большую опасность представляет потенциальная возможность использования ВНО в качестве агента биотеррористических атак, которые могут иметь катастрофические последствия для всего населения Земли.

Вакцинопрофилактика является единственным методом борьбы с натуральной оспой, доказавшим свою эффективность. Но использование классических живых вакцин на основе ВОВ сейчас может привести к еще большему числу побочных реакций и более тяжелым их проявлениям, чем во время кампании глобальной ликвидации этого заболевания. Примерно четверти населения планеты противопоказана вакцинация ВОВ. В первую очередь это беременные женщины и люди с супрессивным состоянием иммунитета, вызванным раком, трансплантацией органов, ВИЧ-инфекцией и т. п., а также лица с заболеваниями сердца, экземой и атопическим дерматитом.

Отсутствие эффективных противовирусных препаратов и опасность использования классической живой вакцины на основе ВОВ из-за наличия тяжелых поствакцинальных осложнений требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций и схем их применения.

Выключение генов вирулентности способно существенно снизить патогенные свойства ВОВ. Одним из наиболее перспективных направлений таких работ является создание с помощью методов генетической инженерии высоко аттенуированных вариантов ВОВ, обладающих иммуногенностью и протективностью на уровне классической противооспенной вакцины, но при этом характеризующихся меньшей патогенностью. Другим подходом к нивелированию побочных реакций вакцинопрофилактики с сохранением формирования иммунитета против инфекции является использование субъединичных вакцин, несущих только определенные антигенные детерминанты патогена.

В направлении аттенуации ВОВ реализован подход, заключающийся в последовательной, направленной инаktivации ключевых генов различных молекулярных факторов вирулентности патогена без нарушения генов, необходимых для эффективного размножения вируса на культуре клеток. На основе анализа данных литературы выбраны следующие гены ВОВ: *A56R* – кодирует гемагглютинин (ингибирует слияние инфицированных клеток и протеолитически активирует инфекционность вирионов), *B8R* – кодирует секретируемый γ -интерферон-связывающий белок, *J2R* – кодирует тимидинкиназу, *C3L* – кодирует секретируемый комплемент-связывающий белок, *N1L* – кодирует ингибитор NF- κ B (универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла) и *A35R* – кодирует мембранный белок, ингибирующий антигенную презента-

цию, связанную с МНС II, иммунное праймирование Т-лимфоцитов и последующий синтез хемокинов и цитокинов.

Для реализации этого подхода на первом этапе работы для фланкирующих районов выбранных генов были рассчитаны олигонуклеотидные праймеры таким образом, чтобы наиболее полно делетировать гены, не нарушая при этом прилегающие открытые рамки трансляции. В итоге были сконструированы шесть рекомбинантных плазмид интеграции, содержащих как последовательности генома вируса, фланкирующие определенный нарушаемый ген слева и справа, так и доминантный маркер для селекции рекомбинантных вирусов.

На следующем этапе на основе штамма ЛИВП ВОВ, используя метод временной доминантной селекции, были последовательно получены рекомбинантные варианты с делецией одного, двух, трех, четырех, пяти и всех шести указанных выше генов вирулентности ВОВ. По результатам последующих исследований наибольший интерес стал представлять мутантный штамм с нарушением всех шести генов, обозначенный как VACΔ6.

Результаты испытаний репликативных свойств варианта VACΔ6 в сравнении с ЛИВП ВОВ в культуре клеток CV-1 показали, что кривые развития вирусов достоверно не различаются. Это указывает на то, что нарушение этих генов не оказывает влияние на репродуктивные функции вируса в изученной культуре клеток, что важно с точки зрения технологии наработки вакцины на клеточных культурах.

Исследование VACΔ6 как предполагаемой кандидатной вакцины заключалось в изучении различных биологических свойств полученного штамма, обычно тестируемых при получении вакцин. Сравнение велось с исходным штаммом ЛИВП ВОВ, принятым в России для производства вакцины против оспы.

Нейровирулентность штамма ВОВ является одной из важных характеристик патогена, так как считается, что осложнения неврологического характера при противооспенной вакцинации людей обусловлены проникновением и размножением вируса в мозговых тканях и развитием вследствие этого энцефалита. В данной работе было показано снижение нейровирулентности у варианта VACΔ6 по сравнению с исходным штаммом ЛИВП ВОВ, продемонстрированное в уменьшении смертности новорожденных мышей примерно в пять раз при интрацеребральном пути введения вирусов, а также в снижении вирусной репродукции в тканях головного мозга животных как минимум на порядок.

Для исследования влияния нарушений указанных выше генов на реактогенные свойства полученного вируса были изучены воспалительно-некротические проявления у кроликов после внутрикожного введения вирусных препаратов. Было показано ослабление реактогенности рекомбинантного варианта ВОВ по сравнению с родительским штаммом примерно на три порядка.

Такое значимое свойство штамма, как иммуногенная активность, было оценено по уровню индуцируемой выработки вируснейтрализующих антител у мышей после одно- или двукратной подкожной иммунизации различными дозами вирусов. Было показано, что иммуногенная активность рекомбинантного варианта VACΔ6 превосходит таковую родительского ЛИВП ВОВ примерно в полтора раза вне зависимости от количества иммунизаций и дозы введенного вируса.

Изучение одного из основных свойств вакцинного штамма – протективности, было проведено на мышах, двукратно подкожно иммунизированных различными дозами исследуемых вирусов, а впоследствии интраназально инфицированных высоковирулентным для мышей ортопоксвирусом – вирусом экстремелии (ВЭ). Против 10 LD₅₀ ВЭ был показан 100%-ный защитный эффект для обоих вариантов ВОВ. С целью выявления различий между штаммами VACΔ6 и ЛИВП ВОВ в дальнейшем была выбрана принципиально большая разрешающая доза ВЭ величиной 150 LD₅₀. В итоге было продемонстрировано, что VACΔ6 обеспечивает большую протективность, чем родительским штаммом ЛИВП ВОВ, что выражалось в уменьшении смертности в два раза в группах, зараженных мутантным вирусом, по сравнению с животными, инфицированными исходным вариантом ВОВ вне зависимости от количества введенного вируса.

Также по направлению субъединичных вакцин была разработана поливалентная ДНК-вакцина, представляющая собой смесь пяти рекомбинантных плазмид, несущих под контролем промотора цитомегаловируса гены вирионных белков ВНО: А30, F8, М1 (входят в состав поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов), а также А36 и В7 (расположены на оболочке внеклеточной формы вируса).

Применяя различные схемы иммунизации ДНК-вакциной и VACVΔ6, было установлено, что иммунизация мышей поливалентной ДНК-вакциной с последующим заражением рекомбинантным вариантом VACΔ6 индуцирует наработку вируснейтрализующих антител и обеспечивает защиту мышей против дозы 150 LD₅₀ ВЭ наравне с двукратной иммунизацией VACΔ6. Кроме этого, было показано, что трехкратная иммунизация только ДНК-вакциной формирует 100%-ный защитный эффект против дозы 10 LD₅₀ ВЭ.

Таким образом, созданный штамм VACΔ6 BOB является перспективным в качестве противооспенной вакцины нового поколения, имея значительно сниженные показатели реактогенности и нейровирулентности по сравнению с родительским штаммом ЛИВП на фоне усиленных иммуногенных и протективных свойств исходного штамма. А стратегия вакцинации, при которой для праймирования иммунной системы использовалась бы ДНК-вакцина, а для последующей бустерной вакцинации – аттенуированный вариант VACΔ6 BOB, является перспективным подходом, значительно снижающим вероятность побочных реакций от противооспенной вакцинации. Предложенные варианты могут быть использованы для разработки стратегий безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Essbauer S.	147	Бледных Н.А.	129
Frey S.	147	Богрянцева М.П.	184, 198, 213
Zinner J.	147	Бондаренко Д.А.	230
Абдиева К.	147	Бондаренко Е.И.	109
Абзаева Н.В.	187	Борисова Т.И.	82, 90
Авдошина Л.Н.	18	Бормотов Н.И.	234, 237
Агафонов А.П.	218, 225, 232	Боробова Е.А.	200
Адельшин Р.В.	18, 82, 87, 90, 138	Бочаров Е.Ф.	37, 129, 196
Айкин С.С.	105	Бочкарева С.С.	177
Акимкин В.Г.	13	Брагина Е.А.	57
Алейников Р.П.	205	Бренева Н.В.	18, 51
Алексеева Л.П.	151	Бугоркова С.А.	203
Алешкин А.В.	177	Будыка Д.А.	187
Алешкин В.А.	53, 177	Булатова Т.Н.	105
Алимов А.В.	131	Булычев Л.Е.	218, 225, 232, 234, 237
Ананько Г.Г.	228	Буракова Л.П.	141
Андаев Е.И.	18, 51, 82, 87, 90, 138	Бурцева Е.И.	43
Андреева И.С.	78, 178, 221	Василевич И.В.	205
Андреева Н.Б.	202, 223, 236	Василенко Н.Ф.	59, 89
Андреевская Н.М.	162	Веркина Л.М.	25
Анисенкова Е.В.	69	Верхозина М.М.	93, 95, 114
Антонец Д.В.	181, 200	Власов Е.В.	102, 107, 117, 128
Арипова Т.У.	103	Водопьянов А.С.	26
Архангельская И.В.	55, 65	Водопьянов С.О.	26
Астахова Е.М.	98, 103, 105, 107, 128	Воевода М.И.	206
Афанасьев Е.Н.	145	Волынкина А.С.	119
Афанасьев С.С.	53	Воробьева И.Г.	78
Ачигечева П.Ю.	129	Высочина Н.П.	109
Бабкин И.В.	100, 140	Гаврилова Е.В.	161
Бажан С.И.	181, 200	Гаевская Н.Е.	182
Базарова Г.Х.	20	Галахова Д.О.	218, 225, 232
Байжанов А.К.	103	Гамалей С.Г.	184, 188, 194, 198, 237
Байков И.К.	141, 230, 234	Гаркуша Ю.Ю.	145
Байракова А.Л.	53	Гашникова М.П.	98, 102, 103, 105, 107, 117, 128
Бакулина А.Ю.	202, 223	Гашникова Н.М.	98, 102, 103, 105, 107, 117, 128, 129
Бакштановская И.В.	123	Гинько З.И.	191, 205, 212, 220
Балахонов С.В.	20, 51, 162	Глушков С.А.	156
Баранникова Н.Л.	162	Гогина Я.С.	194
Батенева А.В.	184, 188, 194, 198	Голицына Л.Н.	27
Бахвалова В.Н.	93	Гольцова Н.А.	121
Бачинский А.Г.	215	Гончарова Н.И.	41
Безногов Ю.Г.	18	Гостищева С.Е.	187
Белявская В.А.	191, 206	Давыдова Н.А.	23
Белявцева Л.И.	23		
Березняк Е.А.	25		
Бичурина М.А.	143		

Даниленко Е.Д. 184, 188, 194, 198, 237
 Дворцова И.В. 61
 Демина Т.В. 93, 95, 114
 Денисов А.В. 20
 Джиев Ю.П. 93, 95, 114
 Дмитриева Г.М. 31
 Дмитровский А.М. 147, 149
 Дорошенко Е.К. 93, 95, 114
 Драгомерецкая А.Г. 32
 Думченко Н.Б. 213
 Дурманов А.Г. 41

Евдокимова В.В. 151
 Евченко Ю.М. 112
 Егембердиева Р.А. 147, 149
 Егизарян Л.А. 25
 Епихина Т.И. 109
 Ералиева Л.Т. 147
 Еремеева Н.И. 133
 Ермилова О.С. 191
 Ермолаев В.В. 194
 Ершова О.Н. 63, 177
 Ефременко Д.В. 89

Жалмагамбетова А. 147
 Жарникова И.В. 145, 154
 Жарникова Т.В. 154
 Жданова Е.В. 145
 Железнова Н.В. 143
 Жилина Н.В. 213
 Жираковская Е.В. 34, 100, 140

Забашта А.В. 74
 Забашта М.В. 61, 72, 74
 Закабунин А.И. 178
 Зверев В.В. 27
 Злобин В.И. 93, 95, 114
 Зматракова Е.А. 123
 Зубавичене Н.М. 37, 196
 Зуенко А.А. 187
 Зилькарнеев Э.Р. 177
 Зырянова Д.П. 105, 107, 128

Ибрагимова Ж.Б. 221
 Иванов Л.И. 109
 Иванов М.К. 156
 Иванова А.В. 39
 Иванова Г.Ф. 187
 Иванова Л.К. 135

Иванова О.С. 184, 198
 Ивлеев В.В. 102, 103, 105, 107, 117, 128
 Иголкина Я.П. 109
 Ильичев А.А. 181, 202, 205, 236
 Ильичева Т.Н. 41, 228
 Исакова Ф.А. 149

Кабанов А.С. 225, 232, 237
 Казаева Е.В. 117
 Кандрюшин Е.В. 156
 Каплина О.Н. 200, 202, 236
 Капустин Д.В. 34, 170
 Каримова Т.В. 135, 158
 Карпенко Л.И. 181, 200, 202, 205, 223, 236
 Карпова Л.С. 43
 Катын А.А. 57
 Киселева И.А. 177
 Клименко В.П. 194
 Климов В.Т. 135, 158
 Ключева С.Н. 203
 Князев Д.И. 159
 Ковалев Д.А. 112, 119, 174
 Козлов С.Н. 49
 Козлова И.В. 93, 95, 114
 Козлова Ю.Н. 164
 Колосова И.В. 239
 Колосова Н.П. 41
 Кондратьев М.В. 116
 Кондратьева Л.М. 116
 Кондрушина М.П. 81
 Коптелова В.Н. 210
 Копылов П.В. 18
 Корзун В.М. 20
 Косилко С.А. 20, 51
 Косогова Т.А. 228
 Кравцов А.Л. 203
 Кравченко М.А. 133
 Краснова Е.И. 34, 170
 Кретенчук О.Ф. 151
 Кругликов В.Д. 55
 Кудрявцев А.Н. 141
 Кузнецова И.В. 112
 Кузубов В.И. 205, 212, 220
 Куличенко А.Н. 112, 119, 174
 Кулова Е.А. 69
 Курбатова Е.М. 65
 Курчева С.А. 145
 Кухаренко Л.А. 208

Лапин В.А.	210	Николаев В.Б.	49
Лахтин В.М.	53	Нифантьев Н.Э.	208
Лахтин М.В.	53	Новикова Л.И.	177
Лебедев Л.Р.	188, 194	Новикова Н.А.	27
Левагина Г.М.	184, 198	Новицкая И.В.	126, 172
Левченко Д.А.	55	Носков А.К.	18
Леонтьева С.А.	57		
Лисак О.В.	93, 95, 114	Овчинникова А.С.	218, 225, 232
Локтев В.Б.	84	Ожирельева И.В.	123
Лутова С.Л.	206	Олейников И.П.	26
Лысова Л.К.	65	Опочинский Э.Ф.	158
		Орешкина Н.Д.	31
Мазепа А.В.	51	Орловский В.Г.	220
Мазуркевич В.В.	123	Офицеров В.И.	166, 181
Мазурков О.Ю.	237		
Мазуркова Н.А.	221	Парамонов А.И.	95, 114
Максютов Р.А.	161, 239	Петрова О.В.	41
Малецкая О.В.	59, 89	Петрова С.В.	98
Мамадалиев С.М.	149	Писаренко С.В.	119
Манин Е.А.	59	Пичурина Н.Л.	61, 74
Маренникова С.В.	161, 191, 225	Поздняков П.И.	105
Марков Е.Ю.	49	Полтавченко А.Г.	166
Марковская Е.И.	66	Пономаренко Д.Г.	112, 119, 174
Матвеев А.Л.	208, 230, 234	Попков А.В.	98
Матвеичев А.В.	210	Попов Н.В.	39
Медикова Л.Д.	184	Поповцева Н.М.	43
Мельникова О.В.	82, 87, 138, 170	Прасолова М.А.	156
Меньшикова Е.А.	65	Преснякова Н.Б.	69
Метелёв А.А.	31	Прислегина Д.А.	59, 89
Миронова А.В.	65	Проворова В.В.	170
Михайлов Е.П.	20	Пунько О.А.	98
Михайлов Л.М.	162	Пуховская Н.М.	109
Михайлова В.А.	162	Пучкова Л.И.	221
Михалева Т.Ю.	212	Пьянков О.В.	37, 196
Михеев В.Н.	41, 81		
Мищенко А.И.	20	Радаева И.Ф.	213
Мокрушина О.С.	178	Рар В.А.	109, 114, 170
Морозова В.В.	141, 164	Ребешенко А.П.	123
Москалева Н.В.	105	Резайкин А.В.	131
Мохонова Е.В.	210	Рождественский Е.Н.	20
Муранкина В.Р.	102, 107, 117, 128	Романова Л.В.	61, 74
Мурашев А.Н.	230	Руденко Л.Г.	213
		Рудометов А.П.	202, 223, 236
Нечаев Ю.С.	213	Ружек Д.	95
Нечаева Е.А.	205, 213	Рукавишников М.Ю.	81
Нечипуренко Л.А.	57	Рыжиков А.Б.	41
Нечитайло О.В.	166	Рындюк Н.Н.	205, 212
Низоленко Л.Ф.	215		
Никитина З.И.	210	Сабитова Ю.В.	121, 170

Савельева М.В.	170	Тимофеев Д.И.	156
Савина Е.В.	126, 172	Тимофеева Е.В.	143
Савинова Ю.С.	87, 95, 114	Титова К.А.	218, 225, 232, 237
Савченко А.П.	61, 74	Титова С.В.	26, 65, 66
Сарыбаева Г.К.	149	Тихонов А.Я.	237
Сафатов А.С.	78	Ткачев С.Е.	93, 95, 114
Сахарнов Н.А.	159	Токарева Л.Е.	162
Свириденко Т.М.	213	Тотменин А.В.	98, 102, 103, 105, 107, 117, 128, 129
Святченко С.В.	41	Тришина А.В.	25
Севостьянова А.В.	18, 51	Троценко О.Е.	32
Селиванов Б.А.	237	Трухина А.Г.	90
Селюнина Д.В.	62	Туманов Ю.В.	206
Сенькина Т.Ю.	213	Туребеков Н.	147
Сергеев А.Г.	131	Тюменцева И.С.	145
Сергеев А.Н.	205, 218, 225, 232	Ульшина Д.В.	174
Сергеев Ал.А.	218, 225, 232, 237	Унагаева Н.В.	129
Сергеев Ар.А.	218, 225, 232, 237	Урбанович Л.Я.	49
Серова О.А.	237	Усова С.В.	213
Сидорова Е.А.	51, 82, 90	Устюжанин А.В.	131
Симонова И.Р.	25	Уткин О.В.	69, 159
Скарнович М.А.	237	Уфимцева Е.Г.	133
Скарнович М.О.	188, 237	Фаст Е.В.	34
Скорняков С.Н.	133	Федулина О.О.	114
Слукин П.В.	63	Филатова Е.Н.	69
Снеткова И.П.	18	Фоменко Н.В.	121, 164
Соколов С.Н.	34, 140	Франк Л.А.	141
Соколов Ю.В.	117	Фурсова Н.К.	63
Солнцев Л.А.	159	Харьков В.В.	57
Соминина А.А.	43	Хачатурова А.А.	119
Старостина Е.В.	200	Хегай Т.Р.	103
Старцева О.Л.	145	Хлусевич Я.А.	141, 208, 230, 234
Степанова Т.Ф.	57, 123	Хохлова Н.И.	170
Столяров К.А.	43	Цапко Н.В.	23
Столярова Т.П.	43	Цветкова В.Д.	159
Стронин О.В.	121, 230	Цыганова М.И.	210
Султанов Л.В.	102	Цыпленкова Е.С.	188
Сунцова О.В.	95, 114	Чернов В.И.	212
Сулопаров И.М.	41	Черноносков А.А.	237
Сысоева Г.М.	188, 194, 237	Чеснокова М.В.	51, 135, 158
Сычева Т.Д.	69	Чикаев А.Н.	202, 236
Талаева М.В.	210	Чичерина Г.С.	93
Таран Т.В.	154	Шайимкулов Ф.У.	103
Таранов О.С.	218, 225, 232		
Татаренко Ю.С.	126, 172		
Теплякова Т.В.	76, 78, 228		
Тикунов А.Ю.	93, 95, 100, 109, 121, 140		
Тикунова Н.В.	34, 93, 95, 100, 109, 121, 140, 141, 164, 170, 208, 230, 234		

Шакирова Л.И.	112	Щербакова Н.С.	202, 236
Шапиева Ж.Ж.	147	Щипелева И.А.	66
Швецова Н.М.	112	Щуковская Т.Н.	203
Шеронова О.Б.	34	Щучинов Л.В.	20
Шими́на Г.Г.	237	Щучинова Л.Д.	81
Шиповалов А.В.	41		
Шихин А.В.	116	Яковчиц Н.В.	51, 82, 138
Шишкина Л.Н.	188, 225, 232, 237	Якубицкий С.Н.	239
Щелкунов С.Н.	161, 239	Ярыгина М.Б.	20
Щербаков Д.Н.	202, 223	Яшина Л.Н.	81

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

Адельшин Ренат Викторович, к.б.н., с.н.с.
лаборатории природно-очаговых вирусных
инфекций
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047
Тел.: +7 (3952) 22-01-39
Факс: +7 (3952) 22-01-40
e-mail adelshin@gmail.com

Акимкин Василий Геннадьевич, д.м.н.,
проф., член-корр. РАН, заслуженный врач
Российской Федерации, зам. директора ФБУН
«Научно-исследовательский институт дезин-
фектологии» Роспотребнадзора по научной
работе, зав. кафедрой дезинфектологии Инсти-
тута профессионального образования Первого
МГМУ им. И.М. Сеченова, член профильной
комиссии Министерства здравоохранения Рос-
сийской Федерации по специальности «Эпиде-
миология»
Адрес: Научный проезд, 18, Москва, 117246
e-mail vgakimkin@yandex.ru

Алатырцева Елена Алексеевна, госпиталь-
ный эпидемиолог
ГБУЗ НСО «Гинекологическая больница № 2»
Адрес: ул. М. Перевозчикова, 8, Новосибирск,
630049
Тел.: +7 (383) 228-51-59; 225-84-92
Факс: +7 (383) 225-84-92
e-mail ilenis@yandex.ru

Алешкин Владимир Андрианович, д.б.н.,
проф., заслуженный деятель науки, член РАЕН
и Нью-Йорской академии наук, директор ФБУН
«Московский научно-исследовательский инсти-
тут эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.
Габричевского» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Адмирала Макарова, 10, Москва,
125212
e-mail info@gabrich.com

Алимов Александр Викторович, к.м.н., и.о.
директора ФБУН «Екатеринбургский научно-
исследовательский институт вирусных инфек-
ций» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Летняя, 23, Екатеринбург, 620030,
Россия
Тел./факс: +7 (343) 261-99-47
e-mail virus@eniivi.ru

Андаев Евгений Иванович, д.м.н., с.н.с.,
зам. директора по общим вопросам и

организационно-методической работе
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047,
Россия
Тел.: +7 (3952) 220-070
Факс: +7 (3952) 220-040
e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Андреева Ирина Сергеевна, к.б.н., доцент,
зав. лабораторией
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 22-79
Факс: (383) 336-74-09
e-mail andreeva-is@vector.nsc.ru

Артемкина Ирина Юрьевна, к.б.н., руководи-
тель отдела научно-технического и инноваци-
онного развития
ФБУН «Екатеринбургский научно-
исследовательский институт вирусных инфек-
ций» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Летняя, 23, Екатеринбург, 620030,
Россия
Тел./факс: +7 (343) 261-99-47
e-mail artemkinaeniivi@ya.ru, virus@eniivi.ru

Астахова Екатерина Михайловна, старший
лаборант-исследователь
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 22-41
e-mail astahova_em@vector.nsc.ru

Ачигечева Полина Юрьевна, м.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
e-mail achigecheva_pyu@vector.nsc.ru

Бабкин Игорь Викторович, к.б.н., в.н.с.
ФГБУН Институт химической биологии и фун-
даментальной медицины СО РАН
Адрес: пр. Ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск,
630090, Россия
Тел.: +7 (383) 363-51-50
Факс: +7 (383) 363-51-53
e-mail i_babkin@mail.ru

Бажан Сергей Иванович, д.б.н., доцент, зав
отделом
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: 363-47-00, вн. тел. доп 20-01

e-mail bazhan@vector.nsc.ru

Байков Иван Константинович, м.н.с., к.х.н.
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090

e-mail ivan_baykov@mail.ru

Баландина Татьяна Петровна, начальник
отдела надзора на транспорте и санитарной охраны территории
Управление Роспотребнадзора по Иркутской области

Адрес: ул. Карла Маркса, 8, Иркутск, 664003

Тел.: +7 (3952) 24-33-17

Факс: 8 (3952) 24-34-81

e-mail transport@38.rospotrebnadzor.ru

Балахонов Сергей Владимирович, д.м.н.,
проф., директор
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047, Россия

Тел.: +7 (3952) 22-01-35

Факс: +7 (3952) 22-01-40, 220040

e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Бачурин Павел Михайлович, региональный
представитель

ООО «Дюпон Наука и Технологии»

Адрес: ул. Добролюбова, 2а, офис 211, Новосибирск, 630009

Тел.: +7 (383) 325-25-47

Факс: +7 (383) 325-25-51

<http://www.dupont.ru>, www.dpp-europe.ru

e-mail pavel.bachurin@dupont.com

Белкина Альбина Олеговна, зав. отделом
научно-организационной и информационной деятельности
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск
Новосибирской обл., 633010

Тел.: +7 (383) 363-80-17

Факс: +7 (383) 363-80-16

e-mail belkina_a_o@vector.nsc.ru

Белявская Валентина Александровна, д.б.н.,
проф., зав. сектором подготовки специалистов
методам молекулярно-биологической диагностики,

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00 вн. тел. 22-17

e-mail belyavskaya_va@vector.nsc.ru

Белявцева Лариса Ивановна, к.б.н., с.н.с.,
с.н.с.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора

Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия

e-mail lar.belyavtseva@yandex.ru

Бичурина Майна Александровна, д.м.н.,
с.н.с., руководитель отдела вирусологии
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Мира, 14, Санкт-Петербург, 197101

Тел.: +7 (812) 233 21 56

Факс: +7 (812) 232-92-17

e-mail poliospb@nr3854.spb.edu

Веркина Людмила Михайловна, зав. лаб.
биологической безопасности и лечения ООИ,
к.м.н.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора

Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Тел.: +7 (863) 240-27-03

Факс: 8 (863) 267-02-23

e-mail labbiobez@mail.ru

Верхозина Марина Михайловна, д.б.н., био-
лог отделения вирусологических исследований
с ПЦР-лабораторией
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области»

Адрес: ул. Трилиссера, 51, Иркутск, 664047

Тел.: +7 (395) 2-23-41-97

Факс: +7 (395) 2-23-13-71

e-mail virusologi@sesoirk.irkutsk.ru

Власов Евгений Вячеславович, лаборант-
исследователь

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 22-41

e-mail vlasovevgeny93@mail.ru

Водопьянов Сергей Олегович, д.м.н., зав. лабораторией
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия
Тел.: +7 (863) 240-22-66
e-mail vodopyanov_so@antiplague.ru

Волосникова Екатерина Александровна, к.б.н., зав. лабораторией получения и анализа биосубстанций
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск Новосибирской обл., 633010
e-mail volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Гаевская Наталья Евгеньевна, к.м.н., зав. лабораторией бактериофагов
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия
Факс: +7 (863) 267-02-63
e-mail gaevskaya_ne@antiplague.ru

Гамалей Светлана Георгиевна, зав. отделом
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск Новосибирской обл., 633010
Тел.: +7 (383-41) 5-80-91, (383) 363-80-14
Факс: +7 (383-41) 5-80-80, (383) 363-80-16
e-mail gamaley_sg@vector.nsc.ru

Гаркуша Юлия Юрьевна, н.с.
ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия
Тел./факс: +7 (8652) 26-40-39
e-mail garkusha.y@mail.ru

Гашникова Наталья Матвеевна, к.б.н., зав. отделом
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, доп. 21-40
e-mail ngash@vector.nsc.ru

Гинько Зоя Ивановна, и.о. заведующего стационаром ООИ

ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия
Тел.: +7 (383) 336-70-50
e-mail msch163@fmbamail.ru

Голицына Людмила Николаевна, к.б.н., в.н.с.
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»
Адрес: ул. Малая Ямская, 71, Нижний Новгород, 603950
Тел.: +7 (831) 469-79-11
e-mail mevirfc@rambler.ru

Горбатовская Людмила Михайловна, зам. главного врача по медицинской части
ГБУЗ НСО «Доволенская ЦРБ»
Адрес: ул. Ленина, 123, с. Довольное Новосибирской обл., 632451
Тел.: +7 (383) 54-21-819
Факс: +7 (383) 54-20-341
e-mail dvlcrb604@yandex.ru

Гостищева Светлана Евгеньевна, н.с.
ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия
Тел./факс: +7 (8652) 26-20-50
e-mail chumnpl@yandex.ru

Гурьева Людмила Степановна, врач-бактериолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»
Адрес: ул. Сопочная, 38, Красноярск, 660100
Тел.: +7 (391) 202-58-48
Факс: +7 (391) 243-18-47
e-mail fguz@24.rospotrebnadzor.ru

Давыдок Лариса Григорьевна, зав. инфекционного отделения
ГБУЗ НСО Новосибирская клиническая ЦРБ (пос. Краснообск)
Адрес: пос. Краснообск Новосибирской обл., 630501, а/я 436,
Тел.: +7 (383) 348-02-53,
Факс: +7 (383) 348-49-88,
e-mail cbnr@ngs.ru, dlg@ncrb.ru

Даниленко Елена Дмитриевна, к.б.н., директор
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск

Новосибирской обл., 633010
Тел.: +7 (383) 363-80-15
Факс: +7 (383) 363-80-16
e-mail danilenko_ed@vector.nsc.ru

Даргын Оюмаа Кужугетовна, зав. отделением иммунопрофилактики и вирусных гепатитов Государственного бюджетного учреждения Республики Тыва «Республиканский Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»

Адрес: ул. Оюна Курседи, 159А, г. Кызыл, Республика Тыва, 667003
Тел./факс: +7 (39422) 64-487
e-mail vakcina17@yandex.ru

Десятник Ася Ильинична, врач-эпидемиолог ГБУЗ НСО «Линевская районная больница»
Адрес: ул. Весенняя, д. 6, а/я 76, р.п. Линево, Искитимский р-н, Новосибирская область, 633216

Тел./факс: +7 (38343) 3-03-77
e-mail hamamille@mail.ru, desyatnik.1990@mail.ru, linevoh@ngs.ru

Дмитриева Галина Михайловна, к.м.н., зам. руководителя
Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю

Адрес: ул. Каратанова, д. 21, г. Красноярск, 660049
Тел.: +7 (391) 226-89-50 (многоканальный)
Факс: +7 (391) 226-90-49
e-mail office@24.rospotrebnadzor.ru,

Дмитровский Андрей Михайлович, д.м.н., проф., с.н.с. отдела науки
Центральная референтная лаборатория
Адрес: Алматы, Казахстан
e-mail am_dmitr@mail.ru

Драгомерецкая Анна Геннадьевна, к.б.н., зав. отделом природно-очаговых инфекций
ФБУН «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Шевченко, д. 2, Хабаровск, 680610
Тел.: +7 (4212) 46-18-62
Факс: +7 (4212) 32-54-13
e-mail anna.dragomeretskaya@yandex.ru

Евдокимова Вероника Вячеславовна, н.с.
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Тел.: +7 (863) 240-27-03
Факс: +7 (863) 267-02-23
e-mail nika_evd@mail.ru

Ермилова Ольга Сергеевна, лаборант – исследователь отдела научно-методической подготовки персонала по работе с ООИ, аспирант 4-го года очной аспирантуры
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
e-mail proffmed@bk.ru

Ермолаев Василий Викторович, м.н.с.
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск Новосибирской обл., 633010
Тел.: +7 (383) 363-80-14 (приемная)
Факс: +7 (383) 363-80-16
e-mail ermolaev_vv@vector.nsc.ru

Есина Татьяна Игоревна, м.н.с. отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск Новосибирской обл., 633010
e-mail esina_ti@vector.nsc.ru

Жарникова Татьяна Владимировна, к.б.н., с.н.с.
ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия
Тел.: +7 (8652) 26-40-39
Факс: +7 (8652) 26-03-12
e-mail snipchi@mail.stv.ru

Жираковская Елена Владимировна, к.б.н., н.с.
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
Адрес: пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090
Тел.: +7 (383) 363-51-31
Факс: +7 (383) 363-51-53
e-mail ezhr@niboch.nsc.ru

Забашта Марина Викторовна, к.б.н., с.н.с.
лаборатории эпидемиологии ООИ
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону,
344002, Россия
Тел.: (863) 240-27-03
Факс: (863) 267-02-23
e-mail zabashta79@mail.ru

Зубавичене Наталья Маратовна, к.б.н., с.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
e-mail zubavichene@vector.nsc.ru

Зубюк Ирина Юрьевна, руководитель ИЛЦ
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ре-
спублике Алтай»
Адрес: пр. Коммунистический, 173, г. Горно-
Алтайск, Республика Алтай, 649002
Тел./факс: +7 (388-22) 6-42-27-27
e-mail gti@mail.gorny.ru

Зырянова Дарья Петровна, стажер-
исследователь
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 21-14
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
e-mail zyryanova_dp@vector.nsc.ru

Иванов Михаил Константинович, зав. лабо-
раторией ПЦР, к.б.н.
ЗАО «Вектор-Бест»
Адрес: ул. Пасечная, 3, Новосибирск, 630128
e-mail ivanovmk@vector-best.ru

Иванова Александра Васильевна, м.н.с.
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский
противочумный институт «Микроб» Роспо-
требнадзора
Адрес: ул. Университетская, 46, Саратов,
410005
Тел.: +7 (927) 223-91-53
e-mail doch_ohotnika@mail.ru

Иванова Ольга Сергеевна, н.с.
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнад-
зора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск
Новосибирской обл., 633010
Тел.: +7 (383-41) 5-80-91
Факс: +7 (383-41) 5-80-88
e-mail ivanova_os@vector.nsc.ru

Ивлев Владимир Владимирович, м.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 22-41

e-mail astahova_em@vector.nsc.ru

Иголкина Яна Петровна, инженер
ФГБУН Институт химической биологии и фун-
даментальной медицины СО РАН
Адрес: пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск,
630090
Тел.: +7 (383) 363-51-37
Факс: +7 (383) 363-51-53
e-mail igolkina@inbox.ru

Ильичев Александр Алексеевич, д.б.н.,
проф., зав. отделом
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 26-17
e-mail ilyichev@vector.nsc.ru

Ильичева Татьяна Николаевна, д.б.н., до-
цент, зав. лабораторией
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 26-88
e-mail ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Ильясов Евгений Аширович, к.х.н., зав. от-
делом качества
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнад-
зора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск
Новосибирской обл., 633010
e-mail ilyasov_ea@vector.nsc.ru

Итимешева Олеся Петровна, зав. отделом
эпидемиологии, врач эпидемиолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ре-
спублике Хакасия»
Адрес: ул. Ленина, д. 66, Абакан, Республика
Хакасия, 655017, Россия
Тел.: +7 (3902) 22-77-68
Факс: +7 (3902) 22-65-00
e-mail kadr.ses.abakan@yandex.ru

Каплина Ольга Николаевна, с.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
e-mail forelat@ngs.ru

Каримова Татьяна Викторовна, заоч-
ный аспирант ФКУЗ Иркутского научно-
исследовательского противочумного института
Роспотребнадзора, зав. лабораторией особо
опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и
эпидемиологии в Новосибирской области»

Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047
Тел.: +7 (3952) 221312
Факс: +7 (3952) 220140
e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Карпенко Лариса Ивановна, д.б.н., доцент,
зав лабораторией
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 26-13
e-mail karpenko@vector.nsc.ru

Карпова Людмила Серафимовна, д.м.н.,
с.н.с., зав. лабораторией эпидемиологии гриппа
и ОРЗ
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
гриппа» Минздрава России
Адрес: ул. проф. Попова, 15/17, Санкт-
Петербург, 197376
Тел.: +7 (812) 499-15-32(33), 297-03-30
e-mail epidlab@influenza.spb.ru

Карпова Светлана Павловна, помощник вра-
ча эпидемиолога
Западно-Сибирский Дорожный филиал ФБУЗ
«Федеральный центр гигиены и эпидемиологии
по ж.д. транспорту»
Адрес: ул. Саратовская, 13, Новосибирск,
630003
Тел.: +7 (383) 229-35-48
Тел./факс: +7 (383) 229-27-32
e-mail NSAN@WSR.RU

Князев Дмитрий Игоревич, к.б.н., с.н.с.
ФБУН «Нижегородский научно-
исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»
Роспотребнадзора
Адрес: ул. Малая Ямская, 71, Нижний Новго-
род, 603950
Тел.: +7 (831) 469-79-45
Факс: +7 (831) 469-79-24
e-mail dmitry-kn@yandex.ru

Ковалев Дмитрий Анатольевич, к.х.н., зав.
лабораторией биохимии
ФКУЗ «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный институт»
Роспотребнадзора
Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь,
355035, Россия
Тел./факс: +7 (8652) 26-03-12
e-mail snipchi@mail.stv.ru

Козлов Станислав Николаевич, н.с.
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский

противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047,
Россия
e-mail ejimei@mail.ru

Козлова Ирина Валерьевна, д.м.н., руководи-
тель лаборатории молекулярной эпидемиоло-
гии и генетической диагностики
ФГБНУ Научный центр проблем здоровья се-
мьи и репродукции человека
Адрес: ул. Карла Маркса, 3, Иркутск, 664022
Тел./факс: +7 (3952) 33-39-51
e-mail diwerhoz@rambler.ru

Колпаков Дмитрий Сергеевич, зав. лаборато-
рией
Южный Окружной Центр по борьбе со СПИ-
Дом, ФБУН РостовНИИ микробиологии и
паразитологии Роспотребнадзора
Адрес: пер. Газетный, 119, Ростов-на-Дону,
344000
Тел.: +7 (863) 234-91-83
Факс: +7 (863) 234-91-83
e-mail rostovniimp@mail.ru, dimakolpakov@mail.ru

Колпащикова Татьяна Вадимовна, врач-
эпидемиолог
ГБУЗ НСО «ГКБ № 2»
Адрес: ул. Ползунова, 21, Новосибирск
e-mail info@gbuzgkb2.ru

Кондратьев Максим Владимирович, врач-
вирусолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Том-
ской области»
Адрес: ул. Елизаровых, 42, г. Томск, 634012
Тел.: +7 (3822) 444731, 266112
Факс: +7 (3822) 444731
e-mail virsesto@mail.tomsk.ru; virlab634@mail.ru

Косилко Сергей Александрович, к.м.н., зав.
отделом эпидемиологии
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047,
Россия
Тел.: +7 (3952) 220143
Факс: +7 (3952) 220040
e-mail epidotdel.irk@mail.ru

Косогова Татьяна Алексеевна, к.б.н., с.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559

e-mail kosogova@vector.nsc.ru

Кострыкина Татьяна Владимировна, зам. начальника отдела эпидемиологического надзора
Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю

Адрес: ул. Каратанова, д. 21, г. Красноярск, 660049

Тел.: +7 (391) 226-89-62, 226-89-50 (многоканальный)

Факс: +7 (391) 227-55-07, 226-90-49

e-mail oen@24.rospotrebnadzor.ru

Кравцов Александр Леонидович, д.б.н., в.н.с. ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Университетская, 46, Саратов, 410005, Россия

Тел.: +7 (8452) 26-21-31.

Факс: +7 (8452) 51-52-12.

e-mail rusrapi@microbe.ru

Кривошеин Владимир Михайлович, зав. паразитологическим отделением, врач-эпидемиолог, врач-паразитолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области»

Адрес: ул. Трилисера, 51, Иркутск, 664047

Тел.: +7 (395) 2-23-95-13

Факс: +7 (395) 2-23-13-71

e-mail epid@sesoirk.irkutsk.ru

Кучукова Вера Федоровна, зам. главного врача
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай»

Адрес: пр. Коммунистический, 173, Горно-Алтайск, Республика Алтай, 649002

Тел./факс: +7 (388-22) 6-42-27

e-mail gti@mail.gorny.ru

Лахтин Владимир Михайлович, д.б.н., гл.н.с. ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Адмирала Макарова, 10, Москва, 125212

Тел.: 7 (495) 452-18-16

Факс: 7 (495) 452-18-30

e-mail lakhtinv@yandex.ru

Лебедев Леонид Рудольфович, д.м.н., зав. лабораторией
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск

Новосибирской обл., 633010

Тел.: +7 (383) 363-80-14

Факс: +7 (383) 363-80-16

e-mail Lebedev_lr@vector.nsc.ru

Лебедева Людмила Андреевна, начальник отдела эпидемиологического надзора
Управление Роспотребнадзора по Томской области

Адрес: проспект Фрунзе, 103а, Томск, 634021

Тел.: +7 (3822) 44 -23-61

Факс: +7 (3822) 26-26-78

e-mail Kolbysheva_vk@70.rospotrebnadzor.ru

Левченко Дарья Александровна, м.н.с. ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Тел.: +7 (863) 240-91-33

Факс: +7 (863) 267-02-23

e-mail Levchenko_da@antiplague.ru

Леонтьева Светлана Александровна, м.н.с. ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Республики, д. 147, Тюмень, 625026

Тел.: +7 (3452) 28-99-92, 28-99-93, доб. 1108

Факс: +7 (3452) 28-99-92, доб. 1900

e-mail saveljushkina@rambler.ru, LTVI1@tniikip.rospotrebnadzor.ru

Липина Анастасия Валерьевна, врач-вирусолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»

Адрес: ул. 27-я Северная, 42А, Омск, 644116

Тел.: +7 (3812) 68-08-37

Факс: +7 (3812) 68-09-91

e-mail fbuz55@mail.omsksanepid.ru

Локтев Валерий Борисович, д.б.н., проф., зав. отделом молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 20-03 или 24-53

Факс: +7 (383) 336-74-09

e-mail loktev@vector.nsc.ru

Макагон Яков Николаевич, главный специалист-эксперт отдела надзора на транспорте и санитарной охране территории

Управление Роспотребнадзора по Кемеровской области

Адрес: пр-т Кузнецкий, 24, Кемерово, 650992

Тел.: +7 (3842) 36-02-94

Факс: +7 (3842) 36-78-47/36-55-27

e-mail ocsenko@42.rosпотребнадzor.ru

Максютов Ринат Амирович, к.м.н., зам. генерального директора по научной работе
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (3952) 22-13-12

Факс: +7 (3952) 22-01-40

e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Малыгина Тамара Олеговна, руководитель
отдела клеточных технологий

Сибирский филиал ООО «Оптэк»

Адрес: ул. Инженерная, 28, Новосибирск, 630090

Тел.: +7 383 363 76 74 ext. 413

Mob.: +7 913 914 74 87

Факс: +7 383 363 76 75

Hot line: 8 800 2000 567

e-mail malygina@optecgroup.com

www.optecgroup.com

Мамадалиев Сейдиганбар Мамадалиевич,

д.в.н., проф., зав. отделом науки

Центральная референтная лаборатория

Адрес: Алматы, Казахстан

e-mail am_dmitr@mail.ru

Матвеев Андрей Леонидович, м.н.с.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: пр. Ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090

Тел.: +7 (383) 363-51-37

Факс: +7 (383) 363-51-53

e-mail guterus@gmail.com

Матвеев Алексей Валерьевич, к.б.н., зав.
лабораторией иммунохимии

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной»
Роспотребнадзора

Адрес: ул. Малая Ямская, 71, Нижний Новгород, 603950

Тел.: +7 (831) 469-79-56

Факс: +7 (831) 469-79-24

e-mail aleksei_matveichev@list.ru

Медведева Нина Владимировна, зав. эпидемиологическим отделом

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Кемеровской области»

Адрес: Пр. Шахтеров, д. 20, Кемерово, 650002

тел: +7 (384-2) 64-30-00, 8 (384-2) 64-11-50

факс: +7 (384-2) 64-20-62

e-mail fguzko@mail.ru

Мельникова Ольга Витальевна, к.б.н., с.н.с.
лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047, Россия

Тел.: +7 (3952) 22-0-139

Факс: +7 (3952) 22-01-40

e-mail melnikovaovit@gmail.com

Михайлов Леонид Михайлович, к.м.н., зав.
отделом зоонозных инфекций

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. Трилиссера, 78, г. Иркутск, 664047, Россия

Тел.: +7 (3952) 22-13-12

Факс: +7 (3952) 22-01-40

e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Михалева Татьяна Юрьевна, главный врач
ПЧС

ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия

Тел.: +7 (383) 306-13-45

e-mail tay1969@list.ru

Монгуш Ольга Сереновна, зам. руководителя
Управления Роспотребнадзора по Республике Тыва

Адрес: Ул. Калинина, д. 116, Кызыл, Республика Тыва

Тел.: +7 (39422) 52-604

Факс: +7 (39422) 56-463

e-mail turpn@tuva.ru

Морозова Вера Витальевна, с.н.с., к.б.н.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090

Тел.: +7 (383) 363-51-31

Факс: +7 (383) 363-51-53

e-mail vera_morozova@ngs.ru, morozova@niboch.nsc.ru

Морозова Елена Николаевна, директор
Сибирский филиал ООО «Оптэк»

Адрес: ул. Инженерная, 28, Новосибирск, 630090

Тел.: +7 (383) 363-76-74

Факс: +7 (383) 363-76-75

e-mail office-nsk@optecgroup.com

Муранкина Виктория Рамилевна, лаборант-исследователь

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 22-41

Нечаева Елена Августовна, к.м.н., зам. генерального директора по научной и производственной работе. зав. отделом клеточных технологий

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел./факс: +7 (383) 336-64-81

e-mail nechaeva@vector.nsc.ru

Нечитайло Олег Вячеславович, стажер-исследователь

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

e-mail nechitaylo_ov@vector.nsc.ru

Нешумаев Дмитрий Александрович, к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики Краевое государственное автономное учреждение здравоохранения «Красноярский краевой Центр профилактики и борьбы со СПИД»

Адрес: ул. Карла Маркса, д. 45, Красноярск, 660049
Тел.: +7 (391) 226 84 00 главный врач; +7 (391) 226 84 15, лаборатория +7 (391) 212 11 67
e-mail office@aids.krsn.ru; neshumaev@inbox.ru

Низоленько Лилия Филипповна, к.б.н., с.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 27-27

Факс: +7 (383) 336-74-09

e-mail nizolenko@vector.nsc.ru

Новоселова Маргарита Владимировна, начальник отдела эпидемиологического надзора Управление Роспотребнадзора по Кемеровской области

Адрес: пр-т Кузнецкий, 24, г. Кемерово, 650992

Тел.: +7 (3842) 36-68-46

Факс: +7 (3842) 36-78-47/36-55-27

e-mail ocsenko@42.rospotrebnadzor.ru

Овчинникова Алёна Сергеевна, м.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

e-mail zamedyanskaya_as@vector.nsc.ru

Ондар Снежана Ким-ооловна, зав. отделом обеспечения эпидемиологического надзора ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Тыва»

Адрес: ул. Калинина, д. 116, г. Кызыл, Республика Тыва, 667010

Тел.: +7 (394 22) 5 46 06

Факс: +7 (394 22) 5 21 45

e-mail 2statistika@mail.ru, priem@17cgie.ru, Sergo-Liza86@mail.ru

Орловский Владимир Геннадьевич, врач инфекционист

ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия

Тел.: +7 (383) 336-70-50

e-mail msch163@fmbamail.ru

Пельмская Светлана Георгиевна, врач-эпидемиолог

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае»

Адрес: ул. 26 Бакинских комиссаров, д. 29, Красноярск, 660004

Тел.: +7 (391) 202-58-26

Факс: +7 (391) 264-16-78

e-mail eo_fguz@24.rospotrebnadzor.ru

Писаренко Сергей Владимирович, к.х.н., с.н.с. лаборатории биохимии

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия

Тел./факс: +7 (8652) 26-03-12

e-mail snipchi@mail.stv.ru

Прислегина Дарья Александровна, м.н.с. лаборатории эпидемиологии

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия

Тел.: +7 (8652) 26-03-83

Факс: +7 (8652) 26-03-12

e-mail snipchi@mail.stv.ru

Пучкова Лариса Ивановна, к.б.н., в.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
e-mail puchkova@vector.nsc.ru

Ребещенко Анна Петровна, и.о. зав. лабораторией математического моделирования и эпидемиологического анализа
ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Республики, 147, Тюмень, 625026
Тел.: +7 (3452) 28-99-92 доб. 1020
Тел./факс: +7 (3452) 28-99-92
e-mail RebeschenkoAP@Tniikip.rosпотребнадзор.ru

Рогинская Ольга Альбертовна, врач-эпидемиолог
ГБУЗ НСО ГП № 29
Адрес: ул. Тюленина, 9, Новосибирск, 630061
Тел.: +7 (383) 270-24-87
Факс: +7 (383) 274-10-56
e-mail albertishna@yandex.ru

Рудометов Андрей Павлович, аспирант, отдел биоинженерии
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 26-13
e-mail rudometov_ap@vector.nsc.ru

Рындюк Наталья Николаевна, зам. начальника по медицинской части
ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия
Тел.: +7 (383) 336-71-03
e-mail health70@mail.ru

Сабитова Юлия Валерьевна, инженер 1 категории
ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
Адрес: пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090
Тел.: +7 (383) 363-51-31
Факс: +7 (383) 363-51-53
e-mail sabitova@ngs.ru

Савина Елена Владимировна, м.н.с.
ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Голубинская, 7, Волгоград, 400131,

Россия
Факс: +7 (8442) 39-33-36
e-mail vari2@sprint-v.com.ru

Савченко Анна Петровна, м.н.с.
ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия
Тел.: +7 (863) 240-27-03
Факс: +7 (863) 267-02-23
e-mail plague@aaanet.ru

Сафатов Александр Сергеевич, д.т.н., зав. отделом
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
e-mail safatov@vector.nsc.ru

Селюнина Даметкен Васильевна, врач эпидемиолог
ФГБУЗ МСЧ № 163 ФМБА России
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия
Тел.: +7 (383) 306-40-20
e-mail epid163@mail.ru

Сергеев Артемий Александрович, к.м.н., зав. лабораторией
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00 доп. тел. 22-31
Факс: +7 (383) 336-74-09
e-mail aasergeev@vector.nsc.ru

Сидорова Елена Александровна, врач-вирусолог лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, г. Иркутск, 664047, Россия
Тел.: +7 (3952) 22-01-35
Факс: +7 (3952) 22-01-40
e-mail sidorovavirusolog@yandex.ru

Слукин Павел Владимирович, м.н.с.
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: пос. Оболенск Серпуховского р-на Московской обл., 142279
e-mail xorgi@yandex.ru

Соколов Юрий Владимирович, и. о. главного врача

ГБУЗ Новосибирской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИД»

Адрес: корпус № 20 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559, Россия

Тел.: +7 (383) 336-75-10, 363-65-82

e-mail topnsk@mail.ru

Суковатицын Андрей Юрьевич, главный специалист-эксперт

Управление Роспотребнадзора по Томской области

Адрес: просп. Фрунзе, 103а, Томск, 634021

Тел.: +7 (3822) 44-58-52

Факс: +7 (3822) 26-26-78

e-mail Kolbysheva_vk@70.rospotrebnadzor.ru

Сысоева Галина Михайловна, в.н.с.

ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

e-mail sysoeva_gm@vector.nsc.ru

Татаренко Юлия Сергеевна, лаборант

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. Голубинская, 7, г. Волгоград, 400131, Россия

Факс: (8442) 39-33-36

e-mail vari2@sprint-v.com.ru

Теплякова Тамара Владимировна, д.б.н., зав. лабораторией

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

e-mail teplyakova@vector.nsc.ru

Тецлав Елена Валерьевна, главный специалист-эксперт

Западно-Сибирский территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту

Адрес: ул. Саратовская, 13, г. Новосибирск, 630003, Россия

Тел./факс: +7 (383) 229-35-23

e-mail teclav@mail.ru

Тикунова Нина Викторовна, д.б.н., доцент, зав. лабораторией

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: пр. Ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

Тел.: +7 (383) 363-51-57

Факс: +7 (383) 363-51-53

e-mail tikunova@niboch.nsc.ru

Титова Ксения Александровна, м.н.с.

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел.: 22-31

e-mail titova_ka@vector.nsc.ru

Титова Светлана Викторовна, к.м.н., директор

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: ул. М. Горького, 117/40, Ростов-на-Дону, 344002, Россия

Тел.: +7 (863) 240-79-08

Факс: (863) 267-02-23

e-mail plague@aanet.ru

Ткачев Сергей Евгеньевич, к.б.н., м.н.с.

ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Адрес: пр. Ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

Тел.: +7 (383) 363-51-37

Факс: 8 (383) 363-51-53

e-mail tkachev@niboch.nsc.ru

Толмачева Татьяна Анатольевна, главный специалист-эксперт

Управление Роспотребнадзора по Алтайскому краю

Адрес: ул. М. Горького, 28,, Барнаул, Алтайский край, 656056

Тел.: +7 (3853) 24-99-66

Факс: +7 (3852) 24-99-49

e-mail epid@22.rospotrebnadzor.ru

Тотменин Алексей Владимирович, к.б.н., зав. лабораторией

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559

Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 21-14

e-mail totmenin@vector.nsc.ru

Удовенко Анастасия Валерьевна, врач эпидемиолог

ГБУЗ НСО «ГКБ № 1»

Адрес: ул. Залесского, 6, Новосибирск, 630047

Тел.: +7 (383) 226-95-83

e-mail evchernova@ngs.ru

Ульшина Диана Васильевна, м.н.с. лаборатории биохимии

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Советская, д.13-15, Ставрополь, 355035, Россия
Тел./факс: +7 (8652) 26-03-12
e-mail snipchi@mail.stv.ru

Унагаева Наталья Владимировна, м.н.с.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559, Россия
e-mail unagaeva_nv@vector.nsc.ru

Устюжанин Александр Владимирович,
зав. лабораторией ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Летняя 23, Екатеринбург, 620030, Россия
Тел./факс: +7 (343) 261-99-47
e-mail Ust103@yandex.ru

Уфимцева Елена Геннадьевна, к.б.н., с.н.с.
ФГБНУ НИИ биохимии
Адрес: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117
Факс: +7 (383) 333-67-58
e-mail <ufiml@ngs.ru>

Филатова Елена Николаевна, к.б.н., в.н.с.,
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Малая Ямская, 71, Нижний Новгород, 603950
Тел.: +7 (831)4697946
Факс: +7 (831)4697920
e-mail filatova@nniem.ru

Фоменко Наталия Владимировна, к.б.н.,
с.н.с. лаборатории ПЦР
ЗАО «Вектор-Бест»
Адрес: ул. Пасечная, 3, Новосибирск, 630128
e-mail nataliyaf@ngs.ru

Хвостова Нина Александровна, зав. вирусологической лабораторией, врач-вирусолог
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Хакасия»
Адрес: ул. Ленина, д. 66, Абакан, Республика Хакасия, 655017, Россия
Тел.: +7 (3902) 22-77-68
Факс: +7 (3902) 22-65-00
e-mail kadr.ses.abakan@yandex.ru

Хлусевич Яна Александровна, м.н.с.
ФГБНУ Институт химической биологии и фун-

даментальной медицины СО РАН
Адрес: пр. Ак. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090
Тел.: +7 (383) 363-51-37
Факс: +7 (383) 363-51-53
e-mail khlusevichjana@mail.ru

Худякова Инесса Алексеевна, зав. эпид. от-делом, врач эпидемиолог
Западно-Сибирский Дорожный филиал ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии по ж.д. транспорту»
Адрес: ул. Саратовская,13, Новосибирск, 630003
Тел.: +7 (383) 229-35-04
e-mail inskajases@mail.ru

Цыпленкова Елена Сергеевна, м.н.с.
ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: ул. Химзаводская, 9, а/я 112, Бердск Новосибирской обл., 633010
Тел.:+7 (38341) 5-80-91
Факс: +7 (38341) 5-80-88
e-mail tsyplenkova_es@vector.nsc.ru

Черкашина Елена Николаевна, главный специалист-эксперт
Управление Роспотребнадзора по Алтайскому краю
Адрес: ул. М. Горького, 28,, Барнаул, Алтайский край, 656056
Тел.: +7 (3853) 24-88-74
Факс: +7 (3852) 24-99-49
e-mail epid@22.rospotrebnadzor.ru

Чернышова Людмила Юрьевна, зав. отделом эпидемиологии
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области»
Адрес: ул. Фрунзе, 84, Новосибирск, 630099
Тел.: +7 (383) 224-58-38
Факс: +7 (383) 224-58-38
e-mail cgns@cn.ru

Чеснокова Маргарита Валентиновна, д.м.н., проф., зав. отделом научного и учебно-методического обеспечения
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилиссера, 78, Иркутск, 664047, Россия
Тел.: +7 (3952) 22-13-12
Факс: +7 (3952) 22-01-40
e-mail adm@chumin.irkutsk.ru

Чикаев Антон Николаевич, н.с., отдел бион-

женерии
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл.,
630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 26-13
e-mail chikaev_an@vector.nsc.ru

Чоодур Елизавета Степановна, врач-эпидемиолог отдела обеспечения эпидемиологического надзора
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Тыва»
Адрес: ул. Калинина, д. 116, г. Кызыл, Республика Тыва, 667010
Тел.: +7 (394 22) 5 46 06, 54493
Факс: +7 (394 22) 5 21 45
e-mail 2statistika@mail.ru, priem@17cgie.ru, Sergo-Liza86@mail.ru

Шепелин Анатолий Прокопьевич, д.б.н., член комиссии РСПП по фарм. мед. пром-сти, зам. директора
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: пос. Оболенск Серпуховского р-на Московской обл., 142279
e-mail shepelin@obolensk.org

Шишкина Лариса Николаевна, д.б.н., с.н.с., зав. отделом профилактики и лечения особо опасных инфекций
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 21-13
e-mail shish@vector.nsc.ru

Яковчиц Николай Васильевич, м.н.с. лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилисера, 78, Иркутск, 664047, Россия
Тел.: +7 (3952) 22-01-35
Факс: +7 (3952) 22-01-40
e-mail nyakovchits@gmail.com

Якубицкий Станислав Николаевич, м.н.с. ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 23-09
e-mail yakubizkiy@vector.nsc.ru

Ястремская Ксения Юрьевна, м.н.с. ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: ул. Трилисера, 78, Иркутск, 664047, Россия e-mail: kseka13@mail.ru

Яшина Людмила Николаевна, д.б.н., зав. лабораторией
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Адрес: р.п. Кольцово Новосибирской обл., 630559
Тел.: +7 (383) 363-47-00, вн. тел. 2467
Факс: +7 (383) 336-74-09
e-mail yashina@vector.nsc.ru

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
ДИАГНОСТИКА И ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

МАТЕРИАЛЫ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

Ответственная за выпуск:

Н.А. Маркович

Фото на обложке А.Г. Сидорчука

Подписано в печать 12. 09. 2016. Формат 60Х84/8 Печать офсетная. Бумага офсетная.

Уч.-изд. л. 32, усл. печ. л. 31. Тираж 200 экз. Заказ № 30

Отпечатано в типографии «Ареал», 630056, г. Новосибирск, ул. Софийская, 16.