

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 1968 году

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

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

Выпуск 3

2016

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.А.Бугоркова, докт. мед. наук
З.Л.Девдариани, докт. мед. наук, профессор
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук
Т.Б.Караваева (отв. секретарь), канд. мед. наук
Е.В.Куклев, докт. мед. наук, профессор
Н.И.Микшис, докт. мед. наук
М.Н.Ляпин, канд. мед. наук
А.В.Осин, канд. биол. наук
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор
С.А.Щербакова, докт. биол. наук
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 2016

2016, Issue 3

Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]

Scientific and Practical Journal
Issued quarterly. Founded in 1968

Problems of Particularly Dangerous Infections is published by Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Editor-in-Chief

Kutyrev V.V., Member of the RAS,
Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Board

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

Editorial Council

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

Editorial Office Address:

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

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

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

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

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

Пробл. особо опасных инф. 2016. Вып. 3. 1–100

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

Подписано в печать 12.09.16. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,25. Гарнитура Таймс. Заказ 927
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

Обзоры

- Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред 5
- Куклева Л.М., Бойко А.В. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. 13
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Боярская Н.В., Борисевич С.В. Диагностика острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом – болезни, вызываемой новым флебовирусом 21

Эпидемиология

- Евченко Ю.М., Шаяхметов О.Х., Дубянский В.М., Таран Т.В., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Власов А.В., Белогрудов В.А., Мозлов Г.А., Грижебовский Г.М., Куличенко А.Н. Особенности формирования иммунологической структуры носителей в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы 27
- Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Поршаков А.М., Князева Т.В., Краснов Я.М., Мокроусова Т.В., Новичкова Л.А., Анисимова Л.В. Характеристика энтомопаразитических нематод блох мелких грызунов 32
- Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Шилов М.М. Изменение границ природных очагов чумы Северо-Западного Прикаспия 38
- Онищенко Г.Г., Игнатьева М.Е., Будацыренова Л.В., Михайлов М.И. Эффективность вакцинопрофилактики гепатита А в Республике Саха (Якутия) 44

Микробиология

- Касьян Ж.А., Осина Н.А., Щербаклова С.А. Разработка тест-системы для дифференциации видов бруцелл методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени 47
- Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Пономарева А.С., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Анализ стабильности генотипа *Vibrio cholerae* в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ 52
- Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Незнамова А.В., Кузютина Ю.А., Агеева Н.П., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Особенности идентификации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 Compact 30 57
- Найденова Е.В., Пьянков С.А., Крицкий А.А., Касьян Ж.А., Раздорский А.С., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Чаусов Е.В., Sylla A.L., Boumbaly S., Ibrachim N., Diallo M.G., Sow I.S., Barry M., Щербаклова С.А., Воиро М.И., Кутырев В.В. Выявление специфических антител к арбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих в провинции Киндия, Гвинейская Республика 62
- Осин А.В., Червякова Н.С., Валова Т.В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов 66

Reviews

- Gracheva I.V., Osin A.V. Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media 5
- Kukleva L.M., Boiko A.V. Plasminogen Activator – Multifunctional Protein of Plague Pathogen 13
- Sizikova T.E., Lebedev V.N., Boyarskaya N.V., Borisevich S.V. Diagnostics of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome – Disease, Caused by Novel Phlebovirus 21

Epidemiology

- Evchenko Yu.M., Shayakhmetov O.Kh., Dubyansky V.M., Taran T.V., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Vlasov A.V., Belogrudov V.A., Mozlov G.A., Grizhebovsky G.M., Kulichenko A.N. Peculiarities of Immunological Structure Formation in Plague Carriers of the Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus 27
- Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Porshakov A.M., Knyazeva T.V., Krasnov Ya.M., Mokrousova T.V., Novichkova L.A., Anisimova L.V. Characteristics of Entomoparasitic Nematodes of Small Rodent Fleas 32
- Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.V., Chekashov V.N., Shilov M.M. Boundary Changes of Natural Plague Foci in the North-Western Pre-Caspian 38
- Onishchenko G.G., Ignat'eva M.E., Budatsyrenova L.V., Mikhailov M.I. Effectiveness of Preventive Vaccination against Hepatitis A in the Republic of Sakha (Yakutia) 44

Microbiology

- Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. Development of the Test-System for Differentiation of *Brucella* Species, Using Real-Time PCR 47
- Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency 52
- Molchanova E.V., Lopasteiskaya Ya.A., Neznamova A.V., Kuzutina Yu.A., Ageeva N.P., Zakharova I.B., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Peculiarities of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* Identification Using Microbiological Analyzer Vitek 2 Compact 30 57
- Naydenova E.V., P'yankov S.A., Kritsky A.A., Kas'an Zh.A., Razdorsky A.S., Lopatin A.A., Safronov V.A., Chausov E.V., Sylla A.L., Boumbaly S., Ibrachim N., Diallo M.G., Sow I.S., Barry M., Shcherbakova S.A., Boiro M.I., Kutyrev V.V. Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of Persons Residing in Kindia Province, the Republic of Guinea 62
- Osin A.V., Chervyakova N.S., Valova T.V. Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained 66

Пьянков С.А., Пьянков О.В., Найденова Е.В., Агафонов А.П., Boiro M.Y., Solodkiy V.V., Zaykovskaya A.V., Maksimov N.L., Marennikova S.S., Bocharov E.F., Ofitserov V.I., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A., Demina Yu.V., Kutyrev V.V., Mikheev V.N. Опыт использования метода ИФА для выявления антител к вирусу Эбола при работе бригады СПЭБ в Гвинейской Республике

71

Титова С.В., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Лысова Л.К., Архангельская И.В., Дуванова О.В., Миронова А.В., Самородова А.В., Москвитина Э.А. Влияние условий культивирования на сроки персистенции и некоторые свойства холерных вибрионов

76

Биотехнология, иммунология

Волох О.А., Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Миронова Н.П., Бибилов Д.Н., Никифоров А.К. Совершенствование технологии получения живой туляремийной вакцины

81

Девдариани З.Л., Сырова Н.А., Михеева Е.А., Терехова И.В., Ермаков Н.М., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В. Конструирование и медицинские испытания моноклональной иммуноферментной тест-системы для выявления капсулосодержащих штаммов чумного микроба «ИФАПестФ1-М»

85

Степанов А.В., Майоров Н.В., Осина Н.А., Никифоров А.К. Пути оптимизации синтеза олигонуклеотидов при производстве препаратов для генной диагностики особо опасных инфекционных болезней

90

Краткие сообщения

Никитин А.Я., Андаев Е.И., Сидорова Е.А., Алленов А.В., Гордейко Н.С., Зверева Т.В., Морозов И.М., Балахонov С.В. Эпизоотологический мониторинг и прогноз риска проявления инфекций, передающихся иксодовыми клещами, на о. Русском в 2016 г. (Приморский край)

95

Юбилей

К 70-летию со дня рождения Виталия Аксеновича Агапова

98

Памяти коллеги

Памяти Геннадия Ивановича Лямкина

99

Памяти Инны Васильевны Рыжко

99

Правила для авторов

100

P'yankov S.A., P'yankov O.V., Naydenova E.V., Agafonov A.P., Boiro M.Y., Solodkiy V.V., Zaykovskaya A.V., Maksimov N.L., Marennikova S.S., Bocharov E.F., Ofitserov V.I., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A., Demina Yu.V., Kutyrev V.V., Mikheev V.N. Experience of Application of the ELISA Method for Detection of Antibodies to Ebola Virus during the SAET Team Work in the Republic of Guinea

Titova S.V., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Lysova L.K., Arkhangel'skaya I.V., Duvanova O.V., Mironova A.V., Samorodova A.V., Moskvitina E.A. Impact of Cultivating Environment on the Terms of Persistence and Certain Properties of Cholera Vibrios

Biotechnology, Immunology

Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Enhancement of the Technology for Live Tularemia Vaccine Production

Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Construction and Medical Trials of Monoclonal Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Encapsulated Plague Agent Strains, "EIAPESTF1-M"

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Osina N.A., Nikiforov A.K. Approaches to Optimization of Oligonucleotide Synthesis during Manufacturing of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Brief Communication

Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Sidorova E.A., Allenov A.V., Gordeiko N.S., Zvereva T.V., Morozov I.M., Balakhonov S.V. Epizootological Monitoring and Forecast of the Risks Associated with Infections, Transmitted by Ixodidae Ticks, on the Island Russky in 2016 (Primorsk Territory)

Anniversaries

To the 70-th the Anniversary of Vitaly A. Agapov

Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Gennady I. L'amkin

Of blessed memory of Inna V. Pyzhko

Instruction to Authors

И.В.Грачева, А.В.Осин

МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ БАКТЕРИЙ ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЗАЩИТНЫХ СРЕД

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

В работе рассмотрены современные представления о механизмах и факторах повреждений бактериальных клеток при лиофилизации и хранении сухих препаратов, представлены сведения о наиболее эффективных лиопротекторах и механизмах их защитного действия. Лيوфилизация или высушивание из замороженного состояния – основной метод консервации бактерий в коллекциях культур и биологических ресурсных центрах. В процессе лиофилизации клетки подвергаются действию повреждающих стрессовых факторов. Низкие температуры, кристаллизация воды, осмотический стресс, изменения pH растворов, дегидратация вызывают повреждения клеточных структур и молекул. Окислительные реакции, протекающие в препаратах сухих клеток, изменяют состав и структуру липидов, белков, нуклеиновых кислот и, как следствие, снижают количество живых клеток при хранении. Одним из главных факторов, влияющим на жизнеспособность бактерий после лиофилизации и хранения, является состав защитной среды, с которой смешивают клетки перед консервацией. Использование защитных сред, содержащих углеводы, аминокислоты, восстановленное молоко, желатин и другие компоненты снижает вероятность повреждений клеточных компонентов, увеличивает гарантированный срок хранения бактерий.

Ключевые слова: лиофилизация, бактерии, коллекции культур, защитные среды, жизнеспособность, повреждения.

Корреспондирующий автор: Грачева Ирина Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

I.V.Gracheva, A.V.Osin

Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media

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

Considered are the current views on the mechanisms and factors of bacterial cell degradation during lyophilization and storage of dry preparations. Given are the data on the most effective lyo-protectors and mechanisms of their shielding action. Lyophilization or sublimation from the frozen state is the basic method of bacteria preservation in culture collections and biological resource centers. In the process of lyophilization cells are exposed to damaging stress factors. Low temperatures, water crystallization, osmotic process, pH alterations, and dehydration affect cell cultures and molecules. Oxidative reactions, running in dry cell preparations, change the composition and structure of lipids, proteins, nucleic acids, and, thereby reduce the number of living cells during the storage. One of the key factors that influences bacterial viability after lyophilization and storage is the composition of shielding medium, with which the cells are mixed up before conservation. Utilization of protective media, containing carbohydrates, amino acids, restored milk, gelatin and other components, decreases the probability of cell elements damaging and extends the assured storage life.

Key words: lyophilization, bacteria, culture collections, shielding media, viability, damage.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Irina V. Gracheva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Gracheva I.V., Osin A.V. Mechanisms of Damaging Bacteria during Lyophilization and Protective Activity of Shielding Media. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:5–12. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12

Один из основных принципов поддержания бактерий в коллекционных центрах заключается в минимизации количества генераций штамма от момента его поступления в коллекцию до выдачи заявителю. Для этого разработаны способы хранения бактерий в течение длительного времени без пересевов. Лيوфилизация (синонимы – сублимационное высушивание, высушивание из замороженного состояния) является одним из двух методов консервации, рекомендованных для длительного хранения бактерий в биологических ресурсных центрах и коллекциях культур [21]. Многие известные бактериальные виды сохраняют жизнеспособность после 50 лет хранения в высушенном состоянии [2, 3, 29]. Даже единичные

живые клетки, сохранившиеся в сухих препаратах, после подтверждения их аутентичности могут быть использованы для получения следующей генерации штамма. Кроме того, высушивание позволяет получить бактериальный препарат в форме, удобной для пересылки потребителю.

За период, прошедший после первых экспериментов по высушиванию бактерий, усовершенствованы оборудование и технологии, определены факторы, влияющие на жизнеспособность клеток после консервации и хранения. Вместе с тем выживаемость некоторых видов после лиофилизации остается низкой. Результаты совместных исследований четырех ведущих Европейских коллекций культур, посвящен-

ных разработке протоколов лиофилизации бактерий, чувствительных к высушиванию, позволили сделать два важных вывода [33]. Во-первых, идея разработки единого протокола высушивания, одинаково эффективного для всех бактериальных видов, вероятно, утопична. Во-вторых, главным из варьируемых факторов, влияющим на выживание бактерий при высушивании, является состав протективной среды, с которой смешивают клетки перед консервацией.

Подбор защитных сред проводят эмпирически. Это в значительной степени связано с тем, что полностью не определены механизмы повреждения бактериальных клеток при высушивании и хранении сухих препаратов так же, как и механизмы защитного действия лиопротекторов, представления о которых находятся на уровне предположений. Далеки от решения и вопросы, связанные с причинами неодинаковой устойчивости бактерий разных родов, видов и даже штаммов к высушиванию в лабораторных условиях [2, 3, 12, 29, 33].

В работе рассмотрены современные представления о механизмах и факторах повреждений бактерий при сублимационном высушивании и последующем хранении сухих препаратов, представлены сведения о наиболее эффективных лиопротекторах и вероятных механизмах их защитного действия.

Механизмы повреждений бактерий при сублимационном высушивании и хранении сухих препаратов

Ллиофилизация позволяет сохранять бактерии в жизнеспособном состоянии в течение длительного, но ограниченного периода. Это связано, во-первых, с гибелью части популяции в процессе консервации. Во-вторых, при хранении сухих препаратов происходит снижение количества жизнеспособных клеток. Сублимационное высушивание – сложный технологический процесс, включающий 3 основных этапа: замораживание клеточной суспензии; первичная сушка, в течение которой замороженная вода удаляется при субнулевых температурах; вторичная сушка, при которой из визуально сухого препарата при положительных температурах удаляется незамороженная вода, прочно связанная с биомолекулами. Повреждения клеток, включая летальные, могут происходить на каждом этапе сублимационного высушивания и при хранении [4].

Повреждения бактерий при замораживании.

Перед высушиванием клеточные суспензии охлаждают до температуры ниже точки полного замораживания защитной среды. Несмотря на то, что сегодня известны основные физико-химические факторы, повреждающие бактерии при замораживании, детально процессы, происходящие в разных типах клеток при разных условиях консервации, до конца неясны и поэтому в литературе обсуждаются несколько моделей криоповреждений – повреждений, вызванных кристаллизацией воды [4, 6, 17, 18, 20, 23].

Наиболее признанной является двухфакторная теория криоповреждений, в соответствии с кото-

рой причины гибели клеток зависят от скорости их охлаждения. При низкой скорости охлаждения большая часть клеток погибает на этапе замораживания от длительного воздействия холодного осмотического шока [6, 17, 20]. Кристаллизация воды изменяет физико-химические свойства растворов – концентрацию, pH, вязкость. Методами электронной криомикроскопии показано, что при охлаждении клеточных суспензий до субнулевых температур между кристаллами льда формируются каналы со сконцентрированным замораживанием раствором и бактериальными клетками [6, 18]. По мере кристаллизации воды концентрация внеклеточного раствора повышается. Так, замораживание раствора 10 % глицерина со скоростью 5 °C мин⁻¹ приводит к повышению его концентрации до 54 % при температуре стеклоперехода –51 °C, а замораживание физиологического раствора к повышению концентрации хлорида натрия до 27 при эвтектической температуре –21 °C [4, 18]. Уменьшение объема клетки, повышение концентрации внутриклеточных солей, фазовые переходы мембранных липидов в ответ на холодовой осмотический шок могут привести к повреждениям белков, клеточных мембран и, как следствие, к гибели бактерий на первом этапе консервации [20, 23].

Изучение динамики гибели бактерий при высоких скоростях охлаждения показывает, что наиболее существенное снижение количества живых клеток происходит на этапе оттаивания вследствие механических повреждений мембран кристаллами внутриклеточного льда, либо осмотического стресса [6, 17, 18]. Протоколы высушивания предусматривают проведение первичной сушки при температуре, исключаяющей оттаивание препарата. Поэтому, с точки зрения выживаемости бактерий после ллиофилизации, оптимальным является быстрое замораживание [43].

Выживаемость бактерий после этапа замораживания варьирует в зависимости от их вида и условий охлаждения [32, 41, 43]. Фактическая выживаемость может отличаться от приводимых в работах результатов, поскольку определить количество живых клеток после замораживания без их оттаивания сегодня невозможно. С другой стороны, необходимо учитывать, что нелетальные повреждения клеток при смешивании с защитной средой и замораживании, которые трудно идентифицировать, могут повышать чувствительность бактерий к стрессовым факторам, действующим на следующих этапах сушки [1].

Повреждения бактерий при дегидратации.

Гибель бактериальных клеток после дегидратации может быть следствием денатурации белков, нуклеиновых кислот, изменения структуры мембранных липидов, клеточной стенки. C.Santivarangkna C. *et al.* методом атомно-силовой микроскопии обнаружены повреждения клеточной стенки *Lactobacillus helveticus* после высушивания [36]. S.B.Leslie. *et al.* описаны отклонения ИК-спектров белков *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* после высушивания, свидетельствующие об изменении их структуры [26]. Однако основ-

ной мишенью повреждения клеток при дегидратации считаются клеточные мембраны [14, 27, 39].

Косвенным доказательством повреждения клеточных мембран является высокая концентрация внутриклеточных компонентов – ферментов, нуклеиновых кислот, электролитов во внеклеточном растворе после регидратации сухих клеток, повышенная чувствительность первых генераций бактерий к антибиотикам [38]. Причиной таких явлений считается временное нарушение проницаемости мембран дегидратированных клеток, связанное с фазовыми переходами мембранных липидов [14].

Как известно, при физиологически оптимальных условиях мембранные липиды связаны с молекулами воды и находятся в жидкокристаллической фазе. Изменение фазового состояния липидов происходит при снижении температуры или уровня гидратации. Когда вода удалена, например, при высушивании, полярные головки фосфолипидов сближаются, что приводит к усилению ван-дер-ваальсовых взаимодействий между соседними углеводородными цепями, снижению текучести мембран и переходу мембранных липидов в фазу геля при комнатной температуре, т.е. высушивание повышает температуру фазовых переходов липидов (T_m – melting temperature), которая зависит от степени их дегидратации [14]. Изменение T_m при изменении уровня гидратации показано методами дифференциальной сканирующей калориметрии, ИК-спектроскопии на моделях липидов, липосом, изолированных мембран и бактериальных клеток [14, 26]. По данным S.B.Leslie *et al.* высушивание *E. coli* повышает T_m мембранных липидов с 10 до 50 °C, т.е. на 40 °C по сравнению с гидратированными клетками, а *B. subtilis* на 37 °C, с 5 до 42 °C [26].

Изменение T_m – обратимый процесс и при регидратации мембранные липиды подвергаются обратному переходу от фазы геля к жидкокристаллической фазе. Фазовые переходы мембранных липидов происходят не одновременно. Наличие липидов в разных фазах в течение временного периода приводит к нарушению структуры и избирательной проницаемости мембран [14]. Если нарушение избирательной проницаемости при дегидратации, когда основная часть воды удалена, не опасно для клеток, то повышенная проницаемость мембран при регидратации в условиях избытка воды может приводить к потере жизненно важных компонентов – ионов, солей, белков, нуклеотидов и, как следствие, к гибели бактерий.

Повреждения мембран после высушивания обнаружены у разных видов бактерий рода *Lactobacillus* методом окрашивания клеток флуоресцентным красителем – пропидиумом иодитом, проникающим в клетки только через поврежденные мембраны [39, 40]. Однако повреждения мембран, вызванные фазовыми переходами, не всегда летальны и при оптимальных условиях регидратации клетки могут восстанавливать их целостность [40].

Повреждения бактерий при хранении. Снижение количества живых клеток в сухих препара-

татах при стандартизированных условиях хранения происходит с относительно постоянной скоростью [29]. Существенное влияние на скорость инактивации оказывают вид упаковки сухих клеток и условия их хранения [25, 29, 32]. Кроме того, скорость инактивации зависит от вида бактерий, остаточной влажности препарата, состава защитной среды [3, 29, 33]. Количество живых клеток в сухих бактериальных препаратах постепенно снижается, даже при оптимальных условиях хранения, например, в герметично запаянных стеклянных ампулах при температуре 2–4 °C [2, 3, 29].

Идентифицировать процессы, протекающие в сухих клетках при хранении, оценить их влияние на гибель бактерий трудно, даже используя современные методы исследования. Имеющиеся на сегодня экспериментальные данные позволяют считать основной причиной гибели бактериальных клеток реакции свободно-радикального окисления, приводящие к повреждениям белков, нуклеиновых кислот, липидов [4]. Бактериальные клетки имеют эффективные ферментные механизмы защиты от повреждений свободными радикалами. Однако высушивание останавливает все метаболические реакции, и клетка становится не защищенной от повреждений.

Свободные радикалы обнаружены в высушенных препаратах бактерий методом электронного парамагнитного резонанса [22, 24]. Концентрация свободных радикалов в сухих препаратах увеличивается при хранении на фоне снижения количества живых клеток. Основной мишенью повреждений клеток при хранении так же, как и при высушивании, являются мембраны [5, 11]. Перекисное окисление липидов – многостадийная свободно радикальная реакция окисления ненасыщенных остатков жирных кислот, вызывающая химические повреждения мембран. Н.Р.Castro *et al.* методом газовой хроматографии обнаружено снижение u/s индекса (соотношение ненасыщенных и насыщенных жирных кислот в составе мембран) при хранении *Lactobacillus bulgaricus*, которое коррелирует со снижением количества живых клеток [11]. После 90 дней хранения *Weissella paramesenteroides* обнаружен конечный продукт окисления липидов – малоновый альдегид [5]. В то же время С.У.Carlsen *et al.*, используя флуоресцентный липидный зонд, не выявили окисления мембранных липидов после 20 дней хранения *Lactobacillus acidophilus*, несмотря на снижение количества живых клеток [10]. Предположено, что, по крайней мере, в начальный период хранения гибель клеток может быть связана с окислением белков или нуклеиновых кислот.

Хотя эксперименты по выяснению причин гибели высушенных бактерий проведены при неоптимальных условиях их хранения – высокой активности воды и температуре, считается, что эти реакции с низкой скоростью протекают при оптимальных условиях и являются одной из причин гибели лиофилизированных клеток [4, 5, 11, 22, 24]. Снижение

скорости инаktivации бактерий, высушенных в присутствии природных и синтетических антиоксидантов, косвенно подтверждает влияние окислительных реакций на гибель бактерий при хранении [5, 24].

Защитные составы для лиофилизации бактерий

Бактериальные виды отличаются по устойчивости к высушиванию в лабораторных условиях. При одинаковых условиях высушивания выживаемость может колебаться от 98 до 1 % и ниже в зависимости от вида [2, 3, 12, 29, 33, 42, 43]. Наиболее устойчивыми являются неподвижные грамположительные бактерии, которые могут быть высушены в воде или буфере без существенной потери жизнеспособности [29]. Наименее устойчивыми являются грамотрицательные подвижные бактерии родов *Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Azotobacter*, *Campylobacter*, *Flavobacterium*, *Helicobacter*, *Photobacterium*, *Vibrio* [12, 16, 29, 33, 34, 41]. Анализ скоростей инаktivации бактерий, представителей более 40 родов, хранящихся в Международном патентном депозитории организмов Национального института передовых промышленных технологий и исследований Японии в высушенном состоянии в течение 20 лет, показал отсутствие существенных различий в выживаемости бактерий внутри одного рода [29]. Стандартные отклонения от среднего значения выживаемости видов внутри рода не более $\pm 29,4$. Вместе с тем патогенные виды менее устойчивы при высушивании и хранении, чем непатогенные представители того же рода. Поэтому коллекциям культур рекомендуется адаптировать стандартные протоколы лиофилизации к определенным бактериальным видам, а в случае сервисных коллекций, поддерживающих большое число прокариотических видов, к отдельным родам или таксономическим группам более высокого ранга [33, 35].

Протективные среды должны защищать клетки от повреждений при замораживании, дегидратации, хранении, быть легко высушиваемыми, хорошо растворяться при регидратации, не обладать токсичностью [4]. Большинство защитных составов, рекомендованных для лиофилизации, замораживаются в виде аморфно-кристаллической массы, состоящей из кристаллов воды и остеклованного раствора протектора с включенными в его состав клетками [19, 32]. Считается, что вещества, способные остекловываться при замораживании и сохранять твердое аморфное состояние при высушивании, наиболее эффективны для сохранения биологических материалов в высушенном состоянии [4, 15, 25, 30, 32]. Кристаллизация крио- и лиопротекторов при замораживании и высушивании рассматривается как одна из причин низкой выживаемости бактерий [30, 43].

Спектр эффективных лиопротекторов, соответствующих вышеуказанным свойствам, ограничен – углеводы, некоторые аминокислоты, восстановленное молоко, сыворотки крови, желатин. Комбинации этих соединений в различных концентрациях обе-

спечивают разнообразие защитных составов, используемых в экспериментальных исследованиях и рекомендуемых руководствами по консервации бактерий [3, 9, 12, 13, 16, 33, 34, 42, 43]. Как правило, для лиофилизации используют многокомпонентные составы, включающие вещества с разным механизмом защитного действия.

Важными для разработки протоколов высушивания являются теплофизические свойства защитных составов – температура стеклоперехода T_g' и температура «краха» T_c [16, 19]. T_g' (glass transition temperature) – температура, при которой сконцентрированный замораживанием раствор переходит в твердое некристаллическое состояние. Наибольшая выживаемость после высушивания отмечается, если бактериальную суспензию замораживают до температуры ниже T_g' защитной среды [32, 41]. T_c (collapse temperature) – максимальная температура высушивания, предотвращающая разрушение структуры препарата, сформированной при замораживании [19]. Если в течение первичной сушки температура высушиваемого препарата поднимается выше T_c , происходит его вспенивание – явление, называемое «крах» (collapse).

Углеводы. Защитные свойства низкомолекулярных углеводов при высушивании бактерий подтверждены многочисленными исследованиями [2, 3, 7, 13, 25, 37, 40, 41, 42]. Наиболее эффективными лиопротекторами являются дисахариды [13, 25, 39, 41, 43]. Защитные свойства моносахаров при высушивании и особенно хранении бактерий в высушенном состоянии ниже, чем дисахаридов. Так, выживаемость *Oenococcus oeni* после высушивания в 10 % растворах трегалозы, сахарозы, лактозы, мальтозы, фруктозы, глюкозы соответственно 40,2; 38,2; 32,4; 27,6; 10,2; 9,1 % [43].

Дисахариды используют в концентрациях 5–20 % как однокомпонентные составы и в сочетании с протекторами другой химической природы [9]. По данным большинства работ, защитные свойства дисахаридов возрастают в ряду лактоза-сахароза-трегалоза [13, 25, 32, 41]. Интерес к трегалозе как стабилизатору сухих биологических препаратов был высок в 90-е годы, после обнаружения трегалозы в клетках ангинобиотических организмов, способных без потери жизнеспособности находиться длительное время в дегидратированном состоянии. Было опубликовано большое количество работ, подтверждающих высокие защитные свойства трегалозы при высушивании бактерий. L.M.Crowe. *et al.*, обобщив результаты исследований, сделали вывод, что при оптимальных условиях хранения сухих препаратов трегалоза не имеет существенных преимуществ перед другими дисахаридами [15]. Однако при неоптимальных условиях хранения – высокой температуре и влажности – трегалоза более эффективно защищает сухие клетки от повреждений, благодаря аномально высокой температуре стеклоперехода (T_g), и может быть средой выбора при высушивании бактерий.

Для высушивания пробиотических бактерий с разной степенью успеха используют олигосахариды высокой степени полимеризации и природные полисахариды, например, мальтодекстрин, фруктоолигосахарид, галактоолигосахарид [5, 37, 40].

Защитное действие углеводов при замораживании. Дисахариды являются эффективными криопротекторами и используются при криоконсервации микроорганизмов [23]. Механизмы криозащитного действия углеводов разнообразны. Высокое осмотическое давление внеклеточных растворов из-за присутствия углеводов вызывает обезвоживание клеток до замораживания и снижает вероятность образования внутриклеточного льда [1]. Углеводы увеличивают вязкость сконцентрированных замораживанием внеклеточных растворов, что ограничивает подвижность молекул воды и влияет на степень обезвоживания мембран, количество и структуру образующегося льда [18]. Углеводы понижают температуру замораживания растворов, предохраняя клетки от действия высоких концентраций солей [23].

Защитное действие углеводов при высушивании. Углеводы стабилизируют структуру белков и понижают температуры фазовых переходов мембранных липидов. S.B.Leslie *et al.* методом ИК-спектроскопии показали, что высушивание *E. coli*, *B. subtilis* в присутствии трегалозы и сахарозы предотвращает изменение ИК-спектра белков [26]. Предполагают, что углеводы образуют водородные связи с полярно-заряженными группами белков, стабилизируя их структуру в отсутствие воды (гипотеза «водной замены») [14, 30].

Защитное действие углеводов на клеточные мембраны связывают с их способностью понижать температуры фазовых переходов липидов высушенных клеток [14, 26]. Так, температуры фазовых переходов мембранных липидов *E. coli*, *B. subtilis*, высушенных в присутствии сахарозы или трегалозы, по данным ИК-спектроскопии, оставались близкими с таковыми гидратированных клеток [26]. Поэтому мембраны клеток, высушенных в присутствии дисахаридов, находятся в жидкокристаллическом состоянии и не подвергаются фазовым переходам при регидратации.

C.Schwab *et al.*, используя флуоресцентные липидные зонды, показали, что фруктоолигосахарид увеличивает текучесть мембран сухих клеток *Lactobacillus reuteri*, повышая их стабильность при регидратации [37].

Защитное действие углеводов при хранении связывают с их физическим состоянием, а именно со способностью остекловываться при замораживании и сохранять твердое аморфное состояние после высушивания в широком температурном диапазоне [14, 15, 25, 32]. Высушенные бактериальные препараты представляют собой пористую аморфную углеводную массу, в которую включены бактериальные клетки [19, 32]. Вещества в твердой аморфной фазе характеризуются очень высокой вязкостью при температуре ниже температуры стекловых переходов (T_g).

Высокая вязкость среды в аморфном состоянии замедляет скорость химических реакций, требующих молекулярной диффузии и вызывающих изменения в структуре и химическом составе клеточных мембран.

Несмотря на подтверждение важности физического состояния среды, окружающей клетку, стеклование не может полностью предотвратить все химические реакции, протекающие в такой сложной биологической системе, как микроорганизм при хранении, в частности, реакции перекисного окисления липидов [25, 32]. Исследования показывают, что остекловывание защитной среды важно, но не достаточно для стабильности высушенных бактерий. Природа углевода, его свойства более значимы для стабильности клеток, чем физическое состояние окружающей их среды [25].

Экспериментальные данные о физическом состоянии клеточной цитоплазмы бактерий после высушивания, потенциальных внутриклеточных стекловых переходах и их влиянии на устойчивость бактерий при хранении в дегидратированном состоянии на сегодняшний день отсутствуют [8].

Аминокислоты и их производные, витамины. Некоторые аминокислоты, витамины и их соли, такие как глутамат, аспартат, аскорбат натрия, глицин-бетаин, используют в качестве компонентов защитных сред для высушивания бактерий [9, 12, 13, 24, 28, 42, 43]. Аминокислоты и витамины, как правило, включают в состав сред, содержащих углеводы или белковые продукты в концентрациях, не превышающих 1–2 % [9]. Двухкомпонентные водные растворы аминокислот не рекомендованы для лиофилизации из-за низкой эффективности вследствие способности кристаллизоваться при консервации [7, 9, 42]. Вместе с тем G.I.Martos *et al.* опубликованы данные, согласно которым выживаемость *Lactobacillus delbrueckii* после высушивания в 5 % глутамате и аспартате натрия составила соответственно 94 и 95 %, после «ускоренного» хранения при 30 °C – 92 и 99 % [28]. Защитные свойства 2,5 % глутамата натрия при высушивании *O. oeni* и *Lactobacillus brevis* были выше, чем углеводов [43].

Литературные данные о защитных свойствах глицин-бетаина (синонимы – бетаин, 3-метил глицин) также противоречивы. По данным D.Cleland *et al.*, защитное действие 6 % глицин-бетаина было выше, чем контрольных сред сахароза+сывороточный альбумин и трегалоза+декстрин при высушивании и последующем хранении *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* [12]. В то же время глицин-бетаин не имел преимуществ перед контрольными средами при лиофилизации *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus coryniformis*, *Bifidobacterium animalis* и других [7, 12].

По данным E.S.Bergenholtz *et al.*, выживаемость *L. coryniformis* после высушивания в 5 % растворе бетаина составляет менее 3 %, в 15 % сахарозе – более 45 % [7]. Низкие защитные свойства бетаина,

возможно, связаны с его кристаллизацией при лиофилизации. Кроме того, бетаин снижал защитное действие сахарозы. Чем выше концентрация бетаина в среде, тем ниже выживаемость бактерий после высушивания. Изучение теплофизических свойств сред с разным соотношением бетаина и сахарозы показало, что бетаин понижал температуру стеклоперехода как сконцентрированного замораживанием раствора сахарозы (T_g), так и высушенной сахарозы (T_g).

Глицин-бетаин относится к группе осмопротекторов и, вероятно, защищает клетки от осмотического стресса, которому они подвергаются неоднократно при смешивании с защитной средой, замораживании и регидратации [4, 18]. Защитное действие глутамата, аспартата, аскорбата натрия связывают с их антиоксидантной активностью, способностью защищать клетки от свободно-радикального окисления при хранении [4, 24].

G.I. Martos *et al.* предложен механизм защитного действия глутамата и аспартата натрия при высушивании [28]. Результаты исследований позволили высказать предположение, что глутамат и аспартат натрия встраиваются в поверхностную область мембран и увеличивают подвижность углеводородных цепей жирных кислот. По мнению авторов, именно высокая текучесть дегидратированных мембран стабилизирует сухие бактериальные клетки.

Восстановленное обезжиренное молоко (10–20 %) распространенная среда для сублимационного высушивания бактерий, рекомендована для использования в коллекциях культур [9, 16]. Однако ни в одной работе восстановленное молоко не показало преимуществ в сравнении, например, с низкомолекулярными углеводами [3, 13, 34]. Одной из возможных причин низкой защиты является высокая остаточная влажность сухих препаратов, высушенных в присутствии молока, в сравнении с трегалозой при одинаковом протоколе высушивания [33].

Включение в состав защитной среды дополнительных компонентов может как усиливать, так и снижать протективные свойства молока [16, 41]. Защитное действие восстановленного молока обусловлено его составом, который включает лактозу, аминокислоты, белки. Белки молока способствуют формированию аморфной матрицы. Считается, что именно белки, а не углеводы играют основную роль в формировании биологических стекол в клетках ксероустойчивых организмов при обезвоживании и обеспечивают их высокую стабильность в дегидратированном состоянии [8]. Обезжиренное молоко содержит много видов аминокислот, которые обеспечивают эффективность репарационных процессов при регидратации. Известно, что молоко является хорошей средой регидратации сухих бактериальных препаратов [13, 41].

Желатин – полимер, продукт расщепления коллагена, в настоящее время не используется в качестве самостоятельного стабилизатора бактериальных клеток из-за достаточно низкой выживаемости

при лиофилизации [38]. Его добавляют к углеводам, что повышает защитное действие последних [2, 3, 31]. По данным A.S. Bergholtz *et al.*, включение желатина в состав защитной среды с трегалозой снижает скорость инактивации вакцинного штамма *Francisella tularensis* LVS при 37 °C с $-3.5 \log$ /неделю до $-0.9 \log$ /неделю [31]. Защитное действие желатина, вероятно, связано со способностью формировать при замораживании-высушивании аморфную фазу с низкой молекулярной подвижностью.

Заключение. Несмотря на то, что лиофилизация позволяет сохранять бактерии в течение длительного времени в жизнеспособном состоянии, сам процесс консервации сопряжен с действием на клетку комплекса повреждающих физико-химических факторов. Низкие температуры, обезвоживание, осмотический стресс, изменения pH растворов способны вызывать повреждения клеточных компонентов – мембран, белков, нуклеиновых кислот. Остановка метаболических процессов в высушенных клетках делает их незащищенными от окислительных реакций при хранении. Применение специальных защитных составов для лиофилизации снижает вероятность повреждений, включая летальные, увеличивает гарантированный срок хранения бактерий. Весомый вклад в понимание процессов, происходящих в бактериальных клетках при высушивании и хранении, внесли флуоресцентные липидные зонды и такие методы, как дифференциальная сканирующая калориметрия, инфракрасная Фурье-спектроскопия, ядерный магнитный резонанс. Продолжение экспериментальных исследований на бактериях разных таксономических групп с использованием новых методов расширит представления о повреждениях клеток при сублимационном высушивании, их влиянии на гибель бактерий, о механизмах защитного действия лиопротекторов и станет основой для разработки оптимальных протоколов консервации, обеспечивающих длительное гарантированное сохранение бактерий в коллекциях культур.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков В.Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. *Микробиология*. 1994; 63(1):5–15.
2. Гришкина Т.А., Тимофеева Е.В., Спиридонов В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 1(87):40–2.
3. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. *Микробиология*. 2011; 80(6):842–6.
4. Adams G. The Principles of Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368:15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
5. Amenan Y.A., Wathelet B., Thonart P. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(8):810–7.
6. Bank H., Mazur P. Visualization of freezing damage. *J. Cell. Biol.* 1973; 5(3):729–42.
7. Bergholtz A.S., Wessman P., Wuttke A., Hekansson S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior

- to freeze-drying. *Cryobiology*. 2012; 64:152–9. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
8. Buitink J., Leprince O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 2008; 331(10):788–95. DOI: 10.1016/j.crv.2008.08.002.
9. Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>. Дата обращения 05.11.15.
10. Carlsen C.U., Kurtmann L., Brüggemann D.A., Hoff S., Risbo J., Skibsted L.H. Investigation of oxidation in freeze-dried membranes using the fluorescent probe C11-BODIPY (581/59). *Cryobiology*. 2009; 58:262–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.01.005.
11. Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* 1996; 18:99–104.
12. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods*. 2004; 58(1):31–8.
13. Costa E., Usall J., Teixido N., Garsia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89:793–800. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x.
14. Crowe J.H., Crowe L.M., Hoekstra F.A. Phase transitions and permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989; 21(1):77–91.
15. Crowe L.M., Reid D.S., Crowe J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 1996; 71:2087–93.
16. Delgado H., Moreira T., Luis L., Garsia H., Martino T.K., Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters*. 1995; 16:91–101.
17. Dumont F., Marechal P.-A., Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1330–5. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1330-1335.2006.
18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(10):6474–82. DOI: 10.1128/AEM.00998-06.
19. Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20:229–38. DOI: 10.1021/bp034136n.
20. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41(4):187–96. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
21. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2: Microorganism domain 2007. Available from: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417>. Дата обращения 05.11.15.
22. Heckly R.J., Dimmick R.L., Windle J.J. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms. *J. Bacteriol.* 1963; 85:961–6.
23. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46(3):205–29. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
24. Kurtmann L., Carlsen C.U., Risbo J., Skibsted L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and the presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology*. 2009; 58:175–80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.001.
25. Kurtmann L., Carlsen C.U., Skibsted L.H., Risbo J. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25(1):265–70. DOI: 10.1002/btpr.96.
26. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(10):3592–7.
27. Lievense L.C., Verbreek M.A.M., Noomen A., van't Riet K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41(1):90–4. DOI: 10.1007/BF00166087.
28. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Let. Appl. Microbiol.* 2007; 45:282–8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x.
29. Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008; 54(1):9–24. DOI: 10.2323/jgam.54.9.
30. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J. Microbiol. Methods*. 2006; 66:183–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.
31. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(8):3076–87. DOI: 10.1002/jps.22563.
32. Pehkonen K.S., Roos Y.H., Miao S., Ross R.P., Stanton C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:1732–43. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x.
33. Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S., Bégaud E., Bizet C., Pascual J., Ruvira M.A., Macián M.C., Arahal D.R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Arahal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(8):3559–71. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6.
34. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54(3):265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
35. Prakash O., Nimonkar Y., Shouche Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 339(1):1–9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034.
36. Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* 2007(3); 102:748–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
37. Schwab C., Vogel R., Ganzle M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.06 during freeze-drying. *Cryobiology*. 2007; 55(2):108–14. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.
38. Sinskey T.J., Silverman G.J. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 1970; 101(2):429–37.
39. Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103(6):2410–9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x.
40. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 155(3):217–21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008.
41. Yang L., Ma Y., Zhang Y. Freeze-drying of live attenuated *Vibrio anguillarum* mutant for vaccine preparation. *Biologicals*. 2007; 35:265–9. DOI: 10.1016/j.biologics.2007.03.001.
42. Zhan Y., Xu Q., Yang M.M., Yang H.T., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Let. Appl. Microbiol.* 2012; 54(1):10–7. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x.
43. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(2):333–8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x.

References

- Volkov V.Ya. [Concerning physiological and physical-chemical mechanisms of microorganism resistance to freezing and drying up processes]. *Mikrobiologiya*. 1994; 63(1): 5–15.
- Grishkina T.A., Timofeyeva E.V., Spiridonov V.A. [Assessment of the effects of long storage of glanders pathogen museum collection stains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; 1:40–2.
- Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. [Viability of lyophilized microorganism after 50 years of storage]. *Mikrobiologiya*. 2011; 80(6): 842–6.
- Adams G. The Principles of Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.* 2007; 368:15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2_2.
- Amenan Y.A., Wathelet B., Thonart P. Effect of protective compounds on the survival, electrolyte leakage, and lipid degradation of freeze-dried *Weissella paramesenteroides* LC11 during storage. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(8):810–7.
- Bank H., Mazur P. Visualization of freezing damage. *J. Cell. Biol.* 1973; 5(3):729–42.
- Bergenholtz A.S., Wessman P., Wuttke A., Hekansson S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*. 2012; 64:152–9. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
- Buitink J., Leprince O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 2008; 331(10):788–95. DOI: 10.1016/j.crv.2008.08.002.
- Cabri guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. [Cited 05 Nov 2015]. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>.
- Carlsen C.U., Kurtmann L., Brüggemann D.A., Hoff S., Risbo J., Skibsted L.H. Investigation of oxidation in freeze-dried membranes using the fluorescent probe C11-BODIPY (581/59). *Cryobiology*. 2009; 58:262–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.01.005.
- Castro H.P., Teixeira P.M., Kirby R. Changes in the cell membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. *Biotechnol. Lett.* 1996; 18:99–104.
- Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. *J. Microbiol. Methods*. 2004; 58(1):31–8.
- Costa E., Usall J., Teixido N., Garsia N., Vinas I. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89:793–800. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Hoekstra F.A. Phase transitions and

- permeability changes in dry membranes during rehydration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1989; 21(1):77–91.
15. Crowe L.M., Reid D.S., Crowe J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 1996; 71:2087–93.
 16. Delgado H., Moreira T., Luis L., Garsia H., Martino T.K., Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters.* 1995; 16:91–101.
 17. Dumont F., Marechal P.-A., Gervais P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1330–5. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1330-1335.2006.
 18. Fonseca F., Marin M., Morris G.J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: freezing kinetics and storage temperature effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(10):6474–82. DOI: 10.1128/AEM.00998-06.
 19. Fonseca F., Passot S., Cunin O., Marin M. Collapse temperature of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* suspensions and protective media. *Biotechnol. Prog.* 2004; 20:229–38. DOI: 10.1021/bp034136n.
 20. Gao D., Critser J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 2000; 41(4):187–96. DOI: 10.1093/ilar.41.4.187.
 21. Guidance for the operation of biological research centres (BRCs) Part 2: Microorganism domain 2007. [Cited 05 Nov 2015]. Available from: <http://www.oecd.org/sti/biotech/38777417>.
 22. Heckly R.J., Dimmick R.L., Windle J.J. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms. *J. Bacteriol.* 1963; 85:961–6.
 23. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 2003; 46(3):205–29. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4.
 24. Kurtmann L., Carlsen C.U., Risbo L., Skibsted L.H. Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and the presence of oxygen and ascorbate. *Cryobiology.* 2009; 58:175–80. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.001.
 25. Kurtmann L., Carlsen C.U., Skibsted L.H., Risbo L. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. *Biotechnol. Prog.* 2009; 25(1):265–70. DOI: 10.1002/btpr.96.
 26. Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H., Crowe L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(10):3592–7.
 27. Lievens L.C., Verbreek M.A.M., Noomen A., van't Riet K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41(1):90–4. DOI: 10.1007/BF00166087.
 28. Martos G.I., Minahk C.J., de Valdez G.F., Morero R. Effects of protective agents on membrane fluidity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Let. Appl. Microbiol.* 2007; 45:282–8. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02188.x.
 29. Miyamoto-Shinohara Y., Sukenobe J., Imaizumi T., Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2008; 54(1):9–24. DOI: 10.2323/jgam.54.9.
 30. Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review. *J. Microbiol. Methods.* 2006; 66:183–93. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.02.017.
 31. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-Ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V. Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(8):3076–87. DOI: 10.1002/jps.22563.
 32. Pehkonen K.S., Roos Y.H., Miao S., Ross R.P., Stanton C. State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104:1732–43. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03719.x.
 33. Peiren J., Buyse J., De Vos P., Lang E., Clermont D., Hamon S., Bégaud E., Bizet C., Pascual J., Ruvira M.A., Macián M.C., Arahal D.R. Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Arahal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 99(8):3559–71. DOI: 10.1007/s00253-015-6476-6.
 34. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology.* 2007; 54(3):265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
 35. Prakash O., Nimonkar Y., Shouche Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 339(1):1–9. DOI: 10.1111/1574-6968.12034.
 36. Santivarangkna C., Wenning M., Foerst P., Kulozik U. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *J. Appl. Microbiol.* 2007(3); 102:748–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03123.x.
 37. Schwab C., Vogel R., Ganzle M.G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.06 during freeze-drying. *Cryobiology.* 2007; 55(2):108–14. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.004.
 38. Sinskey T.J., Silverman G.J. Characterization of injury incurred by *Escherichia coli* upon freeze-drying. *J. Bacteriol.* 1970; 101(2):429–37.
 39. Tymczyszyn E.E., Díaz M.R., Gómez-Zavaglia A., Disalvo E.A. Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 103(6):2410–9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x.
 40. Tymczyszyn E.E., Sosa N., Gerbino E., Hugo A., Gómez-Zavaglia A., Schebor C. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 155(3):217–21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.008.
 41. Yang L., Ma Y., Zhang Y. Freeze-drying of live attenuated *Vibrio anguillarum* mutant for vaccine preparation. *Biologicals.* 2007; 35:265–9. DOI: 10.1016/j.biologics.2007.03.001.
 42. Zhan Y., Xu Q., Yang M.M., Yang H.T., Liu H.X., Wang Y.P., Guo J.H. Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of bio-control strains *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Let. Appl. Microbiol.* 2012; 54(1):10–7. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x.
 43. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(2):333–8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02587.x.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 24.12.16.

Л.М.Куклева, А.В.Бойко

АКТИВАТОР ПЛАЗМИНОГЕНА – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

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

Активатор плазминогена *Yersinia pestis* – поверхностная протеаза (Pla) кодируется видоспецифической плазмидой pPla. Этот фермент принадлежит к семейству белков омпинов и имеет β -баррельную структуру. Протеаза Pla осуществляет комплексное взаимодействие с системой гомеостаза организма хозяина и является важным фактором вирулентности возбудителя чумы. Представлены литературные данные об участии активатора плазминогена в развитии бубонной и легочной форм чумы. Описано участие R-формы ЛПС в проявлении активности протеазы Pla. Активатор плазминогена непосредственно способствует фибринолизу, активируя плазминоген, инактивируя ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) и α_2 -антиплазмин, а также активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI). Прокоагулянтная активность белка Pla обусловлена разрушением ингибитора каскада тканевого фактора (TFPI). Представлены данные о непротеолитических функциях активатора плазминогена.

Ключевые слова: возбудитель чумы, активатор плазминогена, патогенность.

Корреспондирующий автор: Куклева Любовь Михайловна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

L.M.Kukleva, A.V.Boiko

Plasminogen Activator – Multifunctional Protein of Plague Pathogen

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Yersinia pestis plasminogen activator, a surface protease (Pla) is encoded by species-specific plasmid pPla. This enzyme belongs to outer membrane protein family and has a β -barrel structure. Pla protease interacts complexly with homeostasis system of a host-organism and is an important factor of plague agent virulence. Represented are the literature data on the part of plasminogen activator in the development of bubonic and pneumonic plague. Described is the role of R-form lipopolysaccharide in protease Pla activity manifestation. Plasminogen activator directly contributes to fibrinolysis by activating plasminogen and inactivating plasminogen-1 activator inhibitor (PAI-1) and α_2 -anti-plasmin, as well as promoted by thrombin fibrinolysis inhibitor (TAFI). Pro-coagulant Pla protein activity is caused by the destruction of tissue factor pathway inhibitor (TFPI). In addition, given is the information on non-proteolytic functions of plasminogen activator.

Key words: plague agent, plasminogen activator, pathogenicity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Lyubov M. Kukleva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kukleva L.M., Boiko A.V. Plasminogen Activator – Multifunctional Protein of Plague Pathogen. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:13–20. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-13-20

Наличие природных очагов чумы практически на всех континентах, ежегодно увеличивающееся число случаев этой болезни, иногда приводящее к крупным вспышкам (Индия, 1994; Мадагаскар, 2011, 2013), появление штаммов *Yersinia pestis*, резистентных к антибиотикам, а также возможность использования возбудителя чумы в террористических целях диктует необходимость изучения факторов патогенности *Y. pestis* для разработки действенных мер профилактики и борьбы с этой болезнью [2, 5, 42, 49, 57].

Наиболее распространенной является бубонная форма чумы, которая развивается после укуса зараженной блохой и при отсутствии лечения приводит к гибели 40–60 % заболевших [32]. Легочная форма чумы возникает либо как осложнение бубонной или септической форм, либо при вдыхании аэрозольных частиц, выделяемых больным легочной чумой. Если лечение не начинают в первые 24 ч после появления симптомов, смерть наступает через 48 ч [13].

Патогенность возбудителя чумы – это полидетерминантный признак. Гены, кодирующие факторы патогенности, расположены как на хромосоме, так и

на плазидах, одна из которых (pCad) является общей с возбудителем псевдотуберкулеза, а две другие (pFra и pPla) видоспецифические и содержатся только у штаммов *Y. pestis*. Плазида pPla (pPst, pPSP) размером 9,5 т.п.р. детерминирует важные факторы вирулентности возбудителя чумы [38].

Плазида pPla. Плазида pPla, по-видимому, приобретена возбудителем чумы от *S. typhimurium* в результате горизонтального переноса [23, 40]. В настоящее время известны три функционально различающихся белка, кодируемые генами плазмиды pPla – пестицин, активатор плазминогена и белок иммунитета [39, 40]. Ген *pst* детерминирует синтез бактериоцина пестицина, вызывающего лизис клеточной стенки бактерий-конкурентов за счет гидролиза связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмуравовой кислотой в составе липопротеина клеточной стенки – муреина [47]. Возбудитель чумы использует пестицин для подавления клеток, лишенных плазмиды pPst, и противостоит действию собственного пестицина за счет белка иммунитета к нему, кодируемого геном *imm* той же плазмиды [41].

Важнейшим продуктом плазмиды pPla является активатор плазминогена – протеаза Pla. Ген *pla* – один из самых активно экспрессирующихся генов клеток *Y. pestis*, содержащихся в бубоне, а его транскрипцию контролирует сАМР-рецепторный белок [19, 29, 36]. Протеомным анализом установлено, что передача *Y. pestis* от холонокровных насекомых-переносчиков к теплокровным млекопитающим, связанная с изменением температуры, существенно влияет на экспрессию и активность белка Pla [9].

Участие активатора плазминогена в патогенезе чумы. Установлено, что активатор плазминогена участвует в развитии патогенетического процесса при чуме. Однако его значение различается в зависимости от способов внедрения бактерий.

При развитии бубонной чумы в результате укуса зараженной блохой в месте внедрения клеток *Y. pestis*, экспрессирующих активатор плазминогена, формируется обширный бактериальный очаг с небольшим количеством клеток воспаления. Значение Pla для патогенеза бубонной чумы обусловлено его способностью обеспечивать диссеминацию бактерий [49]. Pla обеспечивает разрушение сгустков фибрина, образующихся вокруг начального сайта колонизации тканей [44]. Штаммы, лишенные Pla, быстро блокируются воспалительными клетками инфильтрата, что существенно ограничивает распространение бактерий [41]. Отсутствие Pla ослабляет развитие чумной инфекции при внутри- или подкожном способе заражения: значение LD₅₀ увеличивается почти в миллион раз [35, 41].

В отличие от бубонной инфекции, при развитии легочной чумы протеаза Pla необязательна для диссеминации бактерий из начального сайта инфекции (в данном случае – легких). После интраназального инфицирования активатор плазминогена обеспечивает интенсивное локальное размножение бактерий в легких. Резкое и быстрое увеличение количества клеток *Y. pestis* в легких приводит к развитию молниеносной пневмонии и отеку легких, тогда как в отсутствие Pla инфекция не развивается в смертельную пневмонию [8, 27].

Таким образом, отмечено существенное различие роли активатора плазминогена для развития различных форм чумы: при бубонной чуме Pla усиливает миграцию бактерий в лимфатические узлы, тогда как при легочной чуме Pla обеспечивает массивное локальное размножение бактерий.

Участия активатора плазминогена Pla в развитии первичной септической формы чумы, когда возбудитель попадает непосредственно в кровяное русло млекопитающих, не отмечено [35, 41].

Структура Pla. Активатор плазминогена Pla принадлежит к семейству протеаз наружных мембран, получивших название омптинов (от *omptins* – outer membrane proteins) и выявленных практически у всех видов энтеробактерий, патогенных для человека [23, 24].

Белок Pla (34,7 кДа) пронизывает наружную

мембрану и состоит из 292 аминокислотных остатков, сформированных в 10 антипараллельных β-полос, которые образуют β-баррельную структуру размером 70 Å [12, 15]. Четвертичная структура белка представлена пятью периплазматическими и пятью внеклеточными петлями, выступающими в межклеточное пространство на расстояние около 40 Å от липидного бислоя наружной мембраны [15] (рис. 1). Каталитический центр протеазы Pla ориентирован внутрь молекулы и сформирован аминокислотными остатками Asp84 и Asp86 (петля 3) и Asp206 и His208 (петля 7) [46].

Существует четыре структурные формы активатора плазминогена. Пре-Pla – незрелая форма белка, который после удаления сигнального пептида образует активную форму – α-Pla (36 кДа). β-Pla (33 кДа) формируются в результате аутопроцессинга α-Pla – гидролиза на С-конце в позиции Lys262 в петле 5 [23, 38, 39]. Форма γ-Pla (31 кДа) является, по-видимому, другой возможной формой пространственной структуры α-Pla, образование которой зависит от наличия участка молекулы Arg138 и R171, способного связывать ЛПС [23, 25, 38, 39].

J.Naiko *et al.* [15, 16] показали, что у штаммов *microtus* в позиции 259 петли L5 молекулы Pla находится изолейцин, тогда как у штаммов основного подвида – треонин. Авторы предполагают, что активатор плазминогена штаммов биовара *microtus* представляет собой предшествующую форму Pla, который эволюционировал в более эффективный активатор плазминогена у штаммов основного подвида возбудителя чумы.

Уникальность активатора плазминогена Pla со-

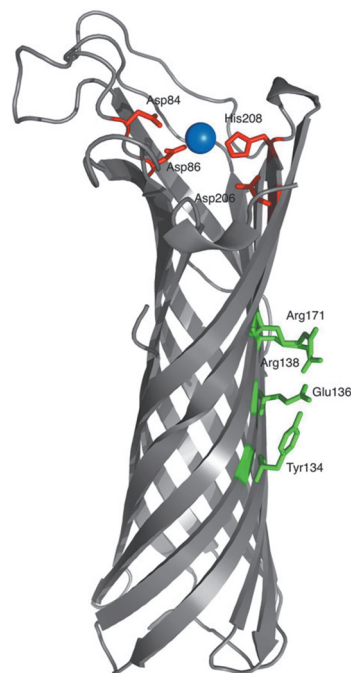


Рис. 1. Структура активатора плазминогена *Y. pestis*. Пять петель (на рисунке – сверху) расположены во внеклеточном пространстве. Каталитические остатки обозначены красным цветом. Молекула воды, необходимая для проявления каталитических функций, выделена синим цветом. Аминокислотные остатки, участвующие в связывании ЛПС, обозначены зеленым цветом [12]

стоит в том, что для проявления его активности необходимо связывание с ЛПС [1, 21, 23, 24, 43]. При этом пространственная близость коротких О-боковых цепей R-формы ЛПС возбудителя чумы и наружных петель молекулы белка Pla создает возможность влияния ЛПС на Pla [24]. Связывание коровой части ЛПС с Pla происходит по аминокислотным остаткам Arg138 и Arg171, что индуцирует конформационные изменения активного сайта, влияет на его стереометрию и модулируют активность активатора плазминогена *Y. pestis* [12, 43, 46]. Замена этих остатков аргинина, особенно R138, снижает энзиматическую активность Pla и количество Pla в клетках [43]. Удаление ЛПС приводит к инактивации Pla. Высокая протеолитическая активность Pla в отсутствие стерических препятствий, создаваемых боковыми цепями О-антигена, является одним из патогенетических преимуществ R-формы ЛПС у *Y. pestis*. С другой стороны, высказано альтернативное предположение, что необходимость ЛПС для проявления активности протеазой Pla обеспечивает отсутствие ферментативной активности активатора плазминогена в бактериальной цитоплазме и функционирование ее только при встраивании во внешнюю мембрану [12].

Температурный сдвиг (от 20–25 до 37 °C), возникающий при передаче бактерий из блох в организм млекопитающего, приводит к изменениям в структуре ЛПС, что, в свою очередь, влияет на функции Pla [20]. Установлено, что активность Pla у клеток, выращенных при 37 °C, значительно выше, чем у бактерий, культивируемых при 20 °C [43]. Поскольку экспрессия Pla при этом практически не изменяется, высказано предположение, что высокая активность Pla в клетках, выращенных при 37 °C, является результатом термозависимых изменений структуры ЛПС [9]. Механизм влияния модификаций структуры ЛПС на конформацию Pla в настоящее время не известен. Биологический смысл состоит в том, что смена хозяев (с блохи на млекопитающее) отражает

огромные различия в патогенном потенциале: в блохах (при 20–25 °C) и на ранних стадиях инфекции в млекопитающем активность Pla низкая и *Y. pestis* подвержен активному воздействию иммунной системы, тогда как при 37 °C наблюдается обратная картина.

В процессе эволюции возбудитель чумы приобрел механизм, позволяющий использовать для своего развития систему гомеостаза организма хозяина (протромбин, фибриноген, плазминоген) [41] (рис. 2). К настоящему времени идентифицирован целый ряд соединений, являющихся субстратами для действия активатора плазминогена *in vitro*, но данные о взаимодействии этих факторов с Pla *in vivo* и их необходимость для вирулентности немногочисленны [22]. Учитывая различные формы проявления чумы, вероятно, что Pla действует на различные субстраты в зависимости от пути передачи инфекции.

Участие активатора плазминогена в регуляции фибринолиза и коагуляции

Активация плазминогена. Основным субстратом для протеазы Pla является циркулирующий в крови регулятор фибринолиза – плазминоген [3]. Ведущая роль плазминогена в качестве мишени действия протеазы Pla при бубонной чуме подтверждена экспериментами с плазминоген-дефицитными мышами [11]. Pla эффективно активирует плазминоген с образованием его активной формы – плазмина, который является мощной сериновой протеазой, способной вызывать деградацию полимерных сгустков фибрина. Активирование плазминогена происходит в результате ферментативного гидролиза полипептидной цепи этой молекулы между аминокислотными остатками Arg₅₆₁ и Val₅₆₂. При этом образуются две белковые цепи – тяжелая и легкая, соединенные двумя дисульфидными мостиками [8]. Тяжелая цепь плазмина содержит пять крупных белковых доменов, которые обеспечивают присоединение плазмина к фибрину, экстраклеточному матриксу и специализированным

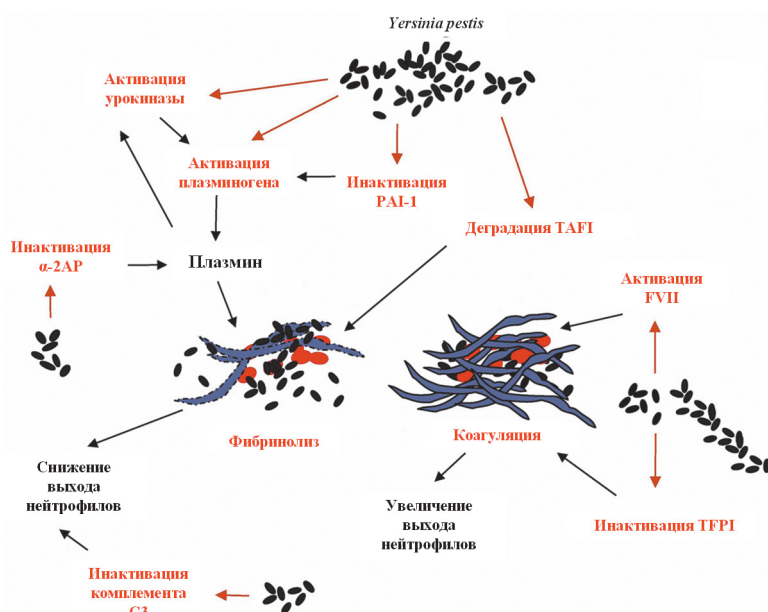


Рис. 2. Участие активатора плазминогена Pla возбудителя чумы в процессах гомеостаза [21]

рецепторам на поверхности клеток млекопитающих. В легкой цепи находится каталитический центр молекулы [26].

Важными физиологическими функциями плазмина, образующегося под действием Pla, являются также протеолитическая активация металлопротеиназ, про-коллагеназ, про-желатиназ и разрушение компонентов базальных мембран и внеклеточного матрикса, участие в активации некоторых гормонов и факторов роста [15, 26, 27, 31].

Инактивирование α_2 -антиплазмина (α_2 AP)

Формирование и активность протеаз в крови строго контролируется. Циркулирующий плазмин быстро инактивируется антипротеазами плазмы крови. Основным ингибитором плазмина в плазме является серпин (сериновых протеаз ингибитор) – α_2 -антиплазмин. α_2 -антиплазмин ингибирует циркулирующий плазмин, специфически и необратимо связываясь с ним и блокируя активный сайт этой молекулы, а также плазмин, связанный с клетками [23]. Штаммы *Y. pestis*, образующие активатор плазминогена, инактивируют α_2 -антиплазмин [23]. Одновременное активирование плазминогена и инактивирование α_2 -антиплазмина способно привести к неконтролируемому протеолизу в сайте инфекции.

Инактивирование α_2 -макроглобулина. Установлена способность Pla инактивировать другой ингибитор плазмина – α_2 -макроглобулин, который является гликопротеином, присутствующим в крови позвоночных животных и способным ингибировать большое количество протеаз [23]. Кроме того, установлено участие α_2 -макроглобулина в регуляции транспорта макромолекул и ингибировании некоторых цитокинов. Этот белок образует нековалентный комплекс с плазмином, однако его действие проявляется лишь в отсутствии (или при низкой концентрации) α_2 -антиплазмина [26].

В литературе представлены данные о способности активатора плазминогена Pla воздействовать еще на целый ряд соединений, влияющих на образование плазмина и фибринолиз.

Инактивация ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1 от англ. Plasminogen Activator Inhibitor-1). В организме млекопитающих присутствуют эндогенные активаторы плазминогена тканевого (tPA) и урокиназного (uPA) типа, функционирование которых находится под контролем белка PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) [37]. Протеаза Pla способна инактивировать белок PAI-1, гидролизуя его каталитический центр между остатками R346 и M347 [16]. Инактивация PAI-1 приводит к неконтролируемому образованию плазмина и фибринолизу. Кроме того, дефицит PAI-1, возникающий в ответ на внедрение возбудителя, приводит к снижению выхода нейтрофилов из кровяного русла, усиливает размножение и диссеминацию бактерий [34].

Разрушение ингибитора фибринолиза, активируемого тромбином. Одним из способов, с помощью которого Pla может усиливать фибринолиз,

является разрушение ингибитора фибринолиза, активируемого тромбином – TAFI (от англ. Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor). TAFI представляет собой белок плазмы крови, который ингибирует фибринолиз и образование плазмина путем гидролиза С-терминального аминокислотного остатка лизина в фибрине. Это приводит к нарушению образования плазмина и снижению фибринолиза [45]. Pla способен повреждать TAFI вблизи его С-конца, предотвращая активацию этого фермента, а также косвенно воздействовать на TAFI через протеолиз плазмина [45]. Биологическое значение такой активности пока не изучено.

Таким образом, описанное действие активатора плазминогена приводит к усилению фибринолиза и обусловлено разрушением плазминогена, α_2 -антиплазмина, PAI-1 и TAFI. Однако протеаза Pla способна оказывать противоположное воздействие, приводящее к усилению коагуляции.

Инактивация ингибитора каскадной системы тканевого фактора. Коагулазная активность *Y. pestis*, зависящая от экспрессии гена *pla* и проявляющаяся в отношении плазмы кроликов, но не мышей, крыс и людей, описана еще в ранних исследованиях возбудителя чумы [3, 38]. Возможно, что способность к плазмокоагуляции, которая обуславливает образование вокруг бактерий фибринового сгустка, экранирует клеточную стенку бактерий от распознавания ЛПС Toll-like рецепторами 4-го типа [22]. Первым ферментом в цепи коагуляции крови является фактор FVII. Основным эндогенным ингибитором инициации свертывания крови является ингибитор каскадной системы тканевого фактора – TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), действующий в комплексе с фактором коагуляции FX. *Y. pestis* обладает способностью ускорять инициацию коагуляции путем активирования фактора FVII и подавления его ингибитора в плазме крови [50]. Образование сгустков крови блокирует стабильный комплекс основного антикоагулянта TFPI и фактора FXa [50]. TFPI обладает высокой чувствительностью к протеолитическому действию Pla, который гидролизует этот белок между аминокислотными остатками K249 и G250 [50]. Инактивация TFPI происходит при участии R-формы ЛПС [3, 24].

Таким образом, инактивация TFPI усиливает коагуляцию, процесс является противоположным в отношении активации плазминогена, α_2 -антиплазмина, PAI-1 и TAFI, которая приводит к усилению фибринолиза. Для объяснения возможного конфликта T. Yun *et al.* [50] предложили гипотезу, согласно которой подавление TFPI клетками *Y. pestis* на ранней стадии инфекции вызывает активацию системы образования сгустков фибрина для образования локального барьера, защищающего размножающиеся бактерии от распознавания воспалительными клетками хозяина. Высказано предположение, что противоположное воздействие Pla на коагуляцию и фибринолиз определяется изменениями структуры ЛПС во время раз-

вития инфекции.

Инактивация комплемента. Человеческий комплемент – это сложная система белков плазмы крови, которая играет важную роль в устойчивости к бактериальной инфекции. Активация комплементарного каскада приводит к опсонизации проникших бактерий, высвобождению хемотактических белков и, в конечном итоге, к лизису бактериальных мембран. Центральную роль в функционировании комплемента играют гликопротеины C3 и C5. Низкое содержание клеток воспаления в сайте внедрения бактерий, содержащих активатор плазминогена, позволило высказать предположение, что протеаза Pla снижает продукцию хемоаттрактантов [41]. В дальнейшем показано, что активатор плазминогена Pla разрушает белок комплемента C3, который является опсоном и играет ключевую роль в активации комплемента как по классическому, так и по альтернативному пути. Разрушение белка C3 подавляет миграцию клеток воспаления в сайт инфекции, может также снижать опсонофагоцитоз бактерий, экспрессирующих Pla, через посредство C3b рецепторов и таким способом обеспечивать устойчивость бактерий к действию бактерицидных компонентов сыворотки [41]. Активатор плазминогена через действие на компонент C3 подавляет образование компонента C5, который участвует в образовании и активации клеток воспаления. Таким образом, действие протеазы Pla нарушает хемотаксис фагоцитирующих клеток крови к месту локализации микроба, приводит к нарушениям их фагоцитарной активности и неспособности системы комплемента формировать цитолитический конечный продукт активации системы комплемента – МАК-комплекс [8]. Все это позволяет *Y. pestis* достаточно эффективно ускользать от защитных сил чувствительного организма.

Участие Pla в инаktivации ряда белков макроорганизма и микробной клетки

Инаktivация аутотранспортных белков. Ауто-транспортёры – это большое семейство секретируемых белков грамотрицательных бактерий, выполняющих различные функции, в том числе адгезивную, цитотоксическую, а также устойчивость к иммунитету. В клетках *Y. pestis* аутотранспортный белок YарЕ выполняет адгезивные функции и необходим для развития бубонной чумы у мышей. Показано, что активатор плазминогена Pla протеолитически активирует YарЕ, что необходимо для агрегации бактерий, адгезии к клеткам эукариот и, в конечном итоге, для колонизации лимфатических узлов при бубонной чуме [28].

Инаktivация антимикробных катионных белков. В макроорганизме присутствуют катионные антимикробные белки (СAMPs), способные проникать через бактериальные липидные бислои и вызывать лизис клеток-мишеней [6]. Помимо непосредственного участия в развитии иммунного ответа, СAMPs обладают хемоаттрактантными свойствами, влияя на выход нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток в ответ на

внедрение возбудителя. При развитии легочной чумы альвеолярные эпителиальные клетки легочных путей содержат высокие концентрации СAMPs, на которые воздействуют белки воспаления [14]. Установлено, что клетки *Y. pestis* чувствительны к СAMPs из группы кателицидинов [14]. Анализ мутаций в гене *pla* позволил показать, что активатор плазминогена Pla способен к протеолитическому инаktivированию этих кателицидинов [14]. Однако такое инаktivирование происходит только в отсутствии капсульного антигена F1, который либо конформационно влияет на активный сайт Pla, либо стерически ограничивает взаимодействие с катионными белками. Суммируя полученные данные, авторы делают заключение, что Pla может действовать как вирулентный фактор, не только влияя на процессинг плазминогена, но и инаktivирова СAMPs [14].

Инаktivация эффекторных белков системы секреции III типа. Эффекторные белки YOPs патогенных иерсиний инъецируются в цитоплазму хозяйской клетки при участии системы секреции III типа, кодируемой плазмидой pCD1. Их кумулятивный эффект ингибирует фагоцитоз, вызывает апоптоз макрофагов, разрушает актиновый цитоскелет и сигнальный путь активации клеток воспаления, подавляет продукцию цитокинов и хемокинов [33].

Данные об участии активатора плазминогена в функционировании системы секреции III типа противоречивы. В экспериментах *in vitro* установлено, что активатор плазминогена Pla вызывает деградацию большинства YOPs, включая YOPs B, C, D, E, F, J, M, но не влияет на LcrV [32, 39]. S.Felek *et al.* [13] установили, что активатор плазминогена Pla (помимо адгезинов Ail и Psa) участвует в транслокации YOPs в клетки хозяина, причем участие каждого из этих адгезинов зависит от условий культивирования бактерий. Показано, что транслокация YOPs, обусловленная Pla, не зависит от его протеазной активности.

Непротеолитические функции Pla

Адгезивные свойства Pla. Процессы адгезии в макроорганизме представляют собой начальный этап развития любой бактериальной инфекции. Для клеток *Y. pestis* способность прикрепляться к экстраклеточному матриксу в месте укуса блохи является ключевым моментом, поскольку это приводит к локализованному протеолизу тканевых барьеров и обеспечивает дальнейшую миграцию возбудителя в организме хозяина [18, 24, 26].

Адгезивная активность активатора плазминогена Pla отделена от его протеолитической активности, что доказано наличием протеолитически неактивных мутантов Pla – Ser₉₉→Ala и Asp₂₀₆→Ala, сохранивших способность к адгезии на эпителиальных клеточных линиях человека [26].

В экспериментах *in vitro* показана адгезивная активность, обусловленная Pla, в отношении клеточных линий, полученных из эпителиальных и эндотелиальных тканей, а также искусственного анало-

га базальных мембран (БМ) – препарата Matrigel и препаратам экстраклеточного матрикса (ЭКМ) [26]. Главной мишенью Pla является основной гликопротеин БМ – ламинин и, в меньшей степени, протеогликан [26, 30]. Отмечена слабая активность Pla в отношении человеческого коллагена типов IV, I, VI, клеточного и плазматического фибронектина [26]. На модели альвеолярных макрофагов и дендритных клеток легких установлено, что рецептором для активатора плазминогена является лектиновый рецептор C-типа DEC-205 [51]. Блокирование этого рецептора снижает диссеминацию бактерий после интраназального заражения. Существует предположение, что усиление адгезии, обусловленное активатором плазминогена, может быть косвенным результатом изменения клеточной стенки и освобождением криптических сайтов адгезии, связанных с воздействием Pla на белки системы секреции III типа и ЛПС [30].

Инвазивная активность Pla *Y. pestis*. Активатор плазминогена Pla *Y. pestis* является единственным из омпитинов, для которого установлены инвазивные свойства. Наличие протеазы Pla ответственно за 90–95 % инвазивности *Y. pestis* для культивируемых клеток человека – HeLa, эндотелиальных клеток ECV304 и HUVECs [25].

Как и в случае адгезивных свойств, способность к инвазии пространственно отделена от протеолитической активности: протеолитически неактивные мутанты Pla – Ser₉₉→Ala и Asp₂₀₆→Ala сохраняют способность к инвазии [26].

Ключевая роль Pla в инвазивности подтверждена его способностью придавать инвазивность неинвазивным штаммам кишечной палочки [17]. Проникновение клеток *Y. pestis*, экспрессирующих Pla, приводит к нарушению механизмов сигнальной трансдукции, главным следствием которого является перестройка актинового цитоскелета клеток млекопитающих и изменение клеточной поверхности [4, 10]. В настоящее время биологические механизмы и значение инвазии, обусловленной Pla, остается открытым.

Представленные литературные данные свидетельствуют о том, что активатор плазминогена (Pla) возбудителя чумы является важным фактором вирулентности, участвующим в развитии как бубонной, так и легочной чумы. Протеаза Pla кодируется видоспецифической плазмидой rPCR и принадлежит к семейству поверхностных протеаз – омпитинов. В основе действия активатора плазминогена лежит его активная протеолитическая функция в отношении целого ряда субстратов, обеспечивающих систему гомеостаза организма хозяина. Нарушения в процессах гемостаза, вызываемые протеазой Pla, приводят к срыву механизмов как клеточной, так и гуморальной составляющих воспалительного и иммунного ответов. Протеолитическая активность Pla проявляется при наличии R-формы ЛПС. Помимо протеолитической функции, активатор плазминогена Pla участвует в адгезии и инвазии бактерий чумы в организме

хозяина. Действие протеазы Pla на систему комплемента приводит к нарушению ее опсонизирующей, литической и воспалительной функций.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителем чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 1(93):49–51.
2. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):53–7.
3. Beesley E., Brubaker R., Janssen W., Surgalla M. Pesticins. III. Expression of coagulase and mechanisms of fibrinolysis. *J. Bacteriol.* 1967; 94(1):19–26.
4. Benedek O., Nagy G., Emody L. Intracellular signalling and cytoskeletal rearrangement involved in *Yersinia pestis* plasminogen activator (Pla) mediated HeLa cell invasion. *Microb. Pathog.* 2004; 37(1):47–54. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.04.001.
5. Bertherat E. Plague in Madagascar: overview of the 2014–2015 epidemic season. WHO. *Weekly Epidemiol. Rec.* 2015; 90(20):250–2.
6. Bishop J., Finlay B. Friend or foe? Antimicrobial peptides trigger pathogen virulence. *Trends Mol. Med.* 2006; 12(1):3–6. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.11.001.
7. Butler T. Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 89(4):788–93. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0191.
8. Caulfield A., Latham W. Substrates of the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:253–60. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_32.
9. Chromy B., Choi M., Murphy G., Gonzales A., Corzett C., Chang B., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol.* 2005; 187(23):8172–80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.
10. Cowan C., Jones H., Kaya Y., Perry R., Straley S. Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasion. *Infect. Immun.* 2000; 68(8):4523–30. DOI: 10.1128/IAI.68.8.4523-4530.2000.
11. Degen J., Bugge T., Goguen J. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(Suppl 1):24–31. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02519.x.
12. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418.
13. Felek S., Tsang T., Krukons E. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4134–50. DOI: 10.1128/IAI.00167-10.
14. Galvan E., Lasaro M., Schifferli D. Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin. *Infect. Immun.* 2008; 76(4):1456–64. DOI: 10.1128/IAI.01197-07.
15. Haiko J., Suomalainen M., Ojala T., Lahtenmaki K., Korhonen T. Breaking barriers – attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun.* 2009; 15(2):67–80. DOI: 10.1177/1753425909102559.
16. Haiko J., Laakkonen L., Juuti K., Kalkkinen N., Korhonen T. The omptins of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* cleave the reactive center loop of plasminogen activator inhibitor 1. *J. Bacteriol.* 2010; 192(18):4553–61. DOI: 10.1128/JB.00458-10.
17. Hritonenko V., Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. *Mol. Membr. Biol.* 2007; 24(5–6):395–406. DOI: 10.1080/09687680701443822.
18. Kienle Z., Emödy L., Svanborg C. and O'Toole P. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138. Pt.8:1679–87.
19. Kim T., Chauhan S., Motin V., Goh E., Igo M., Young G. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 2007; 189(24):8890–900. DOI: 10.1128/JB.00972-07.
20. Knirel Y., Lindner B., Vinogradov E., Kocharova N., Senchenkova S., Shaikhutdinova R., Dentovskaya S., Fursova N., Bakhteeva I., Titareva G., Balakhonov S., Holst O., Gremyakova T., Pier G., Anisimov A. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Biochemistry.* 2005; 44(5):1731–43. DOI: 10.1021/

bi048430f.

21. Korhonen T., Haiko J., Leakkonen L., Jarvinen H., Westerlund-Wikstrom B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013; 3(35):1–9. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00035.
22. Korhonen T. Fibrinolytic and procoagulant activities of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13(1):115–20. DOI: 10.1111/jth.12932.
23. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emody L., Lång H., Korhonen T. Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097–111. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02451.x.
24. Kukkonen M., Korhonen T. The ompT family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7–14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.01.003.
25. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P., Lahteenmaki K., Lång H., Virkola R., Helander I., Holst O., Korhonen T. Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004; 51(1):215–25. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03817.x.
26. Lahteenmaki K., Edelman S., Korhonen T. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 2005; 13(2):79–85. DOI: 10.1016/j.tim.2004.12.003.
27. Lathem W., Price P., Miller V., Goldman W. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science*. 2007; 315(5811):509–13. DOI: 10.1126/science.1137195.
28. Lawrenz M., Pennington J., Miller V. Acquisition of ompT reveals cryptic virulence function of autotransporter YaeP in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2013; 89(2):276–87. DOI: 10.1111/mmi.12273.
29. Liu H., Wang H., Qiu J., Wang X., Guo Z., Qiu Y., Zhou D., Han Y., Du Z., Li C., Song Y., Yang R. Transcriptional profiling of a mice plague model: insights into interaction between *Yersinia pestis* and its host. *J. Basic. Microbiol.* 2009; 49(1):92–9. DOI: 10.1002/jobm.200800027.
30. Lobo L. Adhesive properties of the purified plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 262(2):158–62. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00382.x.
31. Myohanen H., Vaheeri A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(22):2840–58. DOI: 10.1007/s00018-004-4230-9.
32. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiological agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10(1):35–66.
33. Plano G., Schesser K. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol. Res.* 2013; 57(1–3):237–45. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3.
34. Renckens R., Roelofs J., Bonta P., Florquin S., de Vries C., Levi M., Carmeliet P., van't Veer C., van der Poll T. Plasminogen activator inhibitor type 1 is protective during severe Gram-negative pneumonia. *Blood*. 2007; 109(4):1593–601. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025197.
35. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D., Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(14):5526–30. DOI: 10.1073/pnas.0509544103.
36. Sebbane F., Lemaite N., Sturdevant D., Reibel R., Virtaneva K., Porcella S., Hinnebusch B. Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(31):11766–71. DOI: 10.1073/pnas.0601182103.
37. Schaller J., Gerber S. The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68(5):785–801. DOI: 10.1007/s00018-010-0566-5.
38. Sodeinde O., Goguen J. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1988; 56(10):2743–8.
39. Sodeinde O., Sample A., Brubaker R., Goguen J. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 1988; 56(10):2749–52.
40. Sodeinde O., Goguen J. Nucleotide sequence of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis*: relationship to *ompT* of *E. coli* and gene E of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1989; 57(5):1517–23.
41. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992; 258(5084):1004–7. DOI: 10.1126/science.1439793.
42. Stenseth N.C., Atshabar B.B., Begon M., Belmain S.R., Bertherat E., Carniel E., Gage K., Leirs H., Rahalison L. Plague: past, present, and future. *PLoS Med.* 2008; 5(1):e3. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050003.
43. Suomalainen M., Lobo L., Brandenburg K., Lindner B., Virkola R., Knirel Y., Anisimov A., Holst O., Korhonen T. Temperature-induced changes in the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* affect plasminogen activation by the Pla surface protease. *Infect. Immun.* 2010; 78(6):2644–52. DOI: 10.1128/IAI.01329-09.
44. Titball R., Oyston P. A plague upon fibrin. *Nat. Med.* 2007; 13(3):253–4. DOI: 10.1038/nm0307-253.
45. Valls Serón M., Haiko J., de Groot P., Korhonen T., Meijers J. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is degraded by *Salmonella enterica* and *Yersinia pestis*. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8(10):2232–40. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04014.x.
46. Vandeputte-Rutten L., Kramer R., Kroon J., Dekker N., Egmond M., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20(18):5033–9. DOI: 10.1093/emboj/20.18.5033.
47. Vollmer W., Pils H., Hantke K., Hölte J., Braun V. Pesticin displays muramidase activity. *J. Bacteriol.* 1997; 179(5):1580–3.
48. Welch T., Fricke W., McDermott P., White D., Rosso M., Rasko D., Mammel M., Eppinger M., Rosovitz M., Wagner D., Rahalison L., Leclerc J., Hinshaw J., Lindler L., Cebula T., Carniel E., Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*. 2007; 2(3):e309. DOI: 10.1371/journal.pone.0000309.
49. Welkos S., Friedlander A., Davis K. Studies on the role of plasminogen activator in systemic infection by virulent *Yersinia pestis* strain C092. *Microb. Pathog.* 1997; 23(4):211–23. DOI: 10.1006/mpat.1997.0154.
50. Yun T., Cott J., Tapping R., Slauch J., Morrissey J. Proteolytic inactivation of tissue factor pathway inhibitor by bacterial omptins. *Blood*. 2009; 113(5):1139–48. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157180.
51. Zhang S., Park C., Zhang P., Bartra S., Plano G., Klena J., Skurnik M., Hinnebusch J., Chen T. Plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(46):31511–21. DOI: 10.1074/jbc.M804646200.

References

1. Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteyeva I.V., Anisimov A.P. [The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 1:49–51.
2. Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Antibiotic-resistant strains of plague agent and development of procedure for their detection by PCR method]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1:53–7.
3. Beesley E., Brubaker R., Janssen W., Surgalla M. Pesticins. III. Expression of coagulase and mechanisms of fibrinolysis. *J. Bacteriol.* 1967; 94(1):19–26.
4. Benedek O., Nagy G., Emody L. Intracellular signalling and cytoskeletal rearrangement involved in *Yersinia pestis* plasminogen activator (Pla) mediated HeLa cell invasion. *Microb. Pathog.* 2004; 37(1):47–54. DOI: 10.1016/j.micpath.2004.04.001.
5. Bertherat E. Plague in Madagascar: overview of the 2014–2015 epidemic season. *WHO Weekly Epidemiol. Rec.* 2015; 90(20):250–2.
6. Bishop J., Finlay B. Friend or foe? Antimicrobial peptides trigger pathogen virulence. *Trends Mol. Med.* 2006; 12(1):3–6. DOI: 10.1016/j.molmed.2005.11.001.
7. Butler T. Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 89(4):788–93. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0191.
8. Caulfield A., Lathem W. Substrates of the plasminogen activator protease of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012; 954:253–60. DOI: 10.1007/978-1-4614-3561-7_32.
9. Chromy B., Choi M., Murphy G., Gonzales A., Corzett C., Chang B., Fitch J., McCutchen-Maloney S. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol.* 2005; 187(23):8172–80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.
10. Cowan C., Jones H., Kaya Y., Perry R., Straley S. Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasion. *Infect. Immun.* 2000; 68(8):4523–30. DOI: 10.1128/IAI.68.8.4523-4530.2000.
11. Degen J., Bugge T., Goguen J. Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(Suppl 1):24–31. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02519.x.
12. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418.
13. Felek S., Tsang T., Krukons E. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4134–50. DOI: 10.1128/IAI.00167-10.
14. Galvan E., Lasaro M., Schifferli D. Capsular antigen fraction I and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin. *Infect. Immun.* 2008; 76(4):1456–64. DOI: 10.1128/IAI.01197-07.
15. Haiko J., Suomalainen M., Ojala T., Lahteenmaki K., Korhonen T. Breaking barriers – attack on innate immune defences by ompT surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun.* 2009; 15(2):67–80. DOI: 10.1177/1753425909102559.
16. Haiko J., Laakkonen L., Juuti K., Kalkkinen N., Korhonen T. The omptins of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica* cleave the reactive center loop of plasminogen activator inhibitor 1. *J. Bacteriol.* 2010; 192(18):4553–61. DOI: 10.1128/JB.00458-10.
17. Hritonenko V., Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding fam-

- ily of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. *Mol. Membr. Biol.* 2007; 24(5-6):395-406. DOI: 10.1080/09687680701443822.
18. Kienle Z., Emödy L., Svanborg C. and O'Toole P. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138. Pt.8:1679-87.
19. Kim T., Chauhan S., Motin V., Goh E., Igo M., Young G. Direct transcriptional control of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis* by the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* 2007; 189(24):8890-900. DOI: 10.1128/JB.00972-07.
20. Knirel Y., Lindner B., Vinogradov E., Kocharova N., Senchenkova S., Shaikhutdinova R., Dentovskaya S., Fursova N., Bakhteeva I., Titareva G., Balakhonov S., Holst O., Gremyakova T., Pier G., Anisimov A. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Biochemistry.* 2005; 44(5):1731-43. DOI: 10.1021/bi048430f.
21. Korhonen T., Haiko J., Leakkonen L., Jarvinen H., Westerlund-Wikstrom B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013; 3(35):1-9. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00035.
22. Korhonen T. Fibrinolytic and procoagulant activities of *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13(1):115-20. DOI: 10.1111/jth.12932.
23. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emödy L., Lång H., Korhonen T. Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097-111. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02451.x.
24. Kukkonen M., Korhonen T. The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7-14. DOI: 10.1016/j.ijmm.2004.01.003.
25. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllonen P., Lahteenmaki K., Lång H., Virkola R., Helander I., Holst O., Korhonen T. Lack of O-antigen is essential for plasminogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 2004; 51(1):215-25. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03817.x.
26. Lahteenmaki K., Edelman S., Korhonen T. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 2005; 13(2):79-85. DOI: 10.1016/j.tim.2004.12.003.
27. Latham W., Price P., Miller V., Goldman W. A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science.* 2007; 315(5811):509-13. DOI: 10.1126/science.1137195.
28. Lawrenz M., Pennington J., Miller V. Acquisition of omptin reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2013; 89(2):276-87. DOI: 10.1111/mmi.12273.
29. Liu H., Wang H., Qiu J., Wang X., Guo Z., Qiu Y., Zhou D., Han Y., Du Z., Li C., Song Y., Yang R. Transcriptional profiling of a mice plague model: insights into interaction between *Yersinia pestis* and its host. *J. Basic. Microbiol.* 2009; 49(1):92-9. DOI: 10.1002/jobm.200800027.
30. Lobo L. Adhesive properties of the purified plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 262(2):158-62. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00382.x.
31. Myohanen H., Vaheri A. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(22):2840-58. DOI: 10.1007/s00018-004-4230-9.
32. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiological agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10(1):35-66.
33. Plano G., Schesser K. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol. Res.* 2013; 57(1-3):237-45. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3.
34. Renckens R., Roelofs J., Bonta P., Florquin S., de Vries C., Levi M., Carmeliet P., van't Veer C., van der Poll T. Plasminogen activator inhibitor type 1 is protective during severe Gram-negative pneumonia. *Blood.* 2007; 109(4):1593-601. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025197.
35. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D., Hinnebusch B. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(14):5526-30. DOI: 10.1073/pnas.0509544103.
36. Sebbane F., Lemaite N., Sturdevant D., Rebeil R., Virtaneva K., Porcella S., Hinnebusch B. Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(31):11766-71. DOI: 10.1073/pnas.0601182103.
37. Schaller J., Gerber S. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68(5):785-801. DOI: 10.1007/s00018-010-0566-5.
38. Sodeinde O., Goguen J. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 1988; 56(10):2743-8.
39. Sodeinde O., Sample A., Brubaker R., Goguen J. Plasminogen activator/coagulase gene of *Yersinia pestis* is responsible for degradation of plasmid-encoded outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 1988; 56(10):2749-52.
40. Sodeinde O., Goguen J. Nucleotide sequence of the plasminogen activator gene of *Yersinia pestis*: relationship to *ompT* of *E. coli* and gene *E* of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 1989; 57(5):1517-23.
41. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science.* 1992; 258(5084):1004-7. DOI: 10.1126/science.1439793.
42. Stenseth N.C., Atshabar B.B., Begon M., Belmain S.R., Bertherat E., Carniel E., Gage K., Leirs H., Rahalison L. Plague: past, present, and future. *PLoS Med.* 2008; 5(1):e3. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050003.
43. Suomalainen M., Lobo L., Brandenburg K., Lindner B., Virkola R., Knirel Y., Anisimov A., Holst O., Korhonen T. Temperature-induced changes in the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* affect plasminogen activation by the Pla surface protease. *Infect. Immun.* 2010; 78(6):2644-52. DOI: 10.1128/IAI.01329-09.
44. Titball R., Oyston P. A plague upon fibrin. *Nat. Med.* 2007; 13(3):253-4. DOI: 10.1038/nm0307-253.
45. Valls Serón M., Haiko J., de Groot P., Korhonen T., Meijers J. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is degraded by *Salmonella enterica* and *Yersinia pestis*. *J. Thromb. Haemost.* 2010; 8(10):2232-40. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04014.x.
46. Vandeputte-Rutten L., Kramer R., Kroon J., Dekker N., Egmond M., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20(18):5033-9. DOI: 10.1093/emboj/20.18.5033.
47. Vollmer W., Pils H., Hantke K., Hölte J., Braun V. Pesticin displays muramidase activity. *J. Bacteriol.* 1997; 179(5):1580-3.
48. Welch T., Fricke W., McDermott P., White D., Rosso M., Rasko D., Mammel M., Eppinger M., Rosovitz M., Wagner D., Rahalison L., Leclerc J., Hinshaw J., Lindler L., Cebula T., Carniel E., Ravel J. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One.* 2007; 2(3):e309. DOI: 10.1371/journal.pone.0000309.
49. Welkos S., Friedlander A., Davis K. Studies on the role of plasminogen activator in systemic infection by virulent *Yersinia pestis* strain C092. *Microb. Pathog.* 1997; 23(4):211-23. DOI: 10.1006/mpat.1997.0154.
50. Yun T., Cott J., Tapping R., Schlauch J., Morrissey J. Proteolytic inactivation of tissue factor pathway inhibitor by bacterial omptins. *Blood.* 2009; 113(5):1139-48. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157180.
51. Zhang S., Park C., Zhang P., Bartra S., Plano G., Klena J., Skurnik M., Hinnebusch J., Chen T. Plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(46):31511-21. DOI: 10.1074/jbc.M804646200.

Authors:

Kukleva L.M., Boiko A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Куклева Л.М., Бойко А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 23.11.15.

Т.Е.Сизикова, В.Н.Лебедев, Н.В.Боярская, С.В.Борисевич

ДИАГНОСТИКА ОСТРОЙ ЛИХОРАДКИ С ТРОМБОЦИТОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ – БОЛЕЗНИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ НОВЫМ ФЛЕБОВИРУСОМ*ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад, Российская Федерация*

В 2009 г. в КНР от больного был выделен новый вирус, получивший название вирус острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом (SFTS). Болезнь, вызываемая этим вирусом, характеризуется острой лихорадкой, поражениями респираторного и желудочно-кишечного тракта, сопровождается прогрессирующей тромбоцитопенией, лейкопенией, летальностью в 6–30 % случаев. Секвенирование генома выделенного возбудителя установило, что вирус SFTS относится к новой (третьей) группе рода *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae*. В настоящее время для специфической диагностики SFTS разработаны различные методы (обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция, непрямой метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ). В обзоре рассмотрена разработка диагностических наборов и основные характеристики методов выявления возбудителя инфекции и специфических антител к нему.

Ключевые слова: острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом, вирус острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом, флебовирус, геномная РНК, праймер, обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция, метод флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации, чувствительность, специфичность.

Корреспондирующий автор: Сизикова Татьяна Евгеньевна, e-mail: 48cnii@mail.ru.

T.E.Sizikova, V.N.Lebedev, N.V.Boyarskaya, S.V.Borisevich

Diagnostics of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome – Disease, Caused by Novel Phlebovirus*The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation*

In 2009, a novel virus, named severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus, was isolated from a patient in China. The illness caused by this novel virus is characterized by a sudden onset of fever and respiratory or gastrointestinal disorders, followed by progressive thrombocytopenia and leucocytopenia, the case-fatality rate amounting to 6–30 %. Genomic sequencing of the isolated agent indicated that the SFTS virus constituted a new (third) group of Phlebovirus genus, Bunyaviridae family. Presently, different means for specific diagnostics of SFTS (real-time reverse transcription polymerase chain reaction, indirect fluorescent antibodies method, enzyme-linked immune-sorbent assay) are developed. Constructing of diagnostic kits, basic characteristics of methods for determination of causative agent of infection or specific antibodies against it are considered in this review.

Key words: severe fever with thrombocytopenia syndrome, severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, phlebovirus, genomic RNA, primer, reverse transcription-polymerase chain reaction, fluorescent antibodies method, enzyme linked immunosorbent assay, neutralization testing, sensitivity, specificity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Taniana E. Sizikova, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Boyarskaya N.V., Borisevich S.V. Diagnostics of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome – Disease, Caused by Novel Phlebovirus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:21–26. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-21–26

В марте 2009 г. в КНР выявлена новая вирусная инфекция человека с высокой летальностью (до 30 %). У заболевших отмечена тяжелая лихорадка и тромбоцитопения. Болезнь по клинической картине напоминала анаплазмоз, однако антитела к данному возбудителю в сыворотках крови реконвалесцентов не выявлены. Болезнь получила название «Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом» (англ. Severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS)).

В июне 2009 г. из биоматериала первого зарегистрированного больного выделен ранее неизвестный вирус, относящийся к роду *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae*. Позже этот же возбудитель был выделен от других больных и клещей видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus*. Выделенный

возбудитель получил название по нозологической форме – вирус SFTS (в литературе также встречаются названия «вирус лихорадки Хэнань» и «вирус Huiyangshan») [15, 16].

Вирус поражает тромбоциты и лимфоциты больного, что быстро приводит к поражениям внутренних органов. Уровень летальности у лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом составляет в среднем 12 %.

В последующем аналогичные случаи заболевания зарегистрированы в КНДР, Южной Корее и Японии. В Южной Корее из 36 зарегистрированных в 2013 г. случаев 17 (47 %) завершились летальным исходом.

Основные симптомы SFTS (лихорадка с температурой от 39,2 до 39,7 °C, слабость, поражение

конъюнктив, диарея, боли в брюшной полости, лейкоцитопения, тромбоцитопения, протеинурия и гематурия) являются неспецифическими, т.е. поставить точный диагноз только по клинической картине не представляется возможным [15].

Наиболее распространенными отклонениями при лабораторном тестировании являются тромбоцитопения (в 95 % случаев) и лимфоцитопения (в 86 % случаев). В большинстве случаев у больных развивается мультиорганный недостаток, о чем свидетельствуют повышенные уровни аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, креатинкиназы и лактатдегидрогеназы. Также часто наблюдали протеинурию (в 84 % случаев) и гематурию (в 59 % случаев) [15]. Указанные отклонения являются характерными для многих вирусных инфекций, в том числе и вирусных геморрагических лихорадок.

Основные признаки болезни, которые позволяют предполагать возможность SFTS, следующие: температура тела выше 38,2 °C; симптомы заболевания желудочно-кишечного тракта (тошнота, рвота, боли в брюшной полости, диарея и признаки кишечного кровотечения); тромбоцитопения с концентрацией тромбоцитов менее $100 \cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$; лейкопения с концентрацией лейкоцитов менее $4 \cdot 10^9 \cdot \text{л}^{-1}$; повышенный уровень аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы.

Не вызывает сомнений то, что для постановки диагноза SFTS необходимы методы специфической диагностики.

Вирус SFTS впервые выделен от 42-летнего больного мужчины, проживавшего в провинции Хэнань. Выделенный изолят вируса получил название штамм DBM. В последующем из биопроб, полученных от других больных, выделено еще 11 штаммов вируса SFTS. С помощью электронной микроскопии показано, что вирионы вируса SFTS имеют сферическую форму с диаметром 80–100 мкм. В инфицированных клетках вирионы можно наблюдать внутри вакуолей, главным образом, в аппарате Гольджи.

Частичное секвенирование генома первоначально проведено для штамма DBM, впоследствии определили полную последовательность генома еще 11 штаммов вируса SFTS. Все штаммы, включая штамм DBM, по нуклеотидной последовательности являлись близкородственными, уровень гомологии по всем сегментам генома составлял 96 %. Концевые участки всех трех сегментов генома сходны с таковыми для других флебовирусов. L-сегмент генома состоит из 6368 нуклеотидов и содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую 2084 аминокислоты. M-сегмент генома состоит из 3378 нуклеотидов и содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую 1073 аминокислоты (предшественник гликопротеинов Gn и Gc). S-сегмент генома состоит из 1744 нуклеотидов РНК и характеризуется амбисенсной стратегией кодирования белков N и NSs, содержит две рамки считывания, разделенные внутренним регионом из 62 нуклеотидов. Белок NSs

играет важную роль в патогенезе, подавляя синтез интерферона в инфицированных клетках [10].

Полные последовательности L-, M- и S-сегментов генома депонированы в GenBank под номерами KF358691, KF358692 и KF358693 соответственно [5].

Филогенетический анализ, проведенный с помощью определения полноразмерных последовательностей сегментов L, M и S штаммов DBM, HN6 и HB29 вируса SFTS, выявил, что данный вирус относится к роду *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae*, причем занимает промежуточное положение между двумя другими группами рода *Phlebovirus* (группа Сицилийской москитной лихорадки, в которую кроме одноименного вируса также входят вирусы лихорадки долины Рифт (ЛДР), Пунта-Тора, Тоскана и Массила, группа вируса Укуниеме). Результаты филогенетического анализа установили, что вирус SFTS является прототипным агентом третьей группы рода *Phlebovirus*. Из представителей первой и второй групп к вирусу SFTS наиболее близок вирус Укуниеме (уровень гомологии по сегментам L, M и геномной РНК составляет 34, 24 и 29 % соответственно) [13]. Эти данные нашли подтверждение при анализе аминокислотных последовательностей структурных белков вируса SFTS и других флебовирусов. Показано, что РНК-зависимая РНК-полимераза и гликопротеины вируса SFTS более родственны соответствующим белкам вируса Укуниеме, однако белки нуклеокапсида вирусов SFTS и ЛДР являются более близкородственными (уровень гомологии 41,4 %). Наиболее уникальной структурой характеризуется белок NSs, кодируемый S-сегментом геномной РНК вируса SFTS, для которого уровень гомологии с другими флебовирусами находится на уровне от 11,2 до 16,0 %.

В группу вируса SFTS рода *Phlebovirus* может быть включен новый вирус (вирус Heartland), выделенный в штате Миссури (США) в 2009 г. от больных, у которых наблюдали схожую с SFTS симптоматику. Уровень гомологии вирусов SFTS и Heartland по генам двух наиболее консервативных белков флебовирусов (РНК-зависимой РНК-полимеразы и нуклеокапсида) составляет 73 и 62 % соответственно [8].

При анализе геномных последовательностей изолятов вируса SFTS, выделенных в КНР в 2009–2011 гг., Lam T. *et al.* [6], установили циркуляцию двух основных линий возбудителя, вероятно, являющихся продуктом гомологичной рекомбинации в процессе молекулярной эволюции вируса SFTS.

Для диагностики SFTS используют различные методы, включающие выделение биологически активного вируса, амплификацию его нуклеиновой кислоты и выявление специфических антител в сыворотке крови переболевших [15].

Выделение биологически активного вируса при первом официально подтвержденном случае болезни описано в работе X.J. Yu *et al.* [15].

Для выделения возбудителя использовали монослойные культуры клеток человека (HL60), млекопи-

тающих (DH82, L929, Vero, Vero E6), клещей ISE6, которые заражали экстрактом белых кровяных телец больных. Поддерживающую среду меняли два раза в неделю. Спустя один месяц после инокуляции клеточных монослойных культур различных клеток цитопатический эффект выявили в клетках DH82. После нескольких пассажей в клетках DH82 цитопатический эффект, проявлявшийся в удлинении клеток с наличием гранулированных частиц в цитоплазме, выявляли спустя 4 сут после инфицирования монослоя.

Установлено, что вирус SFTS может инфицировать различные клетки, в том числе L929, Vero, Vero E6, но цитопатический эффект проявлялся только в клетках DH82 [15] и Vero E6 [13].

Рассмотрим другие случаи выделения вируса SFTS от больных. В Японии возбудитель выделен от 59-летней женщины, проживающей в префектуре Ямагути. Больную госпитализировали с высокой температурой (39,2 °C), рвотой и признаками кишечного кровотечения. Лабораторные анализы показали наличие тромбоцитопении, лейкопении, повышенные уровни аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и креатинкиназы, протеинурию и микрогематурию. Спустя трое суток после госпитализации больная погибла. Вирус SFTS выделили из сыворотки крови больной путем инфицирования клеток Vero. Идентификация выделенного возбудителя проведена с помощью ОТ-ПЦР. Филогенетический анализ выделенного возбудителя показал его близкое родство со штаммами вируса SFTS, выделенными в КНР. Не выявлено влияния пространственных или временных факторов выделения возбудителя на изменение его генома [12].

К.Н. Kim *et al.* [5] провели выделение и идентификацию вируса SFTS, выделенного от 63-летней женщины, проживавшей в провинции Гангвон, Южная Корея. Больная погибла на 10-е сутки после госпитализации от мультиорганной недостаточности. Вирус удалось выделить из пробы крови больной, хранившейся в течение 7 месяцев при температуре минус 70 °C, путем инфицирования клеток Vero и DH82. Проведенное секвенирование геномной РНК

полученного изолята показало его близкое родство штаммам вируса, выделенным в Китае и Японии. Уровень гомологии по сегментам L, M и S составлял 95,8–99,8; 94,1–99,9 и 94,8–99,7 % соответственно.

Исследования с возбудителями инфекционных болезней, направленные на разработку профилактических и лечебных средств, как правило, требуют наличия доступной лабораторной модели. Jin C. *et al.* [4] при исследованиях, проводимых с вирусом SFTS, обосновали возможность использования в качестве лабораторных животных белых мышей линии C57/BL6, у которых после инфицирования наблюдается тромбоцитопения и лейкоцитопения. Вирус SFTS накапливается в цитоплазме макрофагов и красной пульпе селезенки.

Лабораторной моделью, позволяющей выявлять летальный исход при инфицировании вирусом SFTS, являются мыши линии ICR, генетически дефектные по синтезу интерферонов α и β . Гибель животных наступает на 3–4-е сутки после подкожного введения $1 \cdot 10^6$ бляшкообразующих частиц вируса [7].

Вскоре после выявления вируса SFTS была разработана амплификационная тест-система для выявления в исследуемых пробах РНК данного возбудителя. Праймеры рассчитаны при анализе геномной последовательности из 168 нуклеотидов, выявленной в сыворотках крови больных SFTS [13]. В дальнейшем праймеры, используемые при постановке ОТ-ПЦР, рассчитывали на основании опубликованных полных последовательностей L-, M- и S-сегментов генома, депонированных в GenBank под номерами KF358691, KF358692 и KF358693 соответственно [5]. Структура олигонуклеотидных праймеров, используемых при постановке ОТ-ПЦР и проведении генотипирования вируса SFTS, представлена в табл. 1.

Как следует из представленных данных, большая часть используемых в исследованиях олигонуклеотидных праймеров ориентирована на выявление специфических нуклеотидных последовательностей, расположенных на S-сегменте генома.

Y. Sun *et al.* [11] проведен выбор праймеров, специфичных не только к S-, но и к L- и M- сегментам

Таблица 1

Структура олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК методом ОТ-ПЦР при проведении генотипирования вируса SFTS

Структура праймеров		Ген-мишень	Источник
Прямого	Обратного		
5/-GACAGGCTCCTCAAGGCTCT-3/	5'-GCCCCAGTAGCCCTGAGTTTC-3'	S-сегмент	13
5/-ACCTCTTTTGACCCTGAGTTWGACA-3/	5'-CTGAAGGAGACAGGTGGAGATGA-3'	S-сегмент	17
5/-ACATTTTCCCTGATGCCTATGCCTTC-3/	5'-GAGGTGGACAGAGGAAGTCG-3'	S-сегмент	10
5/-cagatacccccgcagttg-3/	5'-AGAGGTTGATGGCACTCCA-3'	S-сегмент	14
5/-tatctcccagtggggcccagctccaaaggccatgcac-3/	5'-GTGGGAAGGCTCTGCGCTACTGAGAGGGCAGAAACCAGG-3'	S-сегмент	
5/-aaggttgagaattatccccctg-3/	5'-CCTCACAGGAGTGATTGAGAG-3'	S-сегмент	
5/-gggtccctgaaggagttgtaa-3/	5'-TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT-3'	S-сегмент	2
5/-agtgtaggtcatctgatccgttyag-3/	5'-TGTAAGTTTCGCCCTTTGTCCAT-3'	L-сегмент	11
5/-aagaagtgctgttcattattg-3/	5'-GCCTTAAGGACATTGGTGAGTA-3'	M-сегмент	
5/-gggtccctgaaggagttgtaa-3/	5'-TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT-3'	S-сегмент	

генома. Чувствительность тест-систем с использованием трех специфичных для каждого сегмента генома пар праймеров составляла 10 геном-эквивалентов на 1 мкл, что соответствовало $10 \text{ ЦПД}_{50} \cdot \text{мл}^{-1}$. Специфичность разработанной тест-системы доказывает отсутствие ложноположительных реакций с вирусами Хантаан, денге, гепатитов В и С. При анализе 70 сывороток больных с использованием разработанной тест-системы положительный результат получен в 69 случаях, причем для сывороток, взятых на 1–10-е сутки после начала болезни, доля положительных результатов составляла 100 %.

В ряде работ имеются данные о разработке для выявления возбудителя SFTS различных модификаций ОТ-ПЦР. L.Gui *et al.* [2] для выявления вируса SFTS разработали систему обратной транскрипции с перекрестным праймированием. В реакции были использованы 5 олигонуклеотидных праймеров, специфичных к последовательностям, расположенным на М-сегменте генома, – два рассеянных праймера, два детекторных праймера (прямой и обратный) и перекрестный праймер. Реакцию перекрестного праймирования проводили при 60 °С в течение 90 мин и оставляли прогреванием при 80 °С в течение 2 мин. Для визуализации результатов амплификации использовали стрип-кассеты фирмы Ustar Biotech. Co., Ltd. (КНР). Чувствительность разработанной тест-системы составила 100 геном-эквивалентов на реакцию. 100 % специфичность разработанного набора выявлена при испытаниях с вирусами и доказывает отсутствие ложноположительных реакций с относящимися к семейству *Bunyaviridae* вирусами Хантаан, Сеул, ЛДР, вирусами денге и клещевого энцефалита. С помощью разработанной тест-системы возбудитель выявлен в 94,1 % сывороток больных SFTS.

G.Yang *et al.* [14] разработали тест-систему для быстрого выявления РНК вируса SFTS с помощью ОТ-ПЦР с изотермальной амплификацией. Особенностью разработанного метода является использование в реакционной смеси сразу трех пар праймеров, специфичных по отношению к нуклеотидным последовательностям S-сегмента генома вируса с SFTS с последующей инкубацией при 63 °С в течение 30 мин и детекцией продуктов реакции при электрофорезе в 1 % агарозе. Высокая специфичность этой тест-системы показана при испытаниях с возбудителями различной этиологии, вызывающими у человека заболевания со сходной SFTS симптоматикой (вирусы Хантаан, желтой лихорадки, японского энцефалита, энтеровирус человека 71, вирус Коксаки А-16, вирусы гриппа А(H1N1) и В (Victoria), ротавирус, *Leptospira interrogans*, возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза). Ложноположительные реакции не выявлены.

Чувствительность разработанной тест-системы составила $10 \text{ ЦПД}_{50} \cdot \text{мл}^{-1}$. При анализе 37 сывороток больных с использованием разработанной тест-системы и тест-системы для выявления возбудителя с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени отмечена

примерно равная доля положительных результатов (18 из 37 и 20 из 37 соответственно). Следует отметить, что биологически активный вирус SFTS выделен только в 7 из 37 исследуемых сывороток.

Рассмотренные данные подтверждают тот факт, что некоторые особенности патогенеза флебовирусных инфекций и диссеминации возбудителя в макроорганизме могут привести к отсутствию в биопробе от больного не только вируса, но и фрагментов его геномной РНК [9]. Поскольку вирус из крови обычно удается выделить только с 1-х по 6-е сутки после начала болезни, не у всех пациентов с симптомами возбудитель может быть определен посредством ОТ-ПЦР-РВ [3]. В связи с этим при диагностике SFTS необходимо строго придерживаться рекомендации ВОЗ об использовании, как минимум, двух различных методов. Для диагностики SFTS важное значение имеют методы, направленные на выявление специфических антител. В качестве таких методов при определении специфических антител к вирусу SFTS апробированы метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция нейтрализации (микротест) (РНМТ).

Y.Jiao *et al.* [3] для определения специфических антител к вирусу SFTS в ИФА и МФА обосновали возможность использования рекомбинантного белка нуклеокапсида данного возбудителя. Процедура приготовления набора включала экстракцию РНК вируса SFTS из инфицированной культуры клеток Vero, амплификацию гена белка нуклеокапсида с помощью ОТ-ПЦР со специфическими праймерами, клонирование гена в плазмидном векторе pET-28(a)+, трансформацию рекомбинантного вектора в *E. coli* BL21, лизирование клеток, содержащих рекомбинантный белок, и выделение последнего с помощью аффинной хроматографии. Идентичность полученного рекомбинантного белка белку нуклеопротеина нативного вируса подтверждена с помощью анализа Вестерн-блот.

При испытаниях полученного набора отмечено, что все сыворотки, дающие положительный результат в РНМТ, давали положительный результат и в ИФА.

При проведении РНМТ X.J.Yu *et al.* [15] смешивали равные объемы вируса SFTS (расчетное содержание биологически активного вируса 100 ЦПД_{50}) и исследуемых разведений иммунной сыворотки. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 1,5 ч. Затем смесь разливали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 в течение 12 сут. Развитие инфекции в клетках определяли с помощью МФА. За титр сыворотки принимали высшее разведение, при котором проходило ингибирование репродукции вируса в клетках.

X.J.Yu *et al.* [15] с помощью МФА, ИФА, РНМТ провели исследования по сероконверсии в отношении SFTS. В опытах использовали сыворотки крови больных, у которых возбудитель SFTS выявлен с помощью ОТ-ПЦР. Результаты исследования сывороток больных, взятых в провинции Хубэй, представлен-

Таблица 2

Результаты серологического исследования сывороток крови больных SFTS. Данные X.J.Yu *et al.* [15]

Шифры сывороток крови больных	Время взятия крови после начала болезни, сут		Титры антител (обратная величина), определенные в сыворотках крови больных в острой фазе болезни и стадии реконвалесценции, с помощью					
	Острая фаза	Фаза реконвалесценции	МФА		ИФА		РНМТ	
HB03	7	40	<20	160	<100	6400	<10	640
HB08	2	34	<20	160	<100	25600	<10	640
HB10	2	30	<20	320	100	6400	<10	160
HB11	5	40	<20	>320	<100	25600	<10	160
HB12	13	42	20	>320	400	25600	<10	160
HB14	11	45	<20	>320	<100	6400	<10	640
HB16	4	55	20	>320	100	25600	40	160
HB18	6	33	<20	80	100	6400	<10	160
HB20	8	30	<20	320	100	25600	<10	160
HB24	8	46	<20	>320	100	25600	40	160
HB29	9	52	<20	160	<100	25600	40	640

ные в табл. 2, свидетельствуют о том, что сероконверсия была отмечена у всех больных, что особенно отчетливо проявлялось при анализе данных РНМТ. Аналогичные результаты получены при анализе парных сывороток больных, выделенных в провинциях Шаньдун и Хэнань [1, 18].

Наиболее информативные результаты можно получить при комплексном исследовании сывороток крови больных различными методами. При исследованиях, проведенных в провинции Хэнань, в 223 из 285 (78,24 %) сыворотках больных, взятых в острой фазе болезни, с помощью ОТ-ПЦР выявлена РНК вируса SFTS [13]. Авторы показали зависимость возможности идентификации болезни с помощью выявления специфической РНК (в ОТ-ПЦР) и/или специфических иммуноглобулинов изотипа G (IgG) (в МФА) от продолжительности болезни с момента ее начала (табл. 3).

На ранних сроках (до 7-х суток) болезни специфическую диагностику целесообразно проводить при использовании ОТ-ПЦР.

Анализ данных о заболеваемости SFTS указывает на наличие серьезной потенциальной опасности для здравоохранения Российской Федерации, поскольку эпидемические очаги SFTS располагаются в сопредельных с Дальневосточным регионом территориях. Клещи видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus*, являющиеся вектором пере-

дачи инфекции, а также ее возможным резервуаром, характеризуются широким ареалом распространения. Болезнь, характеризующаяся высокой летальностью, сложно идентифицировать только по ее клинической картине. В этой связи важное значение приобретает разработка методов специфической лабораторной диагностики SFTS и, в первую очередь, разработка молекулярно-биологических методов выявления и идентификации возбудителя, в частности, различных модификаций ОТ-ПЦР.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui F., Cao H.X., Wang L., Zhang S.F., Ding S.J., Yu X.J., Yu H. Clinical and epidemiological study on Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan county, Shandong province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(3):510–2. DOI: 10.4269/ajtmh.11-0760.
2. Gui L., Ge Y., Qi X., Xu G., Li H., Zhao K., Wu B., Shi Z., Guo X., Hu L., You Q., Zhang L.H., Freiberg A.N., Yu X., Wang H., Zhou M., Tang Y.W. Detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by reverse transcription-cross-priming amplification coupled with vertical flow visualization. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(12):3881–5. DOI: 10.1128/JCM.01931-12.
3. Jiao Y., Zeng X., Guo X., Qi X., Zhang X., Shi Z., Zhou M., Bao C., Zhang W., Xu Y., Wang H. Preparation and evaluation of nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double-antigen sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(2):372–7. DOI: 10.1128/JCM.01319-11.
4. Jin C., Liang M., Ning J., Gu W., Jiang H., Wu W., Zhang F., Li C., Zhang Q., Zhu H., Chen T., Han Y., Zhang W., Zhang S., Wang Q., Sun L., Liu Q., Li J., Wang T., Wei Q., Wang S., Deng Y., Qin C., Li D. Pathogenesis of emerging severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in C57/BL6 mouse model. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(25):10053–8. DOI: 10.1073/pnas.1120246109.
5. Kim K.H., Yi J., Kim G., Choi S.J., Jun K.I., Kim N.H., Choe P.G., Kim N.J., Lee J.K., Oh M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11):1892–4. DOI: 10.3201/eid1911.130792.
6. Lam T.T., Liu W., Bowden T.A., Cui N., Zhuang L., Liu K., Zhang Y.Y., Gao W.C., Pybus O.G. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics.* 2013; 5:1–10. DOI: 10.1016/j.epidem.2012.09.002.
7. Liu Y., Wu B., Paessler S., Walker D.H., Tesh R.B., Yu X.J. The pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in alpha/beta interferon knockout mice: insights into the pathologic mechanisms of a new viral hemorrhagic fever. *J. Virol.*

Таблица 3

Выявление специфической РНК вируса SFTS (в ОТ-ПЦР) и специфических иммуноглобулинов к вирусу SFTS (в МФА). Данные B.Xu *et al.* [13]

Продолжительность болезни с момента его начала, сут	Количество проб	Количество положительных проб при выявлении	
		IgG (%)	РНК (%)
1–3	87	4 (4,6)	72 (82,8)
4–6	134	27 (20,1)	117 (87,3)
7–14	64	49 (76,6)	34 (53,1)
Всего	285	80 (28,1)	223 (78,24)

2014; 88(3):1781–6. DOI: 10.1128/jvi.02277-13.

8. McMullan L.K., Folk S.M., Kelly A.J., MacNeil A., Goldsmith C.S., Metcalfe M.G., Batten B.C., Albarino C.G., Zaki S.R., Rollin P.E., Nicholson W.L., Nichol S.T. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(9):834–41. DOI: 10.1056/nejmoa1203378.

9. Pepin M., Boulou M., Bird B., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (*Bunyaviridae: Phlebovirus*): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vector diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41(6):61–101. DOI: 10.1051/vetres/2010033.

10. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J., Xu W., Tang f., Li Z., Wu B., Powell K., Wegner M., Li D., Xing Z. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86(16):8388–401. DOI: 10.1128/jvi.00612-12.

11. Sun Y., Liang M., Qu J., Jin C., Zhang Q., Li J., Jiang X., Wang Q., Lu J., Gu W., Zhang S., Li C., Wang X., Zhan F., Yao W., Bi Z., Wang S., Li D. Early diagnosis of novel SFTS bunyavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay. *J. Clin. Virol.* 2012; 53:48–53. DOI:10.1016/j.jcv.2011.09.031.

12. Takahashi T., Maeda K., Susuki T., Ishido A., Shigeoka T., Tominaga T., Kamei T., Honda M., Ninomiya D., Sakai T., Senba T., Kaneyuki S., Sakaguchi S., Satoh A., Hosokawa T., Kawabe Y., Kurihara S., Izumikawa K., Kohno S., Azuma T., Suemori K., Yasukawa M., Mizutani T., Omatsu T., Katayama Y., Miyahara M., Ijuin M., Doi K., Okuda M., Umeki K., Saito T., Fukushima K., Nakajima K., Yoshikawa T., Tani H., Fukushi S., Fukuma A., Ogata M., Shimajima M., Nakajima N., Nagata N., Katano H., Fukumoto H., Sato Y., Hasegawa H., Yamagishi T., Oishi K., Kurane I., Morikawa S., Saijo M. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(6):816–27. DOI: 10.1093/infdis/jit603.

13. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y., Wang P., Tang X., Wang H., Kang K., Zhang S., Zhao G., Wu W., Yang Y., Chen H., Mu F., Chen W. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: Discovery of a new Bunyavirus. *PLOS Pathogens.* 2011; 7(11):e1002369. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002369.

14. Yang G., Li B., Liu L., Huang W., Zhang W., Liu Y. Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of a new SFTS bunyavirus. *Arch. Virol.* 2012; 157:1779–83. DOI: 10.1007/s00705-012-1348-1.

15. Yu X.J., Liang M.F., Zhang S.Y., Liu Y., Li J.D., Sun Y.L., Zhang L., Zhang Q.F., Popov V.L., Li C., Qu J., Li Q., Zhang Y.P., Hai R., Wu W., Wang Q., Zhan F.X., Wang X.J., Kan B., Wang S.W., Wan K.L., Jing H.Q., Lu J.X., Yin W.W., Zhou H., Guan X.H., Liu J.F., Bi Z.Q., Liu G.H., Ren J., Wang H., Zhao Z., Song J.D., He J.R., Wan T., Zhang J.S., Fu X.P., Sun L.N., Dong X.P., Feng Z.J., Yang W.Z., Hong T., Zhang Y., Walker D.H., Wang Y., Li D.X. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(16):1523–32. DOI: 10.1056/nejmoa1010095.

16. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B., Chen X.P., Gao D.Y., He Y.W., Jin D., Sun Q., Guo W.P., Wang W., Yu B., Li J., Dai Y.A., Li W., Peng J.S., Zhang G.B., Zhang S., Chen X.M., Wang Y., Li M.H., Lu X., Ye C., de Jong M.D., Xu J. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China. *J. Virol.* 2012; 86(5):2864–8. DOI: 10.1128/jvi.06192-11.

17. Zhang Y.Z., He Y.W., Dai Y.A., Xiong Y., Zheng H., Zhou D.J., Li Y., Sun Q., Luo X.L., Chen Y.L., Qin X.C., Tian J.H., Chen X.P., Yu B., Jin D., Guo W.P., Li W., Wang W., Peng J.S., Zhang G.B., Zhang S., Chen X.M., Wang Y., Li M.H., Li Z., Lu S., Ye C., de Jong M.D., Xu J. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. *Clin. Inf. Dis.* 2012; 54:527–33. DOI: 10.1093/cid/cir804.

18. Zhao L., Zhai S., Wen H., Cui F., Chi Y., Wang L., Xue F., Wang Q., Wang Z., Zhang S., Song Y., Du J., Yu X. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, Shandong province, China, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(6):963–5. DOI: 10.3201/eid2001.120532.

References

1. Cui F., Cao H.X., Wang L., Zhang S.F., Ding S.J., Yu X.J., Yu H. Clinical and epidemiological study on Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan country, Shandong province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2013; 88(3):510–2. DOI: 10.4269/ajtmh.11-0760.

2. Gui L., Ge Y., Qi X., Xu G., Li H., Zhao K., Wu B., Shi Z., Guo X., Hu L., You Q., Zhang L.H., Freiberg A.N., Yu X., Wang H., Zhou M., Tang Y.W. Detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus by reverse transcription-cross-priming amplification coupled with vertical flow visualization. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(12):3881–5. DOI: 10.1128/JCM.01931-12.

3. Jiao Y., Zeng X., Guo X., Qi X., Zhang X., Shi Z., Zhou M., Bao C., Zhang W., Xu Y., Wang H. Preparation and evaluation of recombinant severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein for detection of total antibodies in human and animal sera by double-antigen sandwich enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(2):372–7. DOI: 10.1128/JCM.01319-11.

4. Jin C., Liang M., Ning J., Gu W., Jiang H., Wu W., Zhang F., Li C., Zhang Q., Zhu H., Chen T., Han Y., Zhang W., Zhang S., Wang Q., Sun L., Liu Q., Li J., Wang T., Wei Q., Wang S., Deng Y., Qin C., Li D. Pathogenesis of emerging severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in C57/BL6 mouse model. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(25):10053–8. DOI: 10.1073/pnas.1120246109.

5. Kim K.H., Yi J., Kim G., Choi S.J., Jun K.I., Kim N.H., Choe P.G., Kim N.J., Lee J.K., Oh M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11):1892–4. DOI: 10.3201/eid1911.130792.

6. Lam T.T., Liu W., Bowden T.A., Cui N., Zhuang L., Liu K., Zhang Y.Y., Gao W.C., Pybus O.G. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics.* 2013; 5:1–10. DOI: 10.1016/j.epidem.2012.09.002.

7. Liu Y., Wu B., Paessler S., Walker D.H., Tesh R.B., Yu X.J. The pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in alpha/beta interferon knockout mice: insights into the pathologic mechanisms of a new viral hemorrhagic fever. *J. Virol.* 2014; 88(3):1781–6. DOI: 10.1128/jvi.02277-13.

8. McMullan L.K., Folk S.M., Kelly A.J., MacNeil A., Goldsmith C.S., Metcalfe M.G., Batten B.C., Albarino C.G., Zaki S.R., Rollin P.E., Nicholson W.L., Nichol S.T. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(9):834–41. DOI: 10.1056/nejmoa1203378.

9. Pepin M., Boulou M., Bird B., Kemp A., Paweska J. Rift Valley fever virus (*Bunyaviridae: Phlebovirus*): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vector diagnostics and prevention. *Vet. Res.* 2010; 41(6):61–101. DOI: 10.1051/vetres/2010033.

10. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J., Xu W., Tang f., Li Z., Wu B., Powell K., Wegner M., Li D., Xing Z. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86(16):8388–401. DOI: 10.1128/jvi.00612-12.

11. Sun Y., Liang M., Qu J., Jin C., Zhang Q., Li J., Jiang X., Wang Q., Lu J., Gu W., Zhang S., Li C., Wang X., Zhan F., Yao W., Bi Z., Wang S., Li D. Early diagnosis of novel SFTS bunyavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay. *J. Clin. Virol.* 2012; 53:48–53. DOI:10.1016/j.jcv.2011.09.031.

12. Takahashi T., Maeda K., Susuki T., Ishido A., Shigeoka T., Tominaga T., Kamei T., Honda M., Ninomiya D., Sakai T., Senba T., Kaneyuki S., Sakaguchi S., Satoh A., Hosokawa T., Kawabe Y., Kurihara S., Izumikawa K., Kohno S., Azuma T., Suemori K., Yasukawa M., Mizutani T., Omatsu T., Katayama Y., Miyahara M., Ijuin M., Doi K., Okuda M., Umeki K., Saito T., Fukushima K., Nakajima K., Yoshikawa T., Tani H., Fukushi S., Fukuma A., Ogata M., Shimajima M., Nakajima N., Nagata N., Katano H., Fukumoto H., Sato Y., Hasegawa H., Yamagishi T., Oishi K., Kurane I., Morikawa S., Saijo M. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(6):816–27. DOI: 10.1093/infdis/jit603.

13. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y., Wang P., Tang X., Wang H., Kang K., Zhang S., Zhao G., Wu W., Yang Y., Chen H., Mu F., Chen W. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: Discovery of a new Bunyavirus. *PLOS Pathogens.* 2011; 7(11):e1002369. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002369.

14. Yang G., Li B., Liu L., Huang W., Zhang W., Liu Y. Development and evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of a new SFTS bunyavirus. *Arch. Virol.* 2012; 157:1779–83. DOI: 10.1007/s00705-012-1348-1.

15. Yu X.J., Liang M.F., Zhang S.Y., Liu Y., Li J.D., Sun Y.L., Zhang L., Zhang Q.F., Popov V.L., Li C., Qu J., Li Q., Zhang Y.P., Hai R., Wu W., Wang Q., Zhan F.X., Wang X.J., Kan B., Wang S.W., Wan K.L., Jing H.Q., Lu J.X., Yin W.W., Zhou H., Guan X.H., Liu J.F., Bi Z.Q., Liu G.H., Ren J., Wang H., Zhao Z., Song J.D., He J.R., Wan T., Zhang J.S., Fu X.P., Sun L.N., Dong X.P., Feng Z.J., Yang W.Z., Hong T., Zhang Y., Walker D.H., Wang Y., Li D.X. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(16):1523–32. DOI: 10.1056/nejmoa1010095.

16. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B., Chen X.P., Gao D.Y., He Y.W., Jin D., Sun Q., Guo W.P., Wang W., Yu B., Li J., Dai Y.A., Li W., Peng J.S., Zhang G.B., Zhang S., Chen X.M., Wang Y., Li M.H., Lu X., Ye C., de Jong M.D., Xu J. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China. *J. Virol.* 2012; 86(5):2864–8. DOI: 10.1128/jvi.06192-11.

17. Zhang Y.Z., He Y.W., Dai Y.A., Xiong Y., Zheng H., Zhou D.J., Li Y., Sun Q., Luo X.L., Chen Y.L., Qin X.C., Tian J.H., Chen X.P., Yu B., Jin D., Guo W.P., Li W., Wang W., Peng J.S., Zhang G.B., Zhang S., Chen X.M., Wang Y., Li M.H., Li Z., Lu S., Ye C., de Jong M.D., Xu J. Hemorrhagic fever caused by a novel Bunyavirus in China: pathogenesis and correlates of fatal outcome. *Clin. Inf. Dis.* 2012; 54:527–33. DOI: 10.1093/cid/cir804.

18. Zhao L., Zhai S., Wen H., Cui F., Chi Y., Wang L., Xue F., Wang Q., Wang Z., Zhang S., Song Y., Du J., Yu X. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, Shandong province, China, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(6):963–5. DOI: 10.3201/eid2001.120532.

Authors:

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Boyarskaya N.V., Borisevich S.V. The 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Об авторах:

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Боярская Н.В., Борисевич С.В. Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.

Поступила 09.02.16.

Ю.М.Евченко¹, О.Х.Шаяхметов¹, В.М.Дубянский¹, Т.В.Таран¹, Д.Г.Пономаренко¹, Д.А.Ковалев¹,
А.В.Власов², В.А.Белогрудов², Г.А.Мозлов², Г.М.Грижебовский¹, А.Н.Куличенко¹

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ НОСИТЕЛЕЙ В ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ

¹ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция», Нальчик, Российская Федерация

Цель работы. Изучение иммунологической структуры горных сусликов на разных участках природной очаговости в Центральном-Кавказском природном очаге чумы. **Материалы и методы.** Данные о результатах серологического исследования горных сусликов за 1974–1988, 2001–2004 гг. получены из ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция» Роспотребнадзора. С помощью Excel Microsoft Office 2010 проанализированы 63147 результатов исследований крови сусликов в РПГА и РНАг. Использованы статистические и математические методы. **Результаты и выводы.** Установлено, что наибольшие доли сусликов, имеющих в крови антитела в низких титрах, характеризующие первичный контакт с чумной инфекцией, формируются на пиках эпизоотической активности. В горной степи восточной части очага это июнь, в западной, а также альпийской и субальпийской зонах восточной части – август. Животные с антителами в высоких титрах, т.е. вторично инфицированные, в большом числе появляются на пиках летальности горных сусликов. В горной степи это наблюдается в июне, т.е. одновременно с пиком эпизоотической активности, в западной части – в июне, но максимальная активность эпизоотий имеет место в августе. В альпийской и субальпийской зонах восточной части очага пики эпизоотической активности и летальности сусликов совпадают и приходятся на август. Выделение культур чумного микроба при наличии положительных результатов серологических исследований достоверно чаще наблюдается в горной степи долины р. Баксан, чем на других участках природной очаговости.

Ключевые слова: природный очаг чумы, титры антител, эпизоотическая активность, горные суслики.

Корреспондирующий автор: Юрий Михайлович Евченко, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Yu.M.Evchenko¹, O.Kh.Shayakhmetov¹, V.M.Dubyansky¹, T.V.Taran¹, D.G.Ponomarenko¹,
D.A.Kovalev¹, A.V.Vlasov², V.A.Belogradov², G.A.Mozlov², G.M.Grizhebovsky¹, A.N.Kulichenko¹

Peculiarities of Immunological Structure Formation in Plague Carriers of the Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ²Kabardino-Balkaria Plague Control Station, Nalchik, Russian Federation

Objective of the study is to analyze immunological structure of the mountain souslik, habitant in various zones of natural focal-ity in the Central-Caucasian natural plague focus. **Materials and methods.** The data on serological investigations conducted on the mountain souslik, within the periods of 1974–1988 and 2001–2004 have been obtained from FGHI “Kabardino-Balkaria Plague Control Station” of the Rospotrebnadzor. Applying passive hemagglutination test and indirect hemagglutination test, with the help of Excel Microsoft Office 2010, evaluated have been 63147 blood survey results. **Conclusions.** It is established that the highest ratio of the souslik with low antibody titer in blood, which characterizes initial contact with plague infection, is observed at the peak of epizootic activity. In the mountain steppe of the eastern focal part, the apex coincides with June, in the western part, as well as in the Alpine and Subalpine zones of the eastern one – with August. Animals with high antibody titers, i.e. secondarily infected, emerge in vast numbers at the peak of mountain souslik lethality. In the mountain steppe this period falls upon June, i.e. simultaneously with the peak of epizootic activity. In the western part lethality apex is also observed in June, but maximum epizootic activity takes place in August. In Alpine and Subalpine zones of the eastern focal part, peaks of epizootic activity and lethality among the souslik populations concur and fall upon August. Isolation of plague microbe cultures alongside with positive serological tests is reasonably more often observed in the mountain steppe of the river Baksan, than in other areas of natural focal-ity.

Key words: natural plague focus, antibody titer, epizootic activity, the mountain souslik.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Yuriy M. Evchenko, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Evchenko Yu.M., Shayakhmetov O.Kh., Dubyansky V.M., Taran T.V., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Vlasov A.V., Belogradov V.A., Mozlov G.A., Grizhebovsky G.M., Kulichenko A.N. Peculiarities of Immunological Structure Formation in Plague Carriers of the Central-Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:27–31. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-27-31

Изучение иммунологической структуры носителей является важнейшей составляющей мониторинга природных очагов чумы. Использование серологических методов позволило более полно описать эпизо-

отический процесс, его пространственно-временные характеристики, тенденции развития эпизоотий, качество профилактических противочумных мероприятий. При анализе данных серологического исследования горных сусликов из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы возникают затруднения в их трактовке. Не всегда эпизоотии, подтвержденные выделением возбудителя чумы, сопровождаются каким-либо иммунным ответом со стороны задействованной популяции горных сусликов. Превышение титров антител в РНАг над РПГА редко совпадает с ростом активности эпизоотического процесса, а положительные результаты серологических реакций часто не совпадают с обнаружением возбудителя чумы. Данный очаг является неоднородным по структуре паразитарных систем и свойствам возбудителя чумы, циркулирующего на разных участках очага [4]. Выделены участки природной очаговости: горная степь долины р. Баксан в восточной части очага на территории Кабардино-Балкарской Республики и западная часть очага, расположенная в пределах Карачаево-Черкесской Республики. Первый участок функционирует как степные очаги сусликового типа с небольшими отличиями, влияющими на течение эпизоотического процесса (отсутствует период летней спячки). Второй участок является оригинальным по организации паразитарной системы: в составе основных переносчиков отсутствуют блохи *N. setosa*, а возбудитель отличается от основного подвида *Y. pestis* сниженной вирулентностью, наличием криптической плазмиды с молекулярной массой 6 МД, аутокотрофностью по пролину. Между этими территориями в Кабардино-Балкарской Республике располагается участок альпийских и субальпийских лугов восточной части очага, где эпизоотический процесс имеет сходство с обоими указанными участками. Как и в западной части, отсутствуют блохи *N. setosa*, но выделяются штаммы, характерные как для западной части очага, так и проникающие из горной степи долины р. Баксан [3].

Для уточнения особенностей антителогенеза представляет интерес провести ретроспективный анализ данных серологического исследования сусликов из разных частей очага с учетом фенологических периодов носителей и переносчиков. При этом возникает необходимость дифференцирования значений титров на низкие и высокие. Известно, что в степных очагах сусликового типа повторное инфицирование сопровождается появлением в крови животных высоких титров антител – от 1/1280 и выше. Для Центрально-Кавказского очага исследований по определению порога высоких и низких титров не проводилось. Также не исследовалось влияние эпизоотии на антителогенез у сусликов в эпизоотиях следующего года.

Целью данной работы было изучение иммунологической структуры горных сусликов на разных участках природной очаговости на Центральном Кавказе.

Материалы и методы

Данные о результатах серологического исследования горных сусликов за 1974–1988, 2001–2004 гг. получены из ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция» Роспотребнадзора. В таблицы Excel Microsoft Office 2010 введены: адреса проб полевого материала, количество исследованных горных сусликов, количество выделенных штаммов чумного микроба, титры антител в РПГА и РНАг для каждого исследованного животного. Анализировали данные из 1674 эпизоотических точек, 63147 результатов исследований сывороток крови горных сусликов, из которых 25 % были положительными в РПГА и/или РНАг. Активность эпизоотий оценивали по количеству выделенных штаммов чумного микроба. Доли популяции горных сусликов, давших положительные результаты при серологическом исследовании, определяли как процентное отношение к исследованным животным на конкретных территориях. Летальность определяли как процентное отношение трупов сусликов, погибших от чумной инфекции, к сумме трупов и живых сусликов, от которых выделены культуры чумного микроба на конкретных территориях. Для сопоставления групп животных по частоте встречаемости положительных результатов серологического исследования использовали критерий Фишера (ϕ) [5]. Определение границы (порога) между высокими и низкими титрами антител к чумному микробу в крови горных сусликов на разных участках очага проводили путем вычисления интегральной функции распределения вероятностных событий [1].

Результаты и обсуждение

Антителообразование у сусликов из разных участков изучали в зависимости от эпизоотологической ситуации текущего года. Сравнивались поселения, где были изолированы культуры возбудителя чумы (эпизоотические поселения) и поселения, в которых эпизоотии не подтверждены изоляцией штаммов чумы (неэпизоотические поселения) (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что положительные серологические результаты достоверно чаще отмечаются при исследовании горных сусликов из эпизоотических поселений горной степи долины р. Баксан, чем из западной части очага ($\phi_1^* = 6,46$). В неэпизоотических поселениях положительные находки антител у сусликов наблюдались с одинаковой частотой как в горной степи, так и западной части ($\phi_2^* = 1,521$).

В горной степи р. Баксана положительные серологические результаты регистрируются чаще при наличии выделенных штаммов чумного микроба, чем при их отсутствии ($\phi_3^* = 6,846$), а в западной части антитела у сусликов обнаруживаются с одинаковой частотой как в эпизоотических, так и в неэпизоотических поселениях.

Определенный интерес представляет наличие антител у сусликов в начале эпизоотического сезо-

Таблица 1

**Результаты серологического исследования сусликов из эпизоотических и неэпизоотических поселений
разных участков природной очаговости**

Участки Поселения	Результаты серологического исследования сусликов из разных участков природной очаговости				Статистическая значимость между горной степью и западной частью очага
	горная степь в долине р. Баксан		западная часть природного очага		
	+	-	+	-	
Эпизоотические	34 72,3 %	13 27,7 %	12 16,2 %	62 83,8 %	$\varphi^*_1 = 6,46$ различия достоверны
Неэпизоотические	31 18,9 %	133 81,1 %	12 12 %	88 88 %	$\varphi^*_2 = 1,521$ различия недостоверны
Статистическая значимость между эпизоотическими и неэпизоотическими поселениями сусликов	$\varphi^*_3 = 6,846$ различия достоверны		$\varphi^*_4 = 0,789$ различия недостоверны		

Примечания: «+» – положительные результаты; «-» – отрицательные результаты серологического исследования.

на. Существует мнение, что такие антитела являются следствием прошлогоднего заражения грызунов. Для изучения влияния прошлогодних эпизоотий на антителообразование в условиях Центрального Кавказа отобрали поселения сусликов, на которых в апреле текущего года обнаруживались суслики с антителами, а в предыдущем году на них регистрировались бактериологически подтвержденные эпизоотии чумы. Эти поселения разделены на две группы: первая представлена поселениями, на которых в текущем году выделены штаммы чумного микроба; вторая – где в текущем году не было бактериологического подтверждения эпизоотий. Всего отобрано 25 урочищ. Из них в первую группу вошло 21 поселение (21 – «Есть эффект»; 4 – «Нет эффекта»), во вторую – четыре поселения (4 – «Есть эффект»; 21 – «Нет эффекта»). Сравнение групп по критерию Фишера позволило установить статистически значимую разницу ($\Phi^* = 5,289$). Это позволяет заключить, что образование антител в крови у горных сусликов в начале эпизоотического сезона происходит большей частью в результате инфицирования животных в те-

кущем, а не в предыдущем году.

Для определения порогового значения высоких и низких титров рассмотрены статистические и интегральные (накопленные) частоты распределения титров антител (табл. 2).

Из сопоставления значений столбца «Статистическая частота (вероятность)», касающихся горной степи, видно, что величины с первой по шестую строку (титры от 1/20 до 1/640) возрастают с одним темпом и дают прирост функции «Интегральные (накопленные) частоты». Начиная с седьмой строки эти величины уменьшились на порядок, т.е. эта строка (титр 1/1280) является порогом (показатель экстремума). При этом в столбце «Интегральные (накопленные) частоты» строки с 7-й по 13-ю представляют собой эффект насыщения – они нарастают со значительно меньшим темпом, чем это было с 1-й по 7-ю строку. Для западной части так же, как и для восточной, таким порогом является шестая строка (титр 1/640). Иными словами, низкие титры – это те, которые находятся в периоде интенсивного роста. После порогового значения к вероятности значений низких

Таблица 2

Распределение титров антител по вероятности их встречаемости у сусликов из разных участков природной очаговости

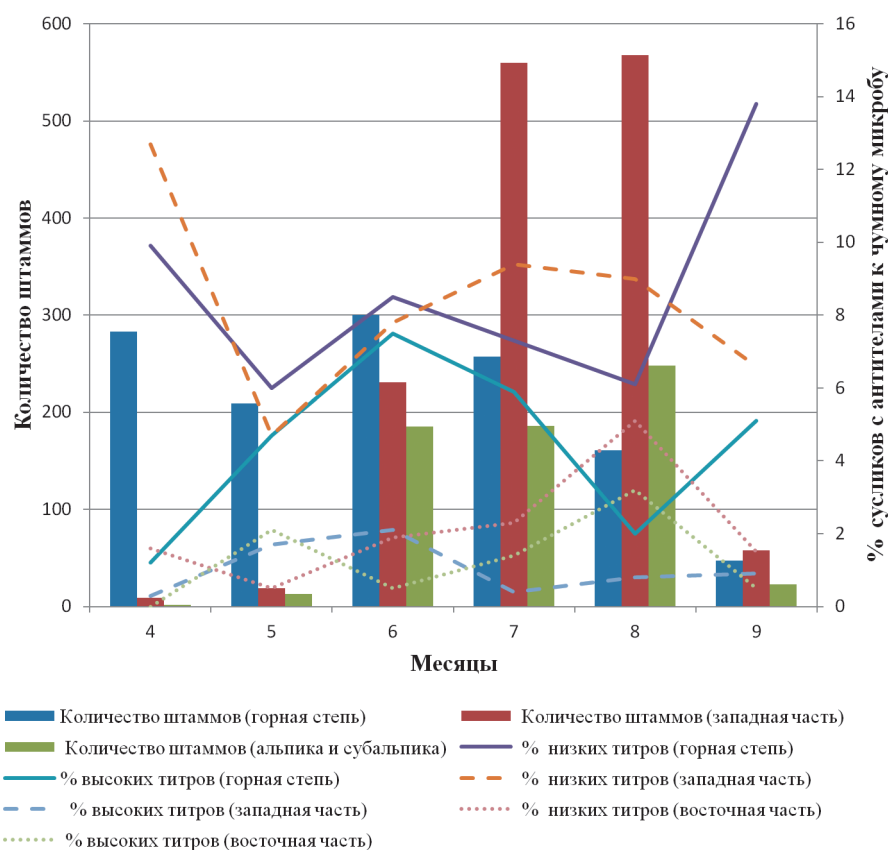
N n/p	Титры антител	Статистическая частота (вероятность)			Интегральные (накопленные) частоты		
		горная степь	западная часть	восточная часть	горная степь	западная часть	восточная часть
1	1/20	0,04	0,012	0,070	0,038	0,011	0,070
2	1/40	0,11	0,11	0,137	0,15	0,125	0,206
3	1/80	0,14	0,19	0,180	0,288	0,322	0,386
4	1/160	0,11	0,24	0,099	0,403	0,563	0,485
5	1/320	0,12	0,24	0,110	0,525	0,808	0,595
6	1/640	0,12	0,07	0,102	0,642	0,877	0,697
7	1/1280	0,08	0,06	0,054	0,723	0,941	0,751
8	1/2560	0,06	0,02	0,054	0,789	0,970	0,804
9	1/5120	0,08	0,002	0,051	0,873	0,973	0,855
10	1/10240	0,06	0,008	0,078	0,940	0,982	0,933
11	1/20480	0,04	0,005	0,059	0,989	0,988	0,992
12	1/40560	0,008	0,011	0,003	0,998	1	0,995
13	1/81120	0,001	нет	0,005	1	нет	1

титров, которые образовывались в крови сусликов при первичном инфицировании, добавляется вероятность второго, более высокого значения титров. Высокие титры формировались уже в других условиях – при повторной встрече сусликов с возбудителем чумы. Порогом между низкими и высокими титрами является значение 1/1280 для сусликов горной степи и 1/640 для сусликов западной и восточной частей очага. В горной степи значения низких титров составляют от 1/20 до 1/640, в западной и восточных – от 1/20 до 1/320. Высокие титры у сусликов горной степи представлены значениями 1/1280 и выше, в западной и восточных частях – 1/640 и выше.

С учетом полученных результатов построены диаграммы, характеризующие динамику антителообразования и активность эпизоотического процесса на разных участках очага (рисунок).

Поскольку эпизоотологическое обследование начинается в апреле, на диаграммах отсутствует месяц март, в котором регистрируется высокая миграционная активность горных сусликов в связи с просыпанием после зимней спячки, гоним и расселением, и, соответственно, начинаются весенние эпизоотии. В апреле, как следует из рисунка, наблюдается весенний пик эпизоотий в горной степи долины р. Баксан и единичные эпизоотические проявления в западной и восточных частях очага. Антитела в низких титрах образуются у сусликов впервые инфицированных (первичный иммунный ответ). Высокие титры есть результат повторного заражения животных, имевших контакт с возбудителем чумы в прошлом году и обладающих иммунологической памятью (вторичный им-

мунный ответ). Доли животных с низкими титрами в апреле имеют высокие значения, но к маю снижаются в связи с уменьшением миграционной активности сусликов из-за массовой беременности и лактации. Затем начинается рост количества животных с низкими титрами антител в горной степи долины р. Баксан до июня, а в западной части, а также субальпийских и альпийских лугах восточной части очага – до августа. В указанные месяцы на соответствующих участках отмечаются пики эпизоотической активности, т.е. выделяется наибольшее число штаммов чумного микроба. Доли сусликов с высокими титрами антител, указывающими на повторный контакт с возбудителем чумы, в горной степи долины р. Баксан и западной части растут до июня, в восточной – до августа. В эти месяцы на данных участках отмечаются наивысшие показатели летальности горных сусликов, при этом регистрируется значительное число зараженных чумой блох, лишившихся прокормителей. Эти эктопаразиты, находясь в поиске прокормителя, значительно активизируют трансмиссивную передачу возбудителя чумы. В горной степи этот процесс наблюдается в июне, провоцируя максимальную активность эпизоотий. В восточной части наибольшие показатели летальности отмечаются в августе. Здесь также имеет место совпадение пиков активности эпизоотий и летальности. В западной части очага пик летальности отмечается в июне, и в этот же месяц регистрируются самые большие проценты сусликов с высокими титрами, но пик активности эпизоотий приурочен к августу. Этим объясняется асинхронность пиков долей животных с низкими и высокими



Динамика антителообразования и активность эпизоотического процесса у сусликов из горной степи долины р. Баксан, западной и восточной частей очага

титрами на данной территории.

Окончание эпизоотического сезона проходит с участием преимущественно молодых сусликов. Посещение нор сусликами на освободившихся участках приводит к активизации трансмиссивного пути передачи чумной инфекции. В результате в горной степи долины р. Баксан отмечается резкое повышение доли зверьков с антителами в низких титрах, что вновь указывает на первичное инфицирование значительной части популяции сеголеток, уходящих в зимнюю спячку. Подобного повышения доли сусликов с низкими титрами антител в конце эпизоотического сезона не наблюдается в других частях очага. Это явление находит свое объяснение при рассмотрении фенологических периодов основных переносчиков возбудителя чумы – *C. t. ciscaucasicus* и *N. s. setosa*. Так, в горной степи долины р. Баксан трансмиссивную передачу обеспечивают имаго *N. s. setosa*, вышедшие из коконов летом и инфицированные возбудителем чумы. Они в сентябре находятся в состоянии гонотрофической активности и присутствуют в большом количестве. Что касается западной и восточной частей очага, то здесь в это время трансмиссию чумного микроба осуществляют имаго *C. t. ciscaucasicus* летней генерации [2]. В состоянии гонотрофической активности этих блох остается небольшое количество и поэтому трансмиссивная передача возбудителя чумы снижена в сравнении с другими периодами эпизоотического сезона.

Таким образом, в результате ретроспективного анализа данных серологического исследования удалось установить особенности антителообразования у горных сусликов из разных частей очага при едином механизме формирования иммунной прослойки в поселениях основного носителя чумы. Наибольшие доли сусликов с низкими титрами антител, характеризующие первичный контакт с чумной инфекцией, формируются на пиках эпизоотической активности. В горной степи это июнь, западной и восточных частях – август. Животные с высокими титрами антител, т.е. вторично инфицированные, в большом числе появляются на пиках летальности. В горной степи это наблюдается в июне, т.е. одновременно с пиком эпизоотической активности. В западной части также в июне, но это раньше, чем активность эпизоотий достигает наивысших показателей. В восточной части очага пики эпизоотической активности и летальности горных сусликов совпадают и приходятся на август.

В заключение следует обратить внимание на тот факт, что в западной части очага весной при наличии положительных серологических результатов выделяется несоизмеримо малое число штаммов чумного микроба. Для горной степи долины р. Баксан соот-

ношение выделенных штаммов чумного микроба и долей серопозитивных сусликов в этот период примерно одинаковое. Поэтому при получении весной положительных результатов серологического исследования в западной части очага наиболее вероятно подтвердить течение эпизоотии бактериологическими находками в июле–августе. В эти месяцы следует организовать повторное эпизоотологическое обследование поселений горного суслика.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аскеров П.Ф., Пахунова Р.Н., Пахунов А.В. Общая и прикладная статистика. М.: НИЦ ИНФРА; 2013. 272 с.
2. Белявцева Л.И., Чумакова И.В. Актуальные вопросы мониторинга эколого-эпизоотологического состояния популяций блох сусликов в природных очагах чумы Северного Кавказа. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2011; 1–2(23–24):50–5.
3. Евченко Ю.М., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Мезенцев В.М., Белявцева Л.И., Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов *Yersinia pestis* из Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:51–5.
4. Евченко Ю.М., Куличенко А.Н., Мозлов Г.А., Мезенцев В.М. Особенности пространственной структуры Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:13–4.
5. Сидоренко Е.В. Методы математической обработки в психологии. СПб: Речь; 2007. 220 с.

References

1. Askerov P.F., Pakhunova R.N., Pakhunov A.V. [General and Applied Statistics]. M.: Research Publishing Center INFRA; 2013. 272 p.
2. Belyavtseva L.I., Chumakova I.V. [Topical issues of monitoring over ecological-epizootiological state of souslik flea populations in natural plague foci of the North Caucasus]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2011; 1–2(23–24):50–5.
3. Evchenko Yu.M., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Mezentsev V.M., Belyavtseva L.I., Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Kulichenko A.N. [Studies of genetic diversity of *Yersinia pestis* strains isolated in Central-Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:51–5.
4. Evchenko Yu.M., Kulichenko A.N., Mozlov G.A., Mezentsev V.M. [Peculiarities of spatial structure of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 3:13–4.
5. Sidorenko E.V. [Methods of Mathematical Treatment in Psychology]. St. Petersburg: "Rech"; 2007. 220 p.

Authors:

Evchenko Yu.M., Shayakhmetov O.Kh., Dubyansky V.M., Taran T.V., Ponomarenko D.G., Kovalev D.A., Grizhebovsky G.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Vlasov A.V., Belogradov V.A., Mozlov G.A. Kabardino-Balkarian Plague Control Station. 35, Baysutanova St., Nalchik, 360017, Russian Federation. E-mail: kbpchs07@mail.ru.

Об авторах:

Евченко Ю.М., Шаяхметов О.Х., Дубянский В.М., Таран Т.В., Пономаренко Д.Г., Ковалев Д.А., Грижебовский Г.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Власов А.В., Белогрудов В.А., Мозлов Г.А. Кабардино-Балкарская противочумная станция. Российская Федерация, 360017, Нальчик, ул. Байсултанова, 35. E-mail: kbpchs07@mail.ru.

Поступила 10.11.15.

Г.А.Ерошенко, Е.И.Кошель, А.М.Поршаков, Т.В.Князева, Я.М.Краснов, Т.В.Мокроусова,
Л.А.Новичкова, Л.В.Анисимова

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТОМОПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД БЛОХ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ

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

Энтомопаразитические нематоды являются естественными регуляторами численности блох – переносчиков чумы в природных очагах чумы и оказывают влияние на интенсивность эпизоотического процесса, протекающего в этих очагах. **Цель исследования.** Изучение энтомопаразитических нематод из блох сусликов и полевок, собранных на территории Поволжского региона. **Материалы и методы.** Представлены результаты морфологического и генетического анализа энтомопаразитических нематод – паразитов блох *Citellophilus tesquorum*, *Amphipsylla rossica* и *Ctenophthalmus secundus*, собранных соответственно с малого суслика *Spermophilus pygmaeus* и общественной полевки *Microtus socialis*. **Результаты и выводы.** Установлена идентичность морфологии паразитических самок нематод из всех трех видов блох и высокая степень сходства с ранее описанным видом *Rubzovinema ceratophylla*, паразитирующем в блохе *C. tesquorum*. На основании морфологического сходства и высокого процента гомологии нуклеотидных последовательностей генов рРНК (99,3–100 %) доказана принадлежность выделенных паразитических нематод из блох *C. tesquorum*, *A. rossica* и *C. secundus* к одному виду, обозначенному как *Rubzovinema sp.* и отличающемуся от ранее описанного моноксенного вида *R. ceratophylla* отсутствием строгой гостальной специфичности.

Ключевые слова: энтомопаразитические нематоды блох мелких грызунов, эпизоотический процесс в очагах чумы, филогенетический анализ нематод.

Корреспондирующий автор: Ерошенко Галина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

G.A.Eroshenko, E.I.Koshel', A.M.Porshakov, T.V.Knyazeva, Ya.M.Krasnov, T.V.Mokrousova, L.A.Novichkova,
L.V.Anisimova

Characteristics of Entomoparasitic Nematodes of Small Rodent Fleas

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

Entomoparasitic nematodes are the natural regulators of numbers of fleas – plague vectors in natural plague foci. They have an impact on the intensity of epizootic process, progressing in these foci. **Objective** of the study is to examine entomoparasitic nematodes from fleas of the souslik and vole, collected in the territory of Povolzhsky Region. **Materials and methods.** Presented are the results of morphological and genetic analysis of entomoparasitic nematodes, flea parasites – *Citellophilus tesquorum*, *Amphipsylla rossica* and *Ctenophthalmus secundus*, collected from the small ground squirrel *Spermophilus pygmaeus* and social vole *Microtus socialis*, respectively. **Results and conclusions.** Established has been morphological identity of nematode parasitic females isolated from all the three species of fleas, and a high degree of similarity to the previously described *Rubzovinema ceratophylla*, parasitizing on *C. tesquorum* fleas. Substantiated has been the belonging of parasitic nematodes isolated from fleas *C. tesquorum*, *A. rossica* and *C. secundus*, to one and the same species, specified as *Rubzovinema sp.*, based on the high percentage of the homology of the nucleotide sequences of rRNA genes (99.3–100 %). This species differs from the previously described monoxenous *R. ceratophylla* in absence of strict host specificity.

Keywords: entomoparasitic nematodes of small rodent fleas, epizootic process in plague foci, phylogenetic analysis of nematodes.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Galina A. Eroshenko, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Porshakov A.M., Knyazeva T.V., Krasnov Ya.M., Mokrousova T.V., Novichkova L.A., Anisimova L.V. Characteristics of Entomoparasitic Nematodes of Small Rodent Fleas. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:32–37. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-32-37

Ранее считалось, что основным механизмом передачи возбудителя чумы *Yersinia pestis* и поддержания эпизоотической активности природных очагов чумы является трансмиссия возбудителя по схеме: грызун–блоха–грызун. Предполагалось, что в межэпизоотические периоды возбудитель чумы сохраняется на ограниченных участках очага, циркулируя на частично резистентных грызунах и их блохах [4]. Однако четких доказательств этой гипотезы до сих пор не получено. Взрывной характер начала эпизоотий, наблюдаемый на значительных территориях природного очага, предполагает наличие другого, более эффективного

механизма сохранения и распространения *Y. pestis*, связанного с существованием возбудителя в ассоциации с членами почвенных биоценозов – простейшими и беспозвоночными [5, 7]. Массовыми членами этих биоценозов являются нематоды, в отношении которых показана возможность их участия в переносе культур *Y. pestis* в полостях тела и на его поверхности [1, 10]. Это обеспечивается наличием специальных рецепторов в поверхностных слоях кутикулы нематод, к которым идет специфическое прикрепление экзополисахарида – основного компонента биопленки *Y. pestis* [10]. Высказано мнение о том, что кроме свободножи-

вущих почвенных нематод, в распространении возбудителя чумы могут принимать участие энтомопаразитические нематоды – паразиты блох [5, 7]. Нематоды, паразитирующие в блохах, являются представителями отряда Tylenchida, включающего подотряд Hexatylna, куда входят все описанные виды паразитов блох [8, 9, 12, 14, 15].

Энтомопаразитические тиленхиды способны на личиночной стадии осуществлять заражение личинок блох, что теоретически может приводить к трансларальному переносу культур возбудителя чумы и последующему формированию биопленок *Y. pestis* в блохах [2, 6]. Высокий процент инвазии нематодами может существенным образом влиять на численность популяции блох. Заражение насекомых нематодами вызывает кастрацию и гибель имаго, что приводит к снижению численности блох в популяции. Зараженность нематодами у некоторых видов блох может достигать 35 % [8]. Таким образом, очевидно, что присутствие нематод – паразитов блох в экосистемах очагов чумы – может оказывать существенное влияние на интенсивность эпизоотического процесса в этих очагах.

Несмотря на все эти факты, представители отряда Tylenchida, паразитирующие в блохах, до сих пор остаются малоисследованной группой нематод. Систематическое положение описанных видов до сих пор является спорным и требует доработок [3, 8, 9, 14, 15]. В то же время без исследования особенностей видового состава и экологии паразитических нематод невозможно изучение их роли в жизни биocenozов природных очагов чумы.

В статье представлены результаты исследования энтомопаразитических нематод из блох сусликов и полевых, собранных на территории Поволжского региона. Описаны морфологические особенности обнаруженных нематод, а также определены нуклеотидные последовательности их генов биосинтеза рРНК. На основе полученных данных определено таксономическое положение выделенных нематод и проведен их филогенетический анализ.

Материалы и методы

Материал для исследований собран на территории Александрово-Гайского района Саратовской области. Блохи вида *Citellophilus tesquorum* сняты с малого суслика *Spermophilus pygmaeus*, а блохи видов *Amphipsylla rossica* и *Ctenophthalmus secundus* – с

общественной полевки *Microtus socialis*. Просмотр и вскрытие блох осуществляли под контролем бинокулярной лупы МБС-10 (ЛОМО, Россия). Часть паразитических нематод, извлеченных из каждого образца, помещали в сосуд с 0,9 % хлоридом натрия для последующего выделения ДНК и генетического анализа, а вторую часть использовали для морфологического анализа.

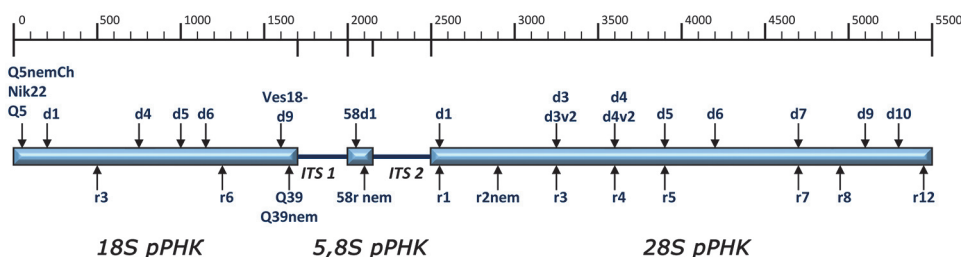
Изготовление препаратов нематод, включающее обезжизнение материала и фиксацию его на предметном стекле, проводили по общепринятым методикам [11]. Морфометрические исследования выполняли при помощи микроскопа «DM 1000» фирмы «Leica» с окуляром-линейкой. Фотографии нематод получали при помощи камеры «DFC 425» микроскопа фирмы «Leica».

ДНК нематод для генетических исследований получали стандартным методом при помощи набора для выделения ДНК из биологического материала «Diatom DNA Prep» (IsoGen Lab, Moscow) в соответствии с инструкцией производителя. При постановке ПЦР были использованы праймеры на последовательности структурных генов 18S, 5,8S и 28S рРНК и на спейсерные участки (internal transcribed spacers) ITS2 и ITS1. Локализация праймеров на схеме строения рибосомного оперона нематод приведена на рис. 1. Секвенирование полученных с их помощью в ПЦР фрагментов генов рРНК проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500xL». Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программ DNA Baser, BioNumerics 7.1 (Applied Maths, Belgium) и MEGA5,0 [13].

Филогенетический анализ проводили на основе последовательностей гена 18S различных нематод из базы данных NCBI GenBank. Для построения дендрограммы применяли программу BioNumerics 7.1 с использованием статистического метода Maximum Likelihood на базе эволюционной модели Hasegawa-Kishino-Yano.

Результаты и обсуждение

В работе проведено изучение энтомопаразитических нематод, выделенных от блох малого суслика *C. tesquorum* и блох общественной полевки *A. rossica* и *C. secundus*. Всего исследовано 192 блохи, средняя зараженность которых составила 8,9 % (17 зараженных экземпляров). Подвидовая зараженность была различной, и среди блох вида *C. tesquorum* она соста-



вила 17,1, *A. rossica* – 6,8 и *C. secundus* – 1,1 %.

Как показали результаты вскрытия зараженных блох, в каждой из них, независимо от видовой принадлежности, содержалось по 1–4 крупных паразитических самок и большое количество личинок, которое иногда достигало нескольких сотен. В целом количество личинок зависело от возраста блохи и паразитической самки, а также от числа проникнувших в личинку блохи паразитических самок. Независимо от возраста насекомого, который определялся по внешним морфологическим признакам, в их полости наблюдался только один тип половозрелых особей – паразитические инвазивные самки, а также их личинки. Это наблюдение дает основание предположить, что жизненный цикл изученных паразитических нематод включает только одну генерацию в полости тела насекомого и одну или несколько генераций в окружающей среде, как это было показано ранее для некоторых других видов нематод, паразитирующих в блохах [3, 9, 15]. При микроскопическом исследовании нематоды, выделенные из блох *A. rossica* и *C. secundus*, *C. tesquorum*, обладали сходными морфологическими признаками, что свидетельствовало об их принадлежности к одному виду.

Все изученные паразитические самки имели толстое червеобразное тело, длина которого составляла в среднем 1318 мкм, а диаметр – 120,6 мкм. Кутикула имела бледно-желтый оттенок. Поверхность тела покрыта поперечными складками. Стиллет состоял из двух частей и включал слабо склеротизированное основание с небольшим базальным утолщением и сильно склеротизированное дистальное узкое копьё, также состоявшее из двух частей. Полная длина стилета составляла в среднем 17,5 мкм. Экскреторная пора открывалась на вентральную поверхность тела. Расстояние от головного конца до экскреторной поры в среднем равнялось 20,9 мкм. Пищевод овальный короткий с узким просветом длиной около 29 мкм. Дорзальная железа впадала в просвет пищевода на расстоянии 4–7 мкм от основания стилета, а субвентральные железы впадали в просвет на расстоянии 15–21 мкм от основания стилета. Хвост достаточно короткий – в среднем 22,9 мкм, конический, иногда с небольшим шипиком на конце. Половая трубка образовывала несколько изгибов в передней части тела самки. Мешковидная матка была заполнена множеством яиц и личинок. Стенки вагины тонкие, губы вульвы слабовыпуклые. Самки яйцеживородящие. Общий вид энтомопаразитической самки изображен на рис. 2.

К настоящему моменту в литературе отсутствуют данные о систематической принадлежности нематод, паразитирующих в блохах вида *A. rossica*, и сведения о зараженных нематодами блохах *C. secundus*. Для нематод, паразитирующих в блохах *C. tesquorum*, известен лишь один вид – *Rubzovinema ceratophylla*, описанный в 1991 г. О.В.Слободянюк [9]. При проведении сравнения выделенных нематод из блох *A. rossica*, *C. secundus* и *C. tesquorum* с видом *R. cer-*

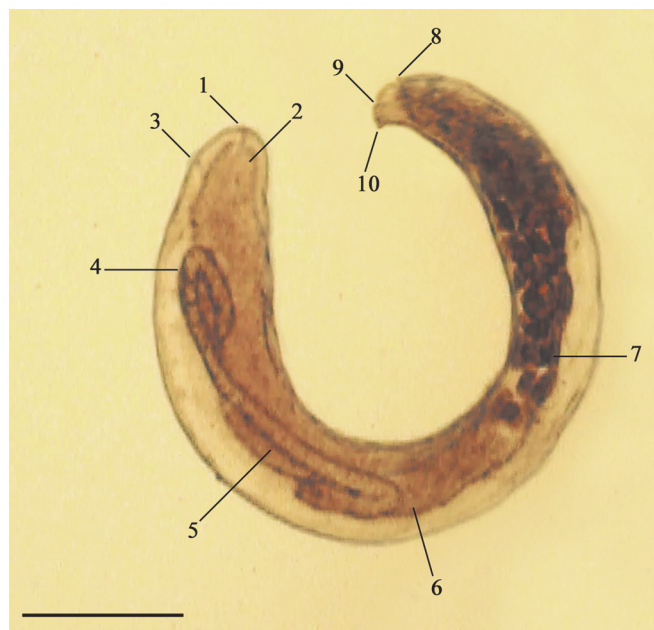


Рис. 2. Общий вид молодой паразитической самки нематоды *Rubzovinema* sp.:

1 – стилет; 2 – пищевод; 3 – экскреторная пора; 4 – яичник; 5 – яйцевод; 6 – сперматека; 7 – матка, заполненная яйцами; 8 – вульва; 9 – анус; 10 – шипик. Маркер соответствует 200 мкм

atophylla нами выявлено большое сходство между ними по комплексу признаков. В частности, жизненный цикл выделенных нематод, как и нематод вида *R. ceratophylla*, предполагает наличие одной генерации в полости тела насекомого и, вероятно, несколько генераций в окружающей среде. Морфологические признаки паразитических самок также во многом соответствуют описанию паразитической самки *R. ceratophylla*. К числу общих признаков относятся: форма, длина и диаметр тела, особенности строения и размер стилета, форма пищевода, расположение экскреторной поры и устьев пищеварительных желез, форма и размер половой трубки, а также некоторые другие характеристики.

На основании полученных данных можно высказать предположение о том, что выделенные нами энтомопаразитические нематоды из блох *A. rossica*, *C. secundus* и *C. tesquorum* близки к виду *R. ceratophylla* [9].

Для определения систематической принадлежности выделенных паразитических нематод нами проведено секвенирование их генов 18S, 5,8S и 28S рДНК и спейсерных областей ITS1 и ITS2, входящих в рибосомный оперон. Для этих целей использовали праймеры на различные участки их генов рДНК (рис. 1). После секвенирования генов и спейсеров оперона, а также их объединения общая длина полученных последовательностей для нематод из блох *C. tesquorum* составила 5588 п.н.; *A. rossica* – 5602 п.н., *C. secundus* – 5600 п.н. При сравнительном анализе секвенированных последовательностей генов рДНК нематод из блох *A. rossica* и *C. secundus* установлена их полная идентичность, что, наряду с высокой степенью сходства морфометрических

характеристик, однозначно свидетельствует об их принадлежности к одному виду энтомопаразитических нематод. Дальнейшее сравнение последовательностей нематод из блох *A. rossica*, *C. secundus* с нематодами из *C. tesquorum* также выявило очень высокий процент гомологии их нуклеотидных последовательностей генов рДНК, который составил 99,3 %. Этот факт также однозначно свидетельствует о принадлежности паразитических нематод из блох *C. tesquorum* к тому же виду. Небольшой процент различия (0,7 %) соответствует показателю внутри- и межпопуляционной изменчивости организмов в пределах одного вида.

Таким образом, из полученных данных морфологического и генетического анализа можно сделать обоснованное заключение о принадлежности изученных паразитических нематод, изолированных из блох *C. tesquorum*, *A. rossica* и *C. secundus*, к одному виду. С учетом высокого морфологического сходства исследуемый нами вид близок виду *R. ceratophylla*, ранее выделенному из блох *C. tesquorum*. По мнению О.В.Слободянюк, этот вид обладает строгой гостальной специфичностью и встречается только в блохах вида *C. tesquorum*, паразитирующих на малом суслике [9]. Исследуемый нами вид был выделен из блох трех видов, паразитирующих на разных животных, и обозначен нами как *Rubzovinema sp.*, отличительной чертой которого является отсутствие строгой гостальной специфичности.

Для установления систематического положения выделенного вида нематод нами проведен сравнительный анализ последовательностей его генов рДНК с другими видами нематод, представленными в базе данных NCBI GenBank с помощью алгоритма BLAST. Однако идентичные последовательности генов рибосомного оперона в базе данных не обнаружены, что еще раз доказывает недостаточную изученность нематод, паразитирующих в блохах, и отсутствие данных по их генетической характеристике. Генетическая характеристика вида *R. ceratophylla* отсутствует, что не позволило нам определить процент гомологии нуклеотидных последовательностей его генов рДНК и генов *Rubzovinema sp.* Поэтому видовую принадлежность исследуемого вида не удалось установить (из-за недостаточности представленных в NCBI GenBank данных), однако наиболее близкими видами оказались *Deladenus siricidicola* (96 %), *Howardula sp.* (95 %), *Fergusobia sp.* (95 %) и *Bradynema listronoti* (95 %). Все эти виды являются представителями нематод, паразитирующих в насекомых, и относятся к одному общему надсемейству Sphaerularioidea, входящему в отряд паразитических нематод Tylenchida.

Для пополнения базы данных NCBI GenBank нами депонированы в ней последовательности рибосомного оперона нематод *Rubzovinema sp.*, выделенных от *C. tesquorum*, *A. rossica* и *C. secundus* под инвентарными номерами доступа KF155281, KF155282 и KF155283 соответственно. Для общей картины

филогенетических связей выделенного вида нематод *Rubzovinema sp.* использована база последовательностей гена 18S рДНК различных нематод, включенных в NCBI GenBank. Использование для анализа только гена 18S обусловлено нехваткой данных в базе по полным оперонам рДНК нематод в отличие от широко представленных последовательностей гена малой субъединицы. Всего в анализе использовано 35 последовательностей разных видов нематод класса Chromadorea. Из них 7 видов относятся к отряду Rhabditida, 2 – к отряду Aphelenchida и 26 – к отряду Tylenchida (рис. 3). Длина используемого в анализе участка гена 18S в среднем составила 1498 нуклеотидов для этих видов.

Из анализа топологии полученного филогенетического дерева видно, что кластеризация по основным крупным ветвям видов нематод соответствует систематике M.R.Siddiqi [15]. В корне дерева находится кластер, образованный видами отряда Rhabditida, нематоды которых питаются бактериями и преимущественно являются свободноживущими формами. В основании кроны дерева располагаются виды промежуточной между рабдитидами и тиленхидами группы Aphelenchida, которые питаются в основном грибами. Основную же часть кроны дерева образуют многочисленные виды отряда Tylenchida, разнообразные по типу питания и образу жизни. Отдельным большим кластером располагаются виды подотрядов Criconematina и Hoplolamina, являющиеся облигатными паразитами растений. Верхнюю крупную кладу образуют виды подотряда Hexatylinea, все представители которого являются паразитами насекомых. Исследуемые нами изоляты *Rubzovinema sp.* также вошли в эту ветвь, образуя общий кластер с видами надсемейства Sphaerularioidea (рис. 3). Виды этого надсемейства характеризуются наличием только одного типа энтомопаразитической генерации в насекомом и присутствием в цикле частично свободноживущих личинок.

В полученной нами дендрограмме ясно определяется место нематод, паразитирующих в блохах, в общей схеме их эволюции. Эти паразиты составляют общую кладу с другими энтомопаразитическими нематодами подотряда Hexatylinea, наиболее близкими из них оказались виды надсемейства Sphaerularioidea.

Исходя из результатов морфологического и генетического анализа выделенных нематод, мы можем сделать обоснованное заключение о том, что в блохах *C. tesquorum*, *A. rossica* и *C. secundus* паразитируют нематоды одного вида. Предположительно, это вид, близкий к *R. ceratophylla*, но обладающий более широким спектром хозяев, обозначенный нами как *Rubzovinema sp.* Полученные результаты дают основания усомниться в наличии строгой гостальной специфичности нематод, паразитирующих в блохах. Это мнение было сформировано ранее исключительно на основе морфологических данных, которые, зачастую, были неполными и неоднозначными. Однако анализ генетических характеристик этих видов мо-

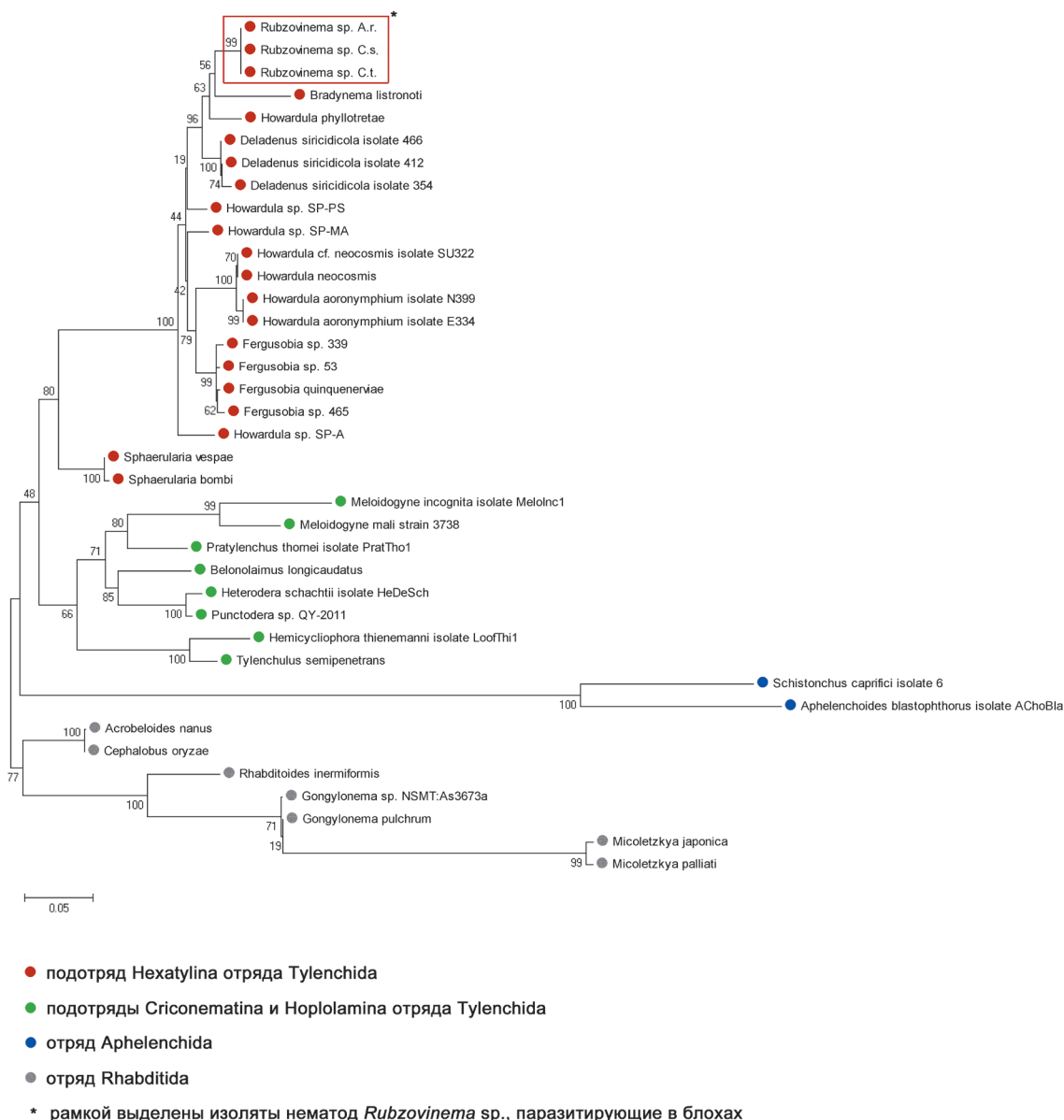


Рис. 3. Филогенетическое положение вида *Rubzovinema* sp. в 18S рДНК дендрограмме различных видов нематод, построенной в программе BioNumerics 7.0 (Applied Maths, Belgium) с применением алгоритма Maximum Likelihood на модели НКУ

жет в корне изменить представление о систематике нематод – паразитов блох. Наличие полигостальности у выделенного вида энтомопаразитических нематод – паразитов блох мелких грызунов – повышает его значимость как потенциального регулятора численности блох в природных очагах чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Формирование биопленок штаммами *Yersinia pseudotuberculosis* основного и неосновных подвидов *Yersinia pestis* на модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 1(99):31–4.
2. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 4:6–13.

3. Литвинова Е.А. Описание новой нематоды рода *Spilotylenchus* (Nematoda, Tylenchida), паразита блохи *Neopsylla bidentatiformis* (Insecta, Siphonaptera). *Зоол. журн.* 1995; 74:39–43.
4. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.–Л.: 1964. 212 с.
5. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Аникин В.В., Яковлев С.А., Караваева Т.Б. К роли нематод [*Secernentea*, *Rhabdidae*] – паразитов блох в энзоотии чумы. *Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье.* 2006; 5:88–93.
6. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Коннов Н.П., Караваева Т.Б., Храмов В.Н. Оценка роли биопленок *Yersinia pestis* в механизме энзоотии чумы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 4:118–20.
7. Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизмах энзоотии чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):5–8.
8. Рубцов И.А. Паразиты и враги блох. Л.: Наука; 1981. 99 с.
9. Слободянюк О.В. Обоснование рода *Rubzovinema* gen.n. (Sphaerularioidea) и переопределение *Rubzovinema ceratophylla* comb.n. паразита блохи *Citellophilus tesquorum*. *Зоол. журн.* 1991; 70(9):33–43.
10. Darby C., Chakraborti A., Politz S.M., Daniels C.C., Li Tan, Drace K. *Caenorhabditis elegans* Mutants Resistant to Attachment

of *Yersinia* Biofilms. *Genetica*. 2007; 176:221–30. DOI: 10.1534/genetics.106.067496.

11. De Grisse A. Redescriptions ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasites. *Meded. Rijksfak. Landb. Wet. Gent*. 1969; 34:351–69.

12. Launay H., Deunff J. *Spilotylenchus maisonabei* n. sp. (Nematoda, Allantonematidae) parasite de *Spilopsyllus cuniculi* (Dale, 1878) (Siphonaptera: Pulicidae), puce oïxène du lapin de garenne. *Revue de Nématologie*. 1990; 13(3):293–6.

13. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press; 2000.

14. Siddiqi M.R. Tylenchida: Parasites of Plants and Insects, 2nd ed., CABI Publishing, Wallingford UK; 2000, 852 p.

15. Slobodyanyuk O.V. Revision of species *Psyllotylenchus pawlowskyi* (Kurochkin, 1960) Poinar & Nelson, 1973. II. Description of *Kurochkintylenchus laevicepsi* gen. n., sp. n. and *Spilotylenchinae* fam. n. *Rus. J. Nematol.* 1999; 7(1):1–18.

References

1. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kuznetsov O.S., Kuttyrev V.V. [Biofilm formation in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the model of *Caenorhabditis elegans*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 1:31–4.

2. Kuttyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of plague agent interaction with invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 4:6–13.

3. Litvinova E.A. [Description of a new nematode, *Spilotylenchus* gender (Nematoda, Tylenchida) – the parasite of *Neopsylla bidentatiformis* flea (Insecta, Siphonaptera)]. *Zool. Zh.* 1995; 74:39–43.

4. Pavlovsky E.N. [Natural Focality of Vector-Borne Diseases in Connection with Landscape Epidemiology of Anthrozooses]. M.-L.; 1964. 212 p.

5. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Anikin V.V., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B. [Concerning the role of nematodes [Secernentae, Rhabdidae] – flea parasites – in plague enzooty]. *Entomol. Parazitol. Issledovaniya v Povolzh'e*. 2006; 5:88–93.

6. Popov N.V., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Konnov N.P., Karavaeva T.B., Khramov V.N. [Assessment of the role of *Yersinia pestis* biofilms in plague enzooty mechanism]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 4:118–20.

7. Popov N.V., Koshel E.I., Eroshenko G.A., Kuttyrev V.V. [Formation of modern concepts on the mechanism of plague enzooty]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3:5–8.

8. Rubtsov I.A. [Flea parasites and enemies]. L.: Nauka; 1981. 99 p.

9. Slobodyanyuk O.V. [Substantiation of *Rubzovinema* gen. n. (Sphaerularioidae) and re-characterization of *Rubzovinema ceratophylla* comb. n. – parasite of the flea *Citellophilus tesquorum*]. *Zool. Zh.* 1991; 70(9):33–43.

10. Darby C., Chakraborti A., Politz S.M., Daniels C.C., Li Tan, Drace K. *Caenorhabditis elegans* Mutants Resistant to Attachment of *Yersinia* Biofilms. *Genetica*. 2007; 176:221–30. DOI: 10.1534/genetics.106.067496.

11. De Grisse A. Redescriptions ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasites. *Meded. Rijksfak. Landb. Wet. Gent*. 1969; 34:351–69.

12. Launay H., Deunff J. *Spilotylenchus maisonabei* n. sp. (Nematoda, Allantonematidae) parasite de *Spilopsyllus cuniculi* (Dale, 1878) (Siphonaptera: Pulicidae), puce oïxène du lapin de garenne. *Revue de Nématologie*. 1990; 13(3):293–6.

13. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press; 2000.

14. Siddiqi M.R. Tylenchida: Parasites of Plants and Insects, 2nd ed., CABI Publishing, Wallingford UK; 2000, 852 p.

15. Slobodyanyuk O.V. Revision of species *Psyllotylenchus pawlowskyi* (Kurochkin, 1960) Poinar & Nelson, 1973. II. Description of *Kurochkintylenchus laevicepsi* gen. n., sp. n. and *Spilotylenchinae* fam. n. *Rus. J. Nematol.* 1999; 7(1):1–18.

Authors:

Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Porshakov A.M., Knyazeva T.V., Krasnov Ya.M., Mokrousova T.V., Novichkova L.A., Anisimova L.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Поршаков А.М., Князева Т.В., Краснов Я.М., Мокроусова Т.В., Новичкова Л.А., Анисимова Л.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 24.03.16.

А.А.Кузнецов, А.Н.Матросов, А.М.Поршаков, В.Н.Чекашов, М.М.Шилов

ИЗМЕНЕНИЕ ГРАНИЦ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ПРИКАСПИЯ

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

Цель исследований. Определение современных дислокации и размеров природных очагов чумы в Северо-Западном Прикаспии. **Материалы и методы.** По результатам проведенного в 2013–2014 гг. полевого и камерального картографирования Прикаспийских песчаного и Северо-Западного степного очагов чумы изготовлены электронные карты секторов, расположенных на периферии очагов. **Результаты и выводы.** Выявлено заметное уменьшение размеров природных очагов за счет распашки аридных пастбищ. Их новые, естественные границы на значительном протяжении представлены линейными элементами гидрографии. Там, где такие элементы отсутствуют, в качестве формализованных внешних границ приняты рамки секторов, в которых признаки энзоотии сохранились. Процесс глубокой и необратимой антропогенной трансформации ландшафтов привел к сокращению энзоотичных по чуме территорий: площадь степного очага чумы уменьшилась на 22 % и составляет 51152 кв. км, площадь песчаного – на 13 % и составляет 62510 кв. км. Распашка обширных площадей как способ коренного преобразования ландшафтов сделала эти земли непригодными для обитания малого суслика, полуденной и гребенщиковой песчанок, что является свидетельством полной утраты этими территориями признаков энзоотичности по чуме. Учет реального расположения и размеров природных очагов чумы в строго установленных границах, закрепленных на топографических картах и без труда идентифицируемых на местности, обеспечивает обоснованное планирование и проведение всего комплекса профилактических противочумных мероприятий. Новые пространственные параметры природных очагов предложены для внесения в официальные нормативно-методические документы, регламентирующие проведение эпидемиологического надзора за чумой.

Ключевые слова: природный очаг чумы, картографирование, Северо-Западный Прикаспий.

Корреспондирующий автор: Кузнецов Александр Александрович., e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.A.Kuznetsov, A.N.Matrosov, A.V.Porshakov, V.N.Chekashov, M.M.Shilov

Boundary Changes of Natural Plague Foci in the North-Western Pre-Caspian

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

Objective of the study is to specify present-day locations and sizes of natural plague foci in the North-Western Pre-Caspian. **Materials and methods.** Based on the results of field and office mapping of Pre-Caspian sandy and North-Western steppe plague foci, conducted in 2013–2014, designed have been electronic maps of the sectors, situated in the periphery of the foci. **Results and conclusions.** Detected has been marked reduction in sizes of natural foci owing to plowing of arid pastures. Over a significant distance, new natural focal boundaries are represented by linear elements of hydrography. Wherein such elements are absent, sector frames, in which evidence of enzooty remains, are accepted as formalized external boundaries. The process of deep and irreversible anthropogenic transformation of landscapes has resulted in the reduction of enzootic as regards plague territories: the steppe focus area has decreased by 22 %, being 51152 sq. km, the sandy one – by 13 %, amounting to 62510 sq. km. Farming on the extensive territories as a means of radical alterations of the landscapes has made the lands unsuitable for habitation of the little souslik, midday and tamarisk gerbils, which is an evidence of a complete loss of plague enzooty factors in the territory. The survey of actual position and sizes of natural plague foci within the rigid bonds, plotted on topographic maps and easily identifiable afield, provides for substantiated planning and complex prophylactic plague-control measures. Novel spatial parameters of the natural foci are suggested for the inclusion into official regulatory-methodological documents, guiding performance of epidemiological surveillance over plague.

Key words: natural plague focus, mapping, North-Western Caspian Sea Region.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksander A. Kuznetsov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.V., Chekashov V.N., Shilov M.M. Boundary Changes of Natural Plague Foci in the North-Western Pre-Caspian. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:38–43. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-38-43

Воплощением государственной политики освоения целинных и залежных земель в 30–60-е годы явился перевод значительных площадей степных пастбищ на равнинах Северо-Западного Прикаспия и Волго-Донского водораздела в разряд обрабатываемых сельскохозяйственных угодий богарного или поливного типа. Рост посевных площадей, но уже в меньших масштабах, и интенсивная химизация сельского хозяйства продолжились в 70–80-е годы в период реализации известной «Продовольственной программы». В

это же время шло опустынивание Прикаспийской низменности, связанное с аридизацией местного климата, падением уровня грунтовых вод [1], перевыпасом скота, приведшим к существенной деградации пастбищ, и хаотическими распашками [3, 9, 11]. Последовавший за этим спад сельскохозяйственного производства в последние десятилетия XX века, совпавший с подъемом уровня Каспийского моря и прекращением опустынивания, запустил процесс восстановления растительности [2, 8, 10]. Начало третьего тысячелетия

ознаменовалось новой волной модернизации агропромышленного комплекса, существенными признаками которой явились повышение культуры земледелия, базирующейся на современной агротехнике, и четкая организация севооборота [12, 13]. Чередование этих разнонаправленных процессов, наряду с другими природными и антропогенными факторами, крайне негативно отразилось на жизнедеятельности грызунов открытых пространств – видов, являющихся основными носителями чумы.

Так сложилось, что многие освоенные в прошлое и нынешнее время земли входили в состав природных очагов чумы. Являясь типичными сухостепными и полупустынными ландшафтами, они еще в 60–70-е годы прошлого столетия служили оптимальными местообитаниями для грызунов – основных носителей возбудителя, в популяциях которых тогда регистрировались эпизоотии. В этот же период начата паспортизация природных очагов чумы СССР, для реализации которой были установлены пространственные характеристики каждого очага на уточненной картографической основе. Характерно, что внешние контуры очагов были привязаны к историческим границам ареалов основных носителей и сведениям о местах регистрации эпизоотических и эпидемических проявлений в прошлом [7]. С тех пор и до настоящего времени (в течение четырех десятилетий) очертания очагов не подвергались пересмотру. Однако окультуривание природных ландшафтов продолжалось с разной интенсивностью все эти годы, а в новом тысячелетии даже наметилась тенденция увеличения посевных площадей за счет распахки сохранившихся целинных участков, рекультивации залежей и закладки новых орошаемых земель.

Участки, наиболее удаленные от центральных областей природных очагов чумы, в связи с их низкой эпидемической опасностью обследуются с минимальной интенсивностью. В Нижнем Поволжье становилась все более заметной потеря такими территориями признаков энзоотичности по чуме, характеризующаяся коренным преобразованием ландшафта, в пределах которого исчезли условия для обитания основных носителей возбудителя этой инфекции. Для выяснения эпизоотологического статуса дальних рубежей очагов нами проведены картографические исследования в рамках НИР 41-1-13 «Разработка методологии ГИС-картографирования и паспортизации на примере природных очагов чумы и других инфекций в Нижнем Поволжье».

Материалы и методы

Исследования осуществлялись в процессе камеральной обработки имеющихся картографических источников (пакет цифровых топографических карт 100-тысячного масштаба, другие картографические произведения и космofотоснимки из доступных интернетресурсов) и анализа результатов полевого картографирования на территории Северо-Западного

Прикаспия с использованием ГИС-технологий [6]. Итоговые картографические материалы, полученные в ходе исследований, использованы при обновлении электронных паспортов изученных природных очагов по установленным ранее правилам [4].

Весной 2013 г. был проведен полевой этап картографирования ландшафтов и поселений грызунов в зоне межевания степного и песчаного природных очагов чумы на территории Республики Калмыкия и Астраханской области. Основной метод работы – объезд приграничных территорий, закладка пеших маршрутов и учет численности грызунов, идентификация ландшафтов с помощью космических снимков. Во время этой экспедиции отрабатывались приемы использования в полевых условиях планшетного компьютера, совмещенного с модулем ГЛОНАСС/GPS позиционирования.

В мае–июне 2014 г. для уточнения западных границ очагов чумы Северо-Западного Прикаспия проведено полевое картографирование территории, расположенной в восточных районах Ставропольского края и прилегающих районах Калмыкии и Дагестана. Затем картографирование продолжили в западных и северо-западных районах Калмыкии, а также прилегающих районах Ростовской и Волгоградской областей. Для этого были использованы открытые крупномасштабные топографические карты последних лет съемки (с 2001 по 2010 год) и космические снимки из сети интернет.

Результаты и обсуждение

Результаты обследования линии раздела смежных очагов чумы позволили рекомендовать ее сохранение в том формализованном виде, как это было установлено в 1987 г. при вычленении нового природного (Прикаспийского песчаного) очага чумы из состава обширного степного очага Северо-Западного Прикаспия. Зона межевания очагов приурочена к стыкам ландшафтных элементов, являющихся предпочитаемыми станциями обитания либо сусликов, либо песчанок. На местности существует переходная зона, где разные по облику и площади обособленные фации ландшафта чередуются между собой, образуя сложное кружево, создающее область «взаимопроникновения» очагов. В этих условиях невозможно провести четкую линию, обоснованно и однозначно разграничивающую территории, заселенные теми или иными видами грызунов. Для принятия решения о границе был использован известный факт наличия сложной биоценотической структуры любого природного очага чумы, подтверждающий обитание различных носителей на территории конкретного очага, из которых основным может выступать наиболее многочисленный. Те секторы пограничной территории, где преобладают поселения песчанок, подлежали включению в состав песчаного очага, а с преобладанием поселений малого суслика – в состав степного. Разумеется, точное определение «пре-

обладания» задача трудновыполнимая, поэтому мы ограничились глазомерной оценкой площади тех или иных фаций ландшафта в секторах, расположенных в пограничной зоне. Кроме того, мы удостоверились, что в данной местности отсутствуют линейные элементы ландшафта (как естественные, так и антропогенные), имеющие подходящие дислокацию и направление, способные играть роль межочаговых границ. Учитывая определенную условность территориального разделения тесно соприкасающихся очагов чумы, разумным выходом из этого положения явилось установление формализованной границы (по рамкам секторов), а наиболее приемлемым вариантом послужила уже имеющаяся и ранее утвержденная граница.

Восточные районы Ставропольского края включали юго-западные части степного (Кумо-Манычский участок) и песчаного очагов чумы. По мнению специалистов Ставропольского НИПЧИ, к настоящему времени участок Кумо-Манычского междуречья утратил признаки очага сусликового типа ввиду исчезновения здесь поселений малого суслика и приобрел черты очага песчаночьевого типа. Для подтверждения этого положения и уточнения статуса энзоотичности данной территории мы в течение 10 дней проводили на ней поиск поселений грызунов. Было установлено, что земли к западу от Кумо-Манычского канала используются в основном под богарные сельхозкуль-

туры и практически лишены целинных степных или песчаных участков. На выявленных по картографическим источникам пастбищных участках, имеющих размеры, как правило, не более 2–3 кв. км, были заложены пешие маршруты, при прохождении которых не обнаружено ни одной норы сусликов или песчанок, хотя колонии общественной полевки встречались довольно часто. Отсутствие сусликов здесь подтверждено местными жителями.

Таким образом, выяснено, что Кумо-Манычский участок степного очага (западнее одноименного канала), а также наиболее западные участки песчаного очага, расположенные в левобережье Кумы вплоть до Зеленокумска, полностью лишены поселений малого суслика, полуденной и гребенщиковой песчанок. Разобщенность небольшого числа мелких участков целины предотвращает их заселение грызунами и блохами, способными поддерживать природную очаговость чумы. Подобная глубокая и необратимая антропогенная трансформация ландшафтов может служить основанием для полного исключения этих территорий из состава природных очагов чумы (т. е. придания им статуса не энзоотичной по чуме территории). Что касается земель к востоку от Кумо-Манычского канала, то здесь имеются поселения гребенщиковой песчанки, а далее на восток и полуденной, что позволяет включить их в состав Прикаспийского песчаного очага чумы (рис. 1). Дополнительным аргументом в пользу

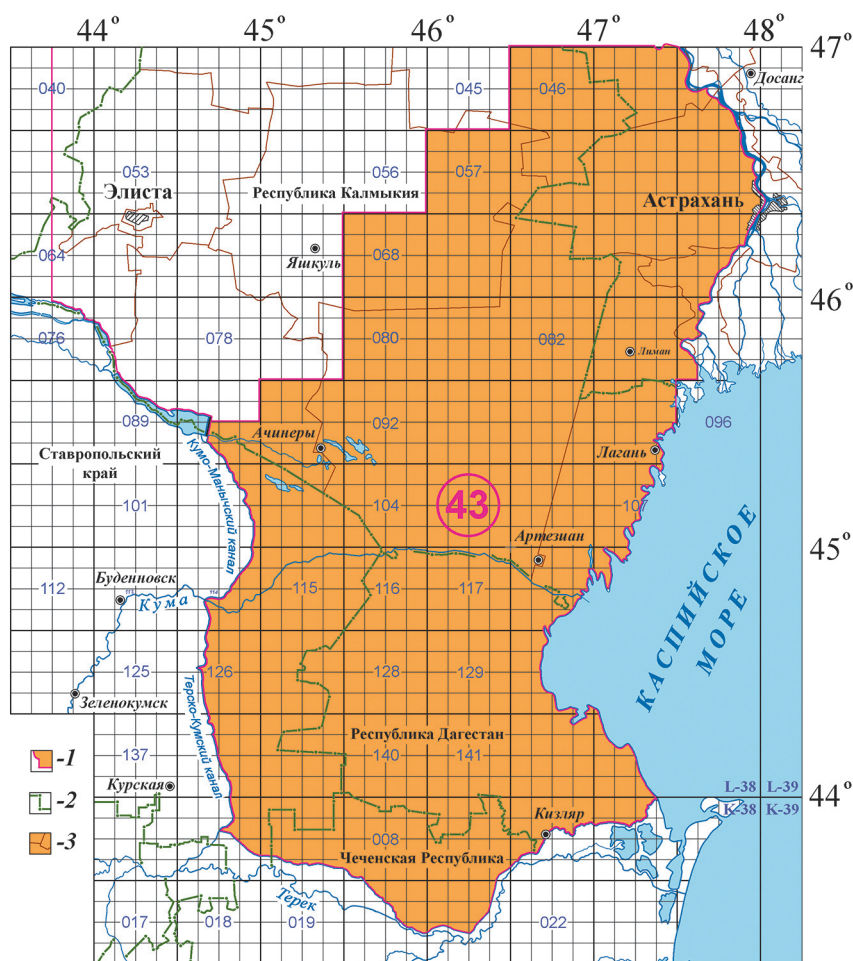


Рис. 1. Новая конфигурация Прикаспийского песчаного природного очага чумы:

1 – энзоотичная территория и ее граница; 2 – границы субъектов Российской Федерации; 3 – границы административных районов

придания участкам бывшего степного очага статуса очага песчаночьего типа служит то обстоятельство, что такие территории уже много лет обследуются в расширенном сезонном аспекте (двухвершинный характер эпизоотической активности), что обеспечивает более надежный противоэпидемический контроль. Кроме того, даже в эпизоотических ядрах песчаного очага имеются разреженные поселения малого суслика, что не мешает считать их очагом песчаночьего типа [5].

Сходная картина наблюдается и в правобережье Кумы. Здесь уже Терско-Кумский канал выполняет функцию естественной западной границы песчаного очага. К западу от этого канала по аналогии с левобережьем Кумы произошли такие же глубокие преобразования ландшафта, лишаящие эту территорию признаков энзоотичности по чуме. К востоку расположены типичные для песчаного очага ландшафты, имеющие поселения песчанок, в которых в недалеком прошлом неоднократно регистрировали эпизоотии чумы.

Южную границу очага целесообразно провести вдоль крупных каналов и берегов рек, учитывая их близкое соседство с северной стороны с ландшафтами очага песчаночьего типа, а с южной – либо с сельскохозяйственными, либо с ландшафтами очага сусликового типа (Дагестанский равнинно-предгорный очаг чумы). Исходя из этого принципа, граница, идущая вдоль восточного берега Терско-Кумского канала, доходит до пересечения с каналом им. Ленина и поворачивает на восток вдоль северного берега этого канала до его пересечения с каналом Наурско-Шелковская ветвь. Затем граница продолжается уже вдоль этого канала, после станицы Курдюковская (восточнее железнодорожной станции Кургалинская) переходит на левый берег р. Старый Терек, доходит до Кизляра и далее – до впадения в Каспийское море.

Восточная граница Прикаспийского песчаного очага чумы приведена нами в соответствие с современной береговой линией Каспийского моря – за счет подъема его уровня площадь суши незначительно сократилась. Формализованная граница между степным и песчаным очагами осталась прежней, за исключением небольшого нового участка вблизи Чограйского водохранилища (параллель $45^{\circ}30'$).

Таким образом, граница Прикаспийского песчаного очага чумы на большем своем протяжении представлена естественными линейными элементами ландшафта. Это береговые линии рек Волга (от точки пересечения правого берега рукава Енотаевка с линией параллели 47°), Бахтемир, Старый Терек; берега Каспийского моря, нескольких магистральных каналов и линия плотины Чограйского водохранилища (до точки ее пересечения с линией параллели $45^{\circ}30'$). В области перехода дельты Волги (р. Бахтемир) в западный берег моря, ввиду размытости здесь береговой линии и наличия периодически затопляемых участков, в качестве границ использованы рамки трех секторов: 123808433(43) – южная и

восточная; 123809522(43), 123809524(43) – восточные. Остальная часть границы, замыкающая очаг с севера, представлена формализованными отрезками параллелей и меридианов, являющихся рамками секторов, в соответствии с рис. 1.

Изучение границ Прикаспийского Северо-Западного степного очага чумы продолжили после определения статуса Кумо-Маньчского участка, который был полностью исключен из состава этого очага. Следовательно, юго-западная граница степного очага (как продолжение границы между смежными очагами) приурочена к северным берегам Чограйского водохранилища и р. Маньч. В точке пересечения левого берега реки с линией меридиана $43^{\circ}45'$ граница поворачивает на север вдоль этого меридиана, как и было прежде, но дальше ее конфигурация изменена в соответствии с результатами проведенного нами картографирования (рис. 2).

На западных и северо-западных приграничных участках Прикаспийского Северо-Западного степного очага в течение 10 дней закладывали пешие маршруты для поиска поселений грызунов на целинных участках, выявленных по картографическим источникам. Было установлено, что восточные районы Ростовской области, примыкающие к Республике Калмыкия, в основном переведены в разряд обрабатываемых сельскохозяйственных угодий, что позволило исключить такие территории из состава очага. Поиск поселений сусликов на сохранившихся пастбищных участках востока Ростовской области и западных склонах Ергенинской возвышенности показал отсутствие там жилых нор малого суслика, хотя старые и сильно заросшие растительностью курганы встречались в большом количестве. Местные жители также подтвердили исчезновение здесь сусликов. Тем не менее, такие территории с ненарушенным целинным ландшафтом не могут быть исключены из состава природного очага чумы.

На севере очага – преимущественно в Волгоградской области – полевое картографирование ввиду ограниченного срока экспедиции было проведено в минимальных объемах. Основной упор при ландшафтной индикации очаговых территорий здесь был сделан на работу с картографическими источниками, изучение которых показало радикальное антропогенное преобразование ландшафта на значительных площадях, что лишает их признаков энзоотичности по чуме. В результате выбраковки измененных территорий получили вариант конфигурации степного очага, преимущественно вписывающегося в границы северо-западной части Республики Калмыкия, правобережных районов северной части Астраханской области и крайней восточной оконечности Ростовской области (см. рис. 2). Большинство секторов в южных районах Волгоградской области, ранее входивших в состав очага, из него были исключены. В итоге формализованными (по рамкам секторов), но на новой позиции остались северо-западный, западный и юго-восточный отрезки границы степного очага, имею-

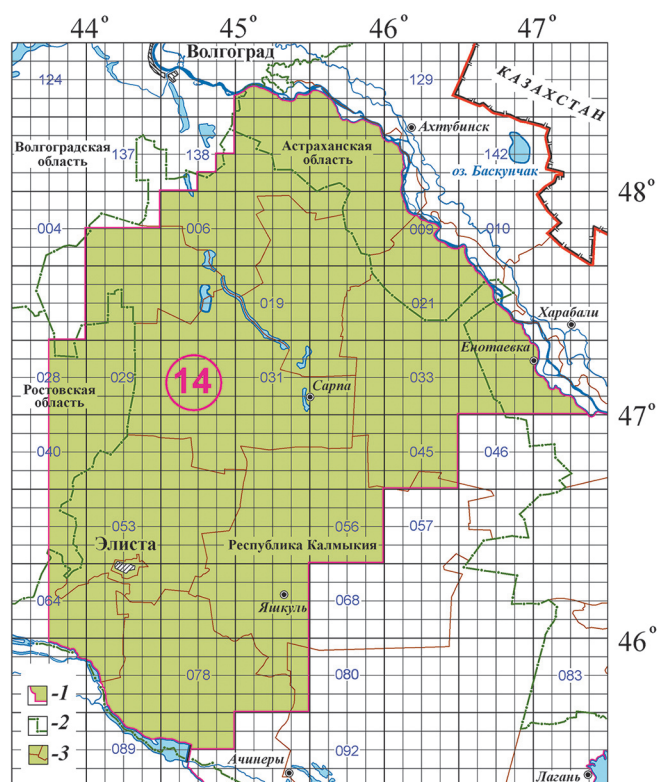


Рис. 2. Новая конфигурация Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы:

1 – энзоотичная территория и ее граница; 2 – границы субъектов Российской Федерации; 3 – границы административных районов

щие наибольшую протяженность. Юго-западный отрезок представлен береговыми линиями Чограйского водохранилища и р. Маныч, северо-восточный – правым берегом Волги (или ее рукавов) от точки его пересечения с линией меридиана 45° до точки пересечения с линией параллели 47°.

В камеральных условиях на растровые топографические карты масштаба 1:25000, соответствующие периферийным секторам, были нанесены в качестве эталонов границы природных очагов чумы вдоль линейных элементов ландшафта, ограничивающие распространение признаков энзоотии за их пределы. Площади образовавшихся очаговых и не очаговых фрагментов сектора вычисляли по суммарному количеству пикселей, образующих эти фрагменты. Точность такого подсчета весьма высока и даже избыточна, поскольку каждый пиксел при имеющемся разрешении карт оказался равен приблизительно 5 кв. м (0,0005 га), хотя площади сектора и его фрагментов округлялись до 1 га (0,01 кв. км), а всего очага – до 1 кв. км. Естественные участки новых границ очагов были нанесены также на векторную карту, служащую основой при работе в системе оперативного сбора данных эпизоотологического мониторинга.

В Прикаспийском песчаном очаге общее число секторов сократилось с 825 до 744, из которых 635 полностью входят в состав очага, а 109 – только частично. Площади полных секторов вычислялись как проективные площади трапеций, имеющих длины сторон (отрезков дуг параллелей и меридианов) в

соответствии с их географическим положением, и округлялись до 1 гектара. Заметим, что размеры всех секторов, расположенных в одном широтном ряду, идентичны. Площади фрагментов секторов, частично входящих в состав очага, подсчитывались картометрическим способом отдельно для каждого такого сектора. В результате реальная площадь очага в новой конфигурации равна 6251014 га (62510 кв. км), что на 13 % меньше прежней площади. Однако в целях сохранения контроля над участками с высоким эпидпотенциалом в прошлом, мы оставили в его составе небольшой фрагмент западнее Кумо-Манычского канала. В результате этого общая площадь очага для использования в официальных документах равна 63276 кв. км.

Прикаспийский Северо-Западный степной очаг чумы реально охватывает 602 сектора (вместо прежних 775), из которых 555 полностью входят в состав очага, а 47 – только частично. В результате определения размеров полных и неполных секторов площадь очага в новой конфигурации оказалась равной 5115237 га (51152 кв. км), что на 22 % меньше прежней площади.

В общем виде характер изменения границ природных очагов чумы Северо-Западного Прикаспия и сокращения их площадей представлен на рис. 3. Особо следует подчеркнуть, что уменьшение размеров природных очагов за счет «балластных» и фактически уже не обследуемых территорий осуществляется как мера документального оформления их нынешнего состояния. Количество участков, хоть сколько-нибудь представляющих эпидемиологическую угрозу, не сокращается, следовательно, отсут-

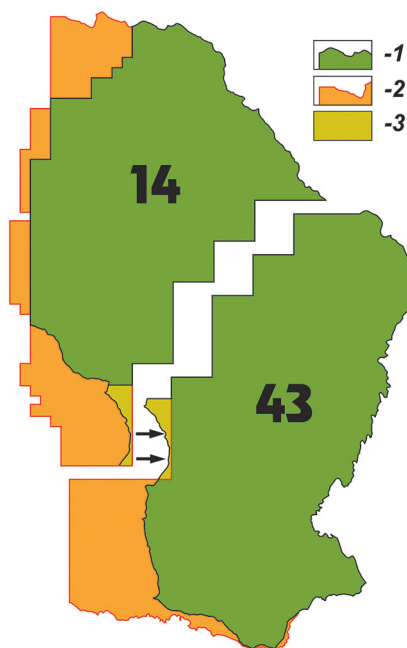


Рис. 3. Сокращение размеров Прикаспийского Северо-Западного степного (14) и Прикаспийского песчаного (43) очагов чумы:

1 – новые границы очагов и энзоотичная территория; 2 – старые границы и территория, потерявшая признаки энзоотичности; 3 – участок, переведенный из степного очага в песчаный

ствуют основания говорить о возможном уменьшении затрат на проведение комплекса профилактических мероприятий.

Таким образом, учет реального расположения и размеров природных очагов чумы в строго установленных границах, объективно закрепленных на топографических картах и без труда идентифицируемых на местности, обеспечивает обоснованное планирование и проведение всего комплекса профилактических противочумных мероприятий. Проведение новой эпидемиологической дифференциации очагов и разработка уточненного регламента эпизоотологического мониторинга будут способствовать увеличению объемов оперативного обследования наиболее опасных территорий, что более надежно гарантирует эпидемиологическое благополучие по чуме. Все это позволяет рекомендовать новые пространственные параметры природных очагов для внесения в официальные нормативно-методические документы, регламентирующие проведение эпидемиологического надзора за чумой.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакурова К.Б. Опустынивание: причины и методы борьбы с ним, эколого-экономические подходы В кн.: Адаптивные системы и природоохранные технологии производства сельскохозяйственной продукции в аридных районах Волго-Донской провинции. М.: Изд-во «Современные тетради»; 2001. С. 91–4.
2. Залибеков З.Г., Батырова С.Б., Усманов Р.З. Влияние нормированного выпаса овец на восстановление техногенно нарушенных растительных сообществ Терско-Кумской низменности. *Вестник РУДН*. 1997; 3:45–54.
3. Котенко М.Е., Батырова С.Б., Усманов Р.З. Масштабы техногенных воздействий на почвенный и растительный покров Терско-Кумского междуречья. *Аридные экосистемы*. 1997; 5:43–9.
4. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Куклев Е.В., Коротков В.Б., Мезенцев В.М., Попов Н.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Перспективы ГИС-паспортизации природных очагов чумы Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):48–53.
5. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Синцов В.К., Осипов В.П., Санджиев В.Б.-Х., Слудский А.А. Дифференциация Прикаспийского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):15–9.
6. Кулик К.Н., Рулев А.С., Юфев В.Г., Бакурова К.Б. Применение информационных технологий в геоэкологическом картографировании. *Вестник Калмыцкого ин-та соц.-эконом. и правовых исследований*. 2004; 2:57–64.
7. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Удовиков А.И., Григорьева Г.В. Эпизоотическая активность и эпизоотологическое районирование природных очагов чумы российской Федерации. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2001; 3:178–81.
8. Опарин М.Л., Опарина О.С. Трансформация комплекса птиц и млекопитающих степных экосистем под воздействием распашки (на примере саратовских степей). *Поволжский экол. журн.* 2010; 4:361–73.
9. Петров В.И., Воронина В.П. Деграция растительного покрова Северо-Западного Прикаспия. *Докл. РАСХН*. 2008; 4:24–6.
10. Трофимов И.А., Трофимова Л.С., Опарин М.Л., Опарина О.С. Особенности восстановления степной растительности на залежах и пастбищах в саратовском Заволжье. В кн.: Современная динамика компонентов экосистем пустынно-степных районов России. М.: РАСХН; 2001. С. 15–38.
11. Усманов Р.З., Саидов А.К., Баламирзоев М.А., Мирзоев Э.М.-Р. Процессы опустынивания почвенного покрова Российского Прикаспия (на примере Кизлярских пастбищ Республики Дагестан). *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2005; 2:88–94.
12. Усманов Р.З., Саидов А.К., Баламирзоев М.А., Мирзоев Э.М.-Р., Мурзаканова Л.З. Экологические аспекты мелиорации орошаемых почв аридных регионов Юга России. *Пробл. региональной экол.* 2007; 6:46–50.
13. Чемидов М.М. К проблеме восстановления и сохранения естественных пастбищ Северо-Западного Прикаспия. *Вестник Казанского ГАУ*. 2009; 2(12):135–8.

References

1. Bakurova K.B. [Desertization: the causes and control methods, ecological-economic approaches]. In: [Adaptive systems and nature-preserving technologies for manufacturing agricultural products in arid regions of Volgadon Province]. M.; 2001. P. 91–4.
2. Zalibekov Z.G., Batyrova S.B., Usmanov R.Z. [Impact of the limited sheep pasturing on the restoration of technogenically-damaged phytocoenoses in the Tersko-Kumsk Lowland]. *Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia*. 1997; 3:45–54.
3. Kotenko M.E., Batyrova S.B., Usmanov R.Z. [The extent of man-induced impact on the soil and vegetation mantle of the Tersko-Kumsk Interfluv]. *Aridnye Ekosistemy*. 1997; 5: 43–9.
4. Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Kuklev E.V., Korotkov V.B., Mezentssev V.M., Popov N.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Prospects of GIS-passportization of natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1:48–53.
5. Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Sintsov V.K., Osipov V.P., Sandzhiev V.B.-Kh., Sludsky A.A. [Differentiation of the Pre-Caspian sandy plague focus on the basis of the frequency of epizootic manifestations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3:15–9.
6. Kulik K.N., Rulev A.S., Yuferev V.G., Bakurova K.B. [Application of information technologies for geo-economic mapping]. *Bulletin of the Kalmyk Institute for Social-Economic and Legal Research*. 2004; 2:57–64.
7. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Udobikov A.I., Grigoreva G.V. [Epizootic activity and epizootiological zoning of natural plague foci in the Russian Federation]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2001; 3:178–81.
8. Oparin M.L., Oparina O.S. [Transformation of bird and mammal communities in the steppe ecosystems under the influence of extensive plowing (by the example of Saratov steppes)]. *Povolzhsky Ekol. Zh.* 2010; 4:361–73.
9. Petrov V.I., Voronina V.P. [Degradation of vegetation mantle in the North-Western Caspian Sea Region]. *Reports of the RAAS*. 2008; 4:24–6.
10. Trofimov I.A., Trofimova L.S., Oparin M.L., Oparina O.S. [Peculiarities of the steppe vegetation restoration in the deposits (lay lands) and pastures of the Saratov Trans-Volga Region]. In: [Present-Day Dynamics of Ecosystem Components in the Steppe-Desert Regions of Russia]. M.: RAAS; 2001. P. 15–38.
11. Usmanov R.Z., Saidov A.K., Balamirzoev M.A., Mirzoev E.M.-R. [Desertization of soil mantle in the Russian Caspian Sea Region (by the example of Kizlyar pastures in the Republic of Dagestan)]. *Bulletin of the Higher Educational Institutions. North-Caucasian Region. Natural Sciences*. 2005; 2:88–94.
12. Usmanov R.Z., Saidov A.K., Balamirzoev M.A., Mirzoev E.M.-R., Murzakanova L.Z. [Ecological aspects of irrigated soil melioration in arid regions in the South of Russia]. *Probl. Regional. Ekol.* 2007; 6:46–50.
13. Chemidov M.M. [Concerning restoration and preservation of natural pastures in the North-Western Caspian Sea Region]. *Bulletin of the Kazan State Agrarian University*. 2009; 2(12):135–8.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 23.06.16.

Г.Г.Онищенко¹, М.Е.Игнат'ева², Л.В.Будацыренова², М.И.Михайлов³

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ГЕПАТИТА А В РЕСПУБЛИКЕ САХА (ЯКУТИЯ)

¹Правительство Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; ²Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия), Якутск, Российская Федерация; ³ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», Москва, Российская Федерация

Цель. Изучение влияния вакцинации против гепатита А на уровень заболеваемости гепатитом А в Республике Саха (Якутия). **Материалы и методы.** Анализ статистических данных отчетных форм государственной статистической отчетности по инфекционной заболеваемости и проведению профилактических прививок против гепатита А с 1992 по 2015 год в Якутии. **Выводы и результаты.** В результате проводимых в течение последних 14 лет в Республике Саха (Якутия) селективной иммунизации групп риска, заболеваемость гепатитом А снизилась за этот период в 38 раз. По итогам 2015 г. на территории зарегистрировано 15 случаев, показатель составил 1,6 на 100 тыс. населения, что ниже среднероссийских показателей в 2,8 раза. Проведенный анализ многолетней динамики заболеваемости гепатитом А на территории Республики Саха (Якутия) установил влияние вакцинопрофилактики гепатита А на эпидемический процесс гепатита А. С увеличением числа привитых уменьшается уровень заболеваемости. Особенно выражен эффект от иммунизации среди возрастной группы от 7 до 14 лет.

Ключевые слова: гепатит А, вакцинопрофилактика, Республика Саха (Якутия).

Корреспондирующий автор: Игнат'ева Маргарита Егоровна, e-mail: yakutia@14.rospotrebnadzor.ru.

G.G.Onishchenko¹, M.E.Ignat'eva², L.V.Budatsyrenova², M.I.Mikhailov³

Effectiveness of Preventive Vaccination against Hepatitis A in the Republic of Sakha (Yakutia)

¹Government of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; ²Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russian Federation; ³I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Objective of the study is to analyze the influence of vaccination against hepatitis A on the corresponding morbidity rates in the Republic of Sakha (Yakutia). **Materials and methods:** statistical data contained in the statutory forms of the State statistical reporting on infectious diseases and preventive vaccination against hepatitis A in Yakutia, dated 1992 to 2015. **Results and conclusions.** Following selective immunization of high-risk groups, performed during the last 14 years in the Republic of Sakha, the incidence of hepatitis A has decreased by 38 times. According to the results of 2015, registered were 15 cases of infection, the rate being 1.6 per 100 thousand of the population, which was below the national average by 2.8 times. Assessment of the long-term dynamics has demonstrated the impact of preventive vaccination on the epidemic process of hepatitis A. Morbidity rates fall down with the increment of the numbers of immunized persons. Effect of the vaccination among the age group of 7 to 14 years is especially strong.

Key words: hepatitis A, preventive vaccination, The Republic of Sakha (Yakutia).

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Margarita E. Ignat'eva, e-mail: yakutia@14.rospotrebnadzor.ru.

Citation: Onishchenko G.G., Ignat'eva M.E., Budatsyrenova L.V., Mikhailov M.I. Effectiveness of Preventive Vaccination against Hepatitis A in the Republic of Sakha (Yakutia). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:44–46. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-44-46

Целью исследования являлось изучение особенностей влияния вакцинации против гепатита А на изменение эпидемического процесса этой инфекции на территории Республики Саха (Якутия).

Материалы и методы

Выполнен анализ статистических отчетов по заболеваемости гепатитом А в Республике Саха (Якутия) в период с 1992 по 2015 год (ежемесячные и годовые статистические отчеты центров ГСЭН, формы 2, 85, ежемесячные и годовые статистические отчеты Роспотребнадзора, формы 2, 5 и 6).

Результаты и обсуждение

По данным ВОЗ, ежегодно в мире заражается и болеет гепатитом А около 1,5 млн. человек. Однако

есть все основания полагать, что фактическая заболеваемость в несколько раз выше. Вирусный гепатит А распространен повсеместно и его удельный вес в суммарной заболеваемости вирусными гепатитами в различных регионах мира колеблется в широких пределах. В странах Европы и США его доля составляет от 10 до 30 %, а в развивающихся странах Азии, Африки и Латинской Америки, эндемичных по гепатиту А, 70–80 % [2].

В России в последние годы заболеваемость гепатитом А постепенно снижалась и составляла 25–50 заболевших на 100 тыс. населения. Пик заболеваемости приходится на ранний детский и дошкольный возраст, однако в последние годы наблюдается тенденция к сдвигу заболеваемости в сторону подростков и взрослых, у которых гепатит А протекает тяжело и сопровождается рецидивами [6].

На территории Республики селективная вакци-

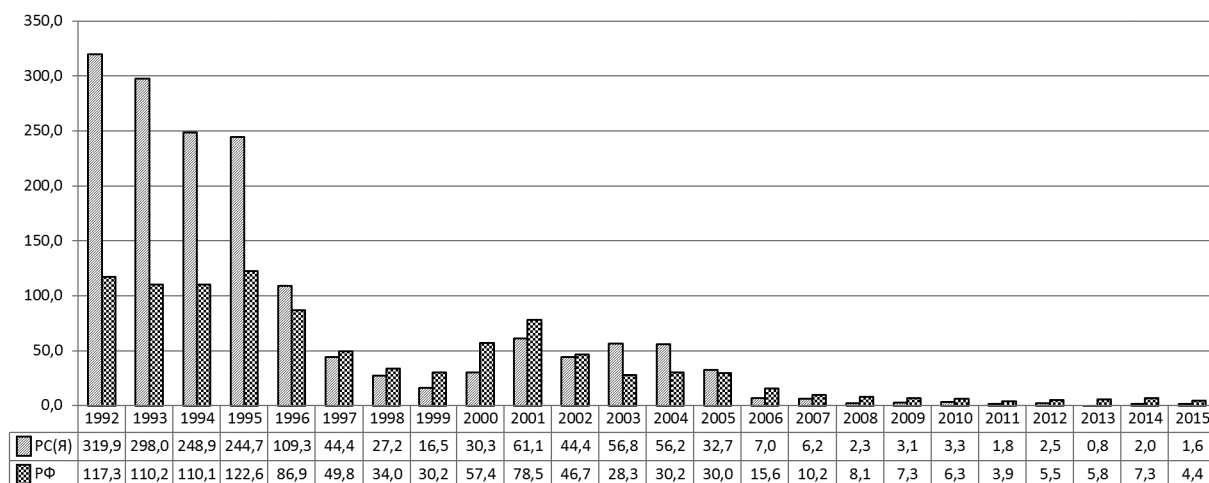


Рис. 1. Сравнительная динамика заболеваемости гепатитом А в Республике Саха (Якутия) и Российской Федерации за 1992–2015 гг.

нация против гепатита А среди населения стала проводиться с 2002 г. За 2002–2015 гг. привито 311927 человек, в том числе 160831 детей, проведена вакцинация взрослых из групп риска, всего привито 151096 человек (работники общественного питания, персонал детских дошкольных учреждений, работники водопроводных сооружений и медицинские работники инфекционных стационаров). По анализу привитости против гепатита А за первые 5 лет иммунная прослойка среди детей с 3 до 14 лет составила 30,8 %, достигнув по итогам 2015 г. 35,8 %. Среди подростков за этот же период отмечено увеличение иммунной прослойки с 17,8 до 58,7 %, среди взрослых – с 8,7 до 25,1 %, охват всего населения вырос с 12,9 в 2006 г. до 28,8 % в 2015 г.

В многолетней динамике заболеваемость гепатитом А в Республике Саха (Якутия) в довакцинальный период до 2004 г. характеризовалась неравномерным распределением по годам, высокими показателями заболеваемости, достигавшими во время подъемов в среднем 56,2–319,9 на 100 тыс. населения. Среднемноголетний показатель заболеваемости гепатитом А составил 119,83 на 100 тыс. населения.

В вакцинальный период (2005–2015 гг.) среднемноголетний показатель заболеваемости гепатитом А в Республике составил $(6,1 \pm 0,8)$ на 100 тыс. населения (рис. 1).

Сравнительный анализ динамики заболеваемости

гепатитом А в Республике Саха (Якутия) и Российской Федерации за 1992–2005 гг. показывает ее синхронность, кроме 2003–2004 гг. подъема заболеваемости в Республике (рис. 1).

Начиная с 2006 г. уровень заболеваемости гепатитом А в Республике ниже среднефедеративных показателей от 1,6 (2007 г.) до 7 раз (2013 г.) (рис. 1).

Изучение интенсивности эпидемического процесса гепатита А в разных возрастных группах населения как в довакцинальный, так и в вакцинальный период позволило установить, что основными контингентами риска были и остаются дети возрастных групп 3–6 и 7–14 лет. Заболеваемость данных возрастных групп превышает заболеваемость среди всего населения (таблица).

При анализе возрастной структуры заболеваемости в период плановой вакцинации против гепатита А наиболее выраженный эпидемиологический эффект от вакцинопрофилактики отмечен среди школьников 7–14 лет.

В довакцинальный период на территории Республики регистрировалась вспышечная заболеваемость после наводнения 2001 г. в детских дошкольных учреждениях и общеобразовательных школах в 2004–2005 гг. В условиях плановой иммунизации против гепатита А лиц из групп риска вспышечная заболеваемость в организованных коллективах отсутствует. С ростом числа привитых против гепатита

Уровень заболеваемости гепатитом А в разных возрастных группах населения в довакцинальный период и в условиях проведения вакцинации

Население	Довакцинальный период				Вакцинальный период				Сравнение с уровнем заболеваемости в 2001 г.	
	1992		2001		2005		2015			
	абс. ч.	на 100 тыс. населения	абс. ч.	на 100 тыс. населения	абс. ч.	на 100 тыс. населения	абс. ч.	на 100 тыс. населения	2005 г.	2015 г.
Дети до года	3	18,4	0	0	2	14,9	1	6,3		
Дети 1–2-х лет	155	416,4	9	34,8	13	45,6	1	3,3	0,8	-10,5 раза
Дети 3–6 лет	1072	1240,2	48	81,5	40	72,8	8	14,5	-1,1 раза	-5,6 раза
Дети 7–14 лет	1165	775,5	204	138,4	89	69,1	1	0,9	-2,0 раза	-153,8 раза
Всего дети до 14 лет	2395	707	261	102	144	63,8	11	5,1	-1,6 раза	-20,0 раза
Все жители	3550	319,9	608	61,1	311	32,8	15	1,6	-1,9 раза	-38,2 раза

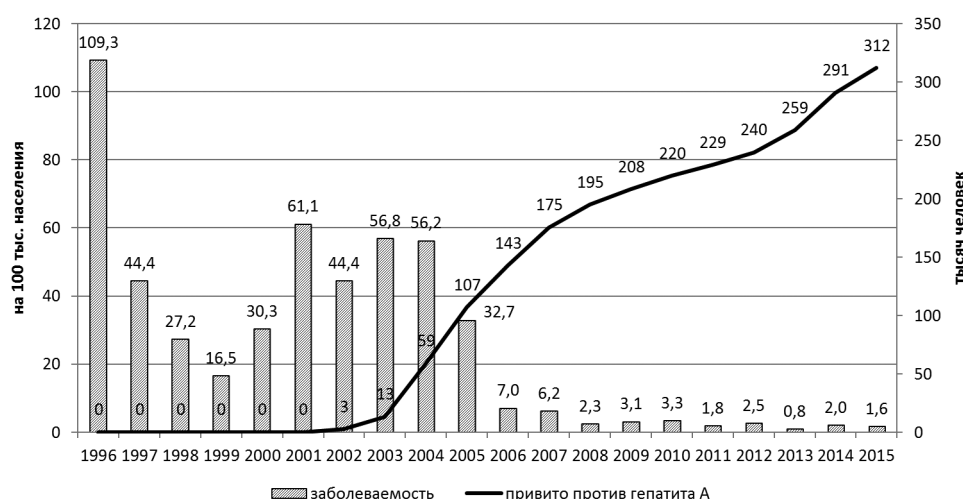


Рис. 2. Динамика заболеваемости вирусным гепатитом А и проведение прививок против гепатита А населения Республики Саха (Якутия), 1996–2015 гг.

А заболеваемость снизилась до единичных случаев. Анализ динамики уровня заболеваемости и привитости населения в вакцинальный период выявил обратную линейную зависимость между данными показателями, коэффициент корреляции составил $-0,759$, постольку эта связь отрицательная, то есть с возрастанием числа привитых уменьшается уровень заболеваемости. Расчетный критерий Стьюдента (t расч. = $4,95$ при t табл. = $2,1$) подтверждает значимость коэффициента корреляции. Так как неравенство не выполняется, то исходные данные согласуются со значимостью корреляции между числом привитых и уровнем заболеваемости (рис. 2).

Таким образом, вакцинопрофилактика, проводимая в течение 14 лет на территории Республики Саха (Якутия), обусловила ряд изменений в проявлениях эпидемического процесса гепатита А.

Наиболее эпидемиологически эффективна плановая иммунизация против гепатита А лиц из групп риска. Реализуемая на протяжении ряда лет плановая вакцинация организованных детей в возрасте 6–7 лет, а также взрослых из числа групп риска (персонала организованных детских коллективов) позволила в короткий срок существенно снизить уровень заболеваемости гепатитом А не только в группе привитых лиц, но и среди совокупного населения.

Значимость влияния на уровень заболеваемости увеличения числа привитых подтверждает отрицательный коэффициент корреляции, указывающий на обратную линейную зависимость между числом привитых и уровнем заболеваемости.

Полученные данные являются основанием для включения вакцинации против гепатита А, прежде всего детей из организованных коллективов, в Национальный календарь профилактических прививок на территории Российской Федерации.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасимов А.И. Медицинская статистика. М.: Медицинское информационное агентство; 2007. 480 с.

2. Михайлов М.И., Шахгильдян И.В., Онищенко Г.Г. Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика). М.: ФГОУ ВУНМЦ Росздрава; 2007. С. 77.

3. Потехина Н.Н., Давыдова Н.А., Разгулин С.А. Основы ретроспективного анализа инфекционной заболеваемости. Н. Новгород: Изд-во НГМА; 2000. 72 с.

4. Шаханова И.Л., Осипова Л.А. Экономические потери от инфекционной заболеваемости в России: величины и тенденции. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2005; 4:19–21.

5. Шаханова И.Л., Радута О.И., Осипова Л.А., Приказчикова Г.С. Экономическая эффективность вакцинопрофилактики: методика оценки. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2004; 3:12–6.

6. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Ершова О.Н., Хухлович П.А., Лыткина И.Н., Шулакова Н.И., Романенко В.В., Юровских А.И., Патлусова В.В., Ооржак Н.Д., Коршунова Г.С., Ясинский А.А., Клименко С.И. Эффективность вакцинации против гепатита А для профилактики и купирования вспышек в Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2009; 2:63–4.

References

1. Gerasimov A.I. [Medical Statistics]. M.: "Medical News-Agency"; 2007. 480 p.

2. Mikhailov M.I., Shakhgil'dyan I.V., Onishchenko G.G. [Enteric Viral Hepatitis (Etiology, Epidemiology, Diagnostics, and Prophylaxis)]. M.; 2007. P. 77.

3. Potekhina N.N., Davydova N.A., Razgulin S.A. [Fundamental Principles of Retrospective Analysis of Infectious Morbidity]. N. Novgorod; 2000. 72 p.

4. Shakhanova I.L., Osipova L.A. [Economic losses imposed by infectious morbidity in the Russian Federation: trends and values]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2005; 4:19–21.

5. Shakhanova I.L., Raduto O.I., Osipova L.A., Prikazchikova G.S. [Economic effectiveness of preventive vaccination: methods of assessment]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2004; 3:12–6.

6. Shakhgil'dyan I.V., Mikhailov M.I., Ershova O.N., Khukhlovich P.A., Lytkina I.N., Shulakova N.I., Romanenko V.V., Yurovskikh A.I., Patlusova V.V., Oorzhak N.D., Korshunova G.S., Yasinsky A.A., Klimenko S.I. [Practicability of the vaccination against Hepatitis A for prophylaxis and control of the outbreaks in the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2009; 2:63–4.

Authors:

Onishchenko G.G. Government of the Russian Federation. Moscow, Russian Federation.

Ignat'eva M.E., Budatsyrenova L.V. Rosпотребнадзор Administration in the Republic of Sakha (Yakutia). 9, Oyunsogo St., 677027, Yakutsk, Russian Federation. E-mail: yakutia@14.rosпотребнадзор.ru.

Mikhailov M.I. I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. Moscow, Russian Federation.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Правительство Российской Федерации. Москва, Российская Федерация.

Игнат'ева М.Е., Будацыренова Л.В. Управление Роспотребнадзора по Республике Саха (Якутия). Российская Федерация, 677027, г. Якутск, ул. Ойунского, д. 9. E-mail: yakutia@14.rosпотребнадзор.ru.

Михайлов М.И. ФБГНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова». Москва, Российская Федерация.

Поступила 15.07.16.

Ж.А.Касьян, Н.А.Осина, С.А.Щербакова

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВИДОВ БРУЦЕЛЛ МЕТОДОМ ПЦР С УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

Цель работы. создание тест-системы, позволяющей проводить видовую идентификацию возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** Проведен анализ литературных источников и нуклеотидных последовательностей *Brucella* spp. с помощью специализированного программного обеспечения для выбора ДНК-мишеней, специфичных для каждого вида бруцелл, разработан методический прием и набор реагентов для идентификации видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции с применением термоциклера с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов типа RotorGene. **Результаты и выводы.** Разработана тест-система, позволяющая провести дифференциацию видов или группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены *BR0262*, *BRA0541-0542*, *BMEII0711*, которые полностью или частично делетированы у разных видов бруцелл.

Ключевые слова: идентификация, бруцеллы, видовой принадлежность, ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени.

Корреспондирующий автор: Касьян Жанетта Андреевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Zh.A.Kas'yan, N.A.Osina, S.A.Shcherbakova

Development of the Test-System for Differentiation of *Brucella* Species, Using Real-Time PCR

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

Objective of the study is to construct a test-system allowing for specific identification of brucellosis agent, using real-time polymerase chain reaction. **Materials and methods.** Carried out has been analysis of literature sources and nucleotide sequences of *Brucella* spp., applying the specialized software for DNA-target sequence selection, specific for each brucella species. Developed is methodological tool and reagent panel for identification of brucellosis agent species appurtenance by means of RT PCR using thermocycler with hybridization-fluorescent registration of results, RotorGene type. **Results and conclusions.** Developed is the test-system, providing for differentiation of brucella species or group of species: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae*, applying real-time polymerase chain reaction. *BR0262*, *BRA0541-0542*, *BMEII0711* genes are selected as DNA-targets, being completely or partially deleted in different species of brucella.

Key words: identification, brucella, species appurtenance, real-time PCR.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: Funding: The study was carried out within the frames of the Federal Target Program "National System of Chemical and Biological Safety in the Russian Federation (2009–2014)".

Corresponding author: Zhanetta A. Kas'yan, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. Development of the Test-System for Differentiation of *Brucella* Species, Using Real-Time PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:47–51. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-47-51

Возбудитель бруцеллеза является факультативным внутриклеточным патогеном, относящимся к роду *Brucella*, который, в свою очередь, подразделяется на 11 видов: *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* и *B. papionis*, шесть первых циркулируют на территории Российской Федерации. Наибольшую роль в заболевании людей и сельскохозяйственных животных играют виды *B. abortus* и *B. melitensis* [1].

С целью видовой идентификации возбудителя бруцеллеза широкое применение получили ПЦР с электрофоретической детекцией (ПЦР-ЭФ) и ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени

(ПЦР-РВ). В качестве ДНК-мишеней использовали переменные участки гена *omp2a*, *omp2b* [7], наличие видоспецифичной вставки *IS711* [4, 10, 11, 14], а также ряд генов, которые полностью или частично делетированы у разных видов бруцелл [6, 8, 9]. Однако разрешающая способность ПЦР-систем, основанных на выявлении *IS711*, ограничена видами *B. abortus* bv 1, 2, 4, *B. suis* bv 1, *B. ovis*, *B. melitensis* [4], а высокая специфичность амплификации таких мишеней в ПЦР-РВ достигается только в случае использования зондов типа FRET [14].

При оценке специфичности предложенных I.Lopez-Goni *et al.* [8, 9] и V.Hinić *et al.* [6] методических приемов установлено, что амплификация локу-

са BMEI 1436-1435 наблюдается не только у *B. canis*, но и у ряда штаммов *B. suis*, а гена BMEI 0466 – у *B. melitensis* (специфично), а также у *B. ovis* и *B. neotomae* (неспецифично).

В соответствии с действующими нормативно-методическими документами проведение лабораторной диагностики бруцеллеза в лабораториях территориального и регионального уровней должно осуществляться только с применением зарегистрированных препаратов [2, 3]. Этому требованию на момент начала исследования соответствовали только тест-системы, позволяющие детектировать *Brucella* spp. в пробах клинического, биологического материала и из объектов окружающей среды без определения их видовой принадлежности: «АмплиСенс *Brucella* spp. – Fl», «ГенБру». В большинстве работ, представленных выше, авторами разработаны только методические приемы, среди которых «AMOS» [4] и «Bruce-Ladder» [8] получили широкое использование, и не рассмотрены возможности создания на их основе генодиагностических препаратов.

Целью данного исследования являлось создание тест-системы, позволяющей проводить видовую идентификацию возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Материалы и методы

В работе использовано 60 штаммов микроорганизмов, из них: 14 – *B. abortus*, 18 – *B. melitensis*, 5 – *B. suis*, 2 – *B. neotomae*, 2 – *B. ovis*, 2 – *B. canis*, 3 – *Yersinia enterocolitica*, 3 – *Y. pestis*, 3 – *Y. pseudotuberculosis*, 3 – *Francisella tularensis*, 3 – *Escherichia coli*. Все культуры получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Штаммы возбудителей бруцеллеза выращивали на эритроцит-агаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч, штаммы туляремийного микроба – на питательной среде для выделения возбудителя туляремии FT (ГНЦ Прикладной Микробиологии, Оболенск), pH 7,2, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч, штаммы *Yersinia* spp., *Escherichia* spp. выращивали на среде Хоттингера, pH 7,2, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствовало $1,6 \cdot 10^9$ м.к./мл для возбудителя бруцеллеза, $1 \cdot 10^9$ – для *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli*, $5 \cdot 10^9$ – для *F. tularensis*. Затем десятикратными разведениями в 0,9 % растворе натрия хлорида микробные взвеси доводили до концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл. Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем посева из концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси

(100 м.к.) каждого тест-штамма на три чашки Петри с соответствующей средой.

Для обеззараживания проб к ним добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), прогревали при 56°C в течение 30 мин, с последующим смешиванием 100 мкл полученной суспензии с лизирующим буфером на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубированием 15 мин при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «ДНК-сорб В». Работу проводили в соответствии с инструкцией к препарату.

Постановку ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе типа RotorGene («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Терцик MC 2 («ДНК-технология», Россия) и камере SybCell GT (BioRad, США) в 2 % агарозном геле.

Подбор праймеров и зондов проводили с помощью программного обеспечения на сайте www.genscript.com и программы GeneRanner 3.1. Оценку гомологии последовательностей – по алгоритму BLAST, используя базу данных GenBank NCBI.

Результаты и обсуждение

Наибольшей разрешающей способностью для видовой дифференциации бруцелл обладают ПЦР-системы, основанные на определении наличия или отсутствия в геноме возбудителя определенных локусов. Поэтому на первом этапе нашей работы были проанализированы результаты сравнения полных геномов возбудителей бруцеллеза, полученные S.M.Halling *et al.* [5] и G.Rajashekara *et al.* [12], а также литературные источники, посвященные разработке ПЦР для идентификации видов бруцелл с целью выбора генов, наиболее перспективных для создания системы определения видовой принадлежности бруцелл методом мультилокусной ПЦР-РВ.

Для специфической детекции *B. suis* в качестве таких мишеней могут быть использованы гены *BRA0362-BRA0379*, *BR0262*, *BR1080*, *BR0951-0955*, *BR1059-1060*, которые встречаются только у данного возбудителя [5]. Однако авторами в исследование не взяты штаммы *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*. Поэтому нами проведен анализ *in silico* гомологии данных участков с последовательностями указанных видов бруцелл в базе данных GenBank NCBI. Установлено, что за исключением гена *BRA0367*, специфичного только для *B. suis*, все остальные локусы встречаются у *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, а участок *BR1059-1060* обнаружен также у некоторых штаммов *B. abortus* и *B. melitensis*. Помимо этого, V.G.Ratushna *et al.* [13] определили, что гены *BRA0378*, *BRA0369*, *BRA0363* имеются в составе генома только 1–4 биоваров *B. suis*. Поскольку авторы взяли для исследования локусы на протяжении всего участка *BRA0362-BRA0379*, то

можно предположить, что и остальные гены могут иметь подобную специфичность. В работе I.Lopez-Goni *et al.* [9] установлено, что ген *BR1080* не амплифицируется у 2 биовара *B. suis*. Для того, чтобы иметь в последующем возможность применения системы «Bruce-Ladder» в качестве подтверждающей при проведении верификационных исследований по идентификации штаммов бруцелл, подбираемые нами локусы должны отличаться от таковых, составляющих основу данного приема. Поэтому в качестве перспективных для выявления *B. suis* представляется использование генов *BRA0367*, *BR0262*.

По данным G.Rajashekara *et al.* [12], имеется только два локуса, которые делетированы у *B. canis*: *BMEI1435* и *BMEI0635-0636*. Оба этих гена использовали в качестве ДНК-матриц при разработке ПЦР для дифференциации видов бруцелл [6, 8]. Однако во всех случаях отмечена неспецифическая реакция по данным локусам с рядом штаммов *B. suis*. Все это определяет необходимость проведения дополнительных исследований по выявлению специфичных для штаммов *B. canis* генетических маркеров. Поэтому в нашей работе мы рассмотрели возможность групповой идентификации *B. suis/B. canis*.

Для специфической детекции *B. abortus* в качестве таких мишеней могут быть использованы гены *BRA0419-0439*, которые делетированы у данного вида бруцелл [5]. Поскольку авторами в исследовании не использованы штаммы *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, то нами проведен анализ *in silico* гомологии данных участков с последовательностями указанных видов бруцелл в базе данных GenBank NCBI. Отмечено наличие гомологичных последовательностей у *B. canis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. melitensis*. Для дальнейших исследований был выбран локус *BRA0420*.

Для штаммов *B. melitensis* также характерно наличие локусов, которые делетированы только у данного вида бруцелл. Среди них гены *BRA0173*, *BRA1080*, *BRA1096*, *BRA0541-0542*, *BRA 0630-0636*, *BRA0749-0750*, *BRA0907*, *BR1895*, *BR1182-1183*, *BR0404*, *BR0389-0391*, *BR0355*, *BR0221* [5]. Поскольку данные локусы ранее не использовались для специфической детекции *B. melitensis* в качестве ДНК-мишеней выбрали два гена, имеющие разное расположение в геноме *B. suis*: *BRA0907* и *BRA0541-0542*.

Аналогичный подход применили для выбора маркера, специфичного для *B. ovis*. G.Rajashekara *et al.* [12] показали, что гены *BMEI0899-0907*, *BMEI0993-1012* и *BMEI0129*, *BMEI0185-0226*, *BMEI0405*, *BMEI0708*, *BMEI0811-0815*, *BMEI0875-0878* полностью или частично делетированы у штаммов бруцелл данного вида. При разработке системы «Bruce-Ladder» авторы использовали в качестве ДНК-мишени локус *BMEI0998-0997* из участка *BMEI0993-1012* [8]. Поэтому нами также был выбран ген *BMEI0994* из этой области, но другого расположения. Дополнительно в качестве возможного генетического маркера для специфической детекции *B. ovis* рассмотрен локус *BMEI0812*, который,

по данным анализа *in silico*, не встречается в геноме штаммов бруцелл данного вида.

Для дифференциации *B. neotomae* представляется перспективным использование генов *BMEI0284*, *BMEI1657*, *BMEI1819*, *BMEI0710-0719*, *BMEI 0986-0988*, которые по данным G.Rajashekara *et al.* [12] не встречаются в их геноме. Ранее I.Lopez-Goni *et al.* [8] подтвердили эффективность применения локуса *BMEI 0987* для определения штаммов бруцелл данного вида. В связи с этим для дальнейших исследований выбрали ген *BMEI0711*.

На следующем этапе работы определена специфичность выбранных локусов у типовых и ряда природных штаммов бруцелл: *B. abortus* bv.1 19BA, 544 (ATCC 23448), *B. abortus* bv.3 Tulya (ATCC 23450), *B. abortus* bv.4 292 (ATCC 23451), *B. abortus* bv.5 B-3196 (ATCC 23452), *B. abortus* bv.6 870 (ATCC 23453), *B. abortus* bv.7 63-75 (ATCC 23454), *B. abortus* bv.9 C-68 (ATCC 23455), *B. melitensis* bv.1 16M (ATCC 23456), *B. melitensis* bv.2 63/9 (ATCC 23457), *B. melitensis* bv.3 Ether 706 (ATCC 23458), *B. suis* bv.1 1330 (ATCC 23444), *B. suis* bv.2 Thomsen (ATCC 23445), *B. suis* bv.3 686 (ATCC 23446), *B. suis* bv.4 40 (ATCC 23447), *B. suis* bv.5 513 (NCTC 11996), *B. ovis* 64/1, 2000, *B. canis* 66, H-966, *B. neotomae* 5K33 (ATCC 23459), 325. Исследование выполняли с помощью ПЦР с электрофоретическим учетом результатов (табл. 1).

Специфичность генов *BR0262*, *BRA0907*, *BRA0541-0542*, *BMEI0711*, установленная *in vitro*, полностью совпала с данными анализа *in silico*. Полученные результаты по локусам *BRA0420* и *BMEI0994*, *BMEI0812* не позволяют на данный момент выбрать их в качестве ДНК-мишеней для дифференциации видов *B. abortus* и *B. ovis*. Для решения этой задачи необходимо расширить перечень используемых штаммов и уточнить их систематическое положение, в том числе с использованием ПЦР-систем «AMOS» [4] и «Bruce-Ladder» [8].

На основании полученных результатов для дальнейшей работы выбраны гены *BR0262*, *BRA0907*, *BRA0541-0542*, *BMEI0711*, амплификация которых методом ПЦР-РВ позволит дифференцировать виды и группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae*. С целью возможности осуществления реакции в один этап в состав зондов, комплементарных этим последовательностям введены различные флуоресцентные метки (табл. 2).

В ходе ряда экспериментов подобраны оптимальные условия ПЦР с выбранными праймерами и зондами, в том числе в мультилокусном формате. Установлено, что чувствительность реакции амплификации каждого из указанных генов была не ниже $5 \cdot 10^3$ м.к./мл, а специфичность 100 %. Во всех случаях для каждого вида бруцелл наблюдалась амплификация соответствующих генов. Со штаммами гетерологичных микроорганизмов положительной амплификации не отмечено.

Результаты определения специфичности выбранных ДНК-мишеней

Наименование локуса	Вид анализа	Наличие или отсутствие амплификации						Результаты исследования	Выводы: использование в качестве ДНК-мишени
		<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>		
BRA0367	<i>in silico</i>	-	-	+	-	-	-	Амплифицируются только у 1 и 5 биовара <i>B. suis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	-	-	$\frac{+}{2/5}$	-	-	-		
BR0262	<i>in silico</i>	-	-	+	-	+	+	Специфичная реакция	да
	<i>in vitro</i>	-	-	$\frac{+}{5/5}$	-	$\frac{+}{2/2}$	$\frac{+}{2/2}$		
BRA0420	<i>in silico</i>	-	+	+	+	+	+	Отсутствие амплификации не только у <i>B. abortus</i> , но и у <i>B. ovis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	$\frac{-}{8/8}$	+	+	$\frac{-}{2/2}$	+	+		
BRA0907, BRA0541-0542	<i>in silico</i>	+	-	+	+	+	+	Специфичная реакция	да
	<i>in vitro</i>	+	$\frac{-}{3/3}$	+	+	+	+		
BMEI0994, BMEI0812	<i>in silico</i>	+	+	+	-	+	+	Наличие амплификации <i>B. ovis</i>	нет
	<i>in vitro</i>	+	+	+	$\frac{+}{2/2}$	+	+		
BMEI0711	<i>in silico</i>	+	+	+	+	+	$\frac{-}{2/2}$	Специфичная реакция	нет
	<i>in vitro</i>	+	+	+	+	+	$\frac{-}{2/2}$		

Примечание: серым показана специфичность каждого локуса; дробь – количество штаммов, имеющих, по данным *in vitro*, изучаемый locus, к числу исследованных культур; жирным – неспецифичные результаты, полученные *in vitro*.

Результаты проведенных исследований в полной мере свидетельствовали о возможности создания на основе предложенного подхода генодиагностического препарата. Поэтому нами подготовлены экспериментальные серии «Набора реагентов для идентификации штаммов *Brucella* spp. методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Brucella*- идентификация-РГФ)», в состав которого вошли ПЦР-смесь-1, содержащая праймеры и зонды, специфичные к генам BR0262 и BMEI0711; ПЦР-смесь-2 – праймеры и зонд, специфичный к локусу BRA0541; ПЦР-смесь-3, представляющая собой буферный раствор; растворы фермента, положительного контрольного образца, ТЕ-буфера и деионизованной воды. В ходе тестирования такой формы комплектации установлено сохранение чувствительности набора – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл и специфичности – 100 % в течение 6 месяцев (сроки контроля – 12 месяцев).

В ходе межлабораторных и клинических испытаний на широкой выборке 111 штаммов, включающей

26 культур *B. abortus*, 30 – *B. melitensis*, 11 – *B. suis*, 4 – *B. neotomae*, 5 – *B. ovis*, 5 – *B. canis*, 6 – *Yersinia enterocolitica*, 6 – *Y. pestis*, 6 – *Y. pseudotuberculosis*, 6 – *F. tularensis*, 6 – *E. coli*, в полной мере подтверждена заявленная чувствительность и специфичность препарата. Работа по клиническим испытаниям тест-системы осуществлена в ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Установлено, что диагностическая чувствительность медицинского изделия «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» составляет не менее 98,5 % с доверительной вероятностью 90 %, а диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %. Набор реагентов прошел государственную регистрацию в установленном порядке – Рег. уд. № РЗН 2014/1948.

Таким образом, нами разработана тест-система, позволяющая провести дифференциацию видов или группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены BR0262, BRA0541-0542, BMEI0711, которые полностью или частично deletированы у разных видов бруцелл. Набор реагентов характеризуется высокой специфичностью и чувствительностью.

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

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

Таблица 2

Перечень ДНК-матриц и способ их использования для определения видовой принадлежности бруцелл, предложенный в данной работе

Вид	PC-1		PC-2
	JOE (BME0711)	ROX (BR0262)	JOE (BRA0541 или BRA0907)
<i>B. abortus/B. ovis</i>	+	-	+
<i>B. melitensis</i>	+	-	-
<i>B. suis/B. canis</i>	+	+	+
<i>B. neotomae</i>	-	+	+

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2013. С. 191.
2. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. МУ 3.1.7.1189-03. М.; 2003.
3. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики бруцеллеза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.3010-12. М.; 2013. 24 с.
4. Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2660-6.
5. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715-26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
6. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Ž., Makaya P.V., Frey J., Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75:375-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
7. Leal-Klevezas D.S., Martinez V.I.O., Lopez M.A., Martinez S.J.P. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12):3087-90.
8. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckart A., Ferreira A.C., Carosso R., Correa de Sa M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 3484-7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
9. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154:152-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
10. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-Time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(8):4753-9. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4753-4759.2003.
11. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290-3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.
12. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5040-51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
13. Ratushna V.G., Sturgill D.M., Ramamoorthy S., Reichow S.A., He Y., Lathigra R., Striranganathan N., Halling S.M., Boyle S.M., Gibas C.J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMS Microbiol.* 2006; 6:13. DOI: 10.1186/1471-2180-6-13.
14. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43-52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

References

1. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: Meditsina; 2013. P. 191.
2. [Prophylaxis and laboratory diagnostics of brucellosis in humans]. MR 3.1.7.1189-03. M.; 2003.
3. [Procedure for organization and carrying out of laboratory diagnostics of brucellosis for the facilities at the territorial, regional, and federal levels]. MR 4.2.3010-12. M.; 2013. 24 p.
4. Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2660-6.
5. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(8):2715-26. DOI: 10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
6. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Ž., Makaya P.V., Frey J., Abril C. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75:375-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
7. Leal-Klevezas D.S., Martinez V.I.O., Lopez M.A., Martinez S.J.P. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(12):3087-90.
8. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckart A., Ferreira A.C., Carosso R., Correa de Sa M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 3484-7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
9. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154:152-5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
10. Newby D.T., Hadfield T.L., Roberto F.F. Real-Time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-Exonuclease, and Hybridization Probe Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(8):4753-9. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4753-4759.2003.
11. Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(3):1290-3. DOI: 10.1128/JCM.42.3.1290-1293.2004.
12. Rajashekara G., Glasner J.D., Glover D.A., Splitter G.A. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J. Bacteriol.* 2004; 186(15):5040-51. DOI: 10.1128/JB.186.15.5040-5051.2004.
13. Ratushna V.G., Sturgill D.M., Ramamoorthy S., Reichow S.A., He Y., Lathigra R., Striranganathan N., Halling S.M., Boyle S.M., Gibas C.J. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMS Microbiol.* 2006; 6:13. DOI: 10.1186/1471-2180-6-13.
14. Redkar R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes.* 2001; 15(1):43-52. DOI: 10.1006/mcpr.2000.0338.

Authors:

Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Касьян Ж.А., Осина Н.А., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.04.16.

Л.В.Миронова, Ж.Ю.Хунхеева, Е.А.Басов, А.С.Пономарева, С.К.Миткеева, С.В.Балахонов

АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОТИПА *VIBRIO CHOLERAЕ* В УСЛОВИЯХ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ДЕФИЦИТА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск, Российская Федерация

Цель работы. Экспериментальное исследование влияния низкой температуры и дефицита питательных веществ на стабильность комплекса генетических локусов *Vibrio cholerae* El Tor. **Материалы и методы.** В экспериментальных микрокосмах исследовалась стабильность комплекса генетических локусов (основные гены патогенности; участки генома, содержащие вариабельные тандемные повторы и сайты узнавания редкощепящих рестриктаз, определяющие VNTR- и PFGE-профиль изолятов соответственно; гены жизнеобеспечения холерного вибриона) четырех штаммов *Vibrio cholerae* El Tor на разных этапах инкубации. **Результаты и выводы.** Установлено, что при культивировании исследуемых штаммов в условиях дефицита питательных веществ и низкой температуры произошло формирование клонов с измененным VNTR- и PFGE-профилями, частота обнаружения которых составила $4-8 \cdot 10^{-2}$. Изменений в структуре генов «домашнего хозяйства» и утраты генов патогенности в составе мобильных генетических элементов не выявлено. Результаты исследования доказывают вероятность изменения анализируемых локусов генома *V. cholerae* в период пребывания микроорганизма в неблагоприятных условиях среды, что следует принимать во внимание при интерпретации результатов молекулярного типирования.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, стабильность генотипа, адаптация, VNTR, PFGE, гены «домашнего хозяйства», гены патогенности.

Корреспондирующий автор: Миронова Лилия Валерьевна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.V.Mironova, Zh.Yu.Khunkheeva, E.A.Basov, A.S.Ponomareva, S.K.Mitkeeva, S.V.Balakhonov

Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russian Federation

Objective is an experimental study of the low temperature and nutrient deficiency effects on the stability of *Vibrio cholerae* El Tor genetic loci complex. **Materials and methods.** The stability of the genetic loci (i.e. the basic pathogenicity genes; genome fragments containing variable tandem repeats and sites of rare cutting restrictionase recognition defining VNTR- and PFGE-profiles of the isolates, accordingly; *V. cholerae* «housekeeping» genes) of the four *Vibrio cholerae* El Tor strains was investigated on the experimental microcosm at different stages of incubation. **Results and conclusions.** The study demonstrated that clones with altered VNTR- and PFGE-profiles (the detection frequency was $4-8 \cdot 10^{-2}$) were being formed when strains were cultivated under nutrient deficiency and low temperature conditions. Neither changes in the structure of «housekeeping» genes nor loss of pathogenicity genes of the mobile genetic elements were revealed. The findings affirm the probability of analyzed *V. cholerae* loci alteration occurrence under unfavorable environment conditions. Obtained results should be taken into consideration for interpretation of molecular typing data.

Key words: *Vibrio cholerae*, genotype stability, adaptation, VNTR, PFGE, «housekeeping» genes, pathogenicity genes.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Liliya V. Mironova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:52–56. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-52-56

Изменчивость микроорганизмов рассматривается как лежащее в основе их эволюции свойство приобретать или утрачивать исходные признаки в определенных условиях существования [1, 3]. Известно, что фенотипические модификации свойств бактерий нестабильны, тогда как генетическая изменчивость, обусловленная мутационными процессами в геноме или различного рода рекомбинациями генетического материала [3, 8], характеризуется относительной стабильностью и при условии закрепления изменений в популяции является основой диверсифицирующего отбора.

Для генотипирования микроорганизмов, изучения генетического разнообразия микробных популя-

ций используется анализ структуры определенных локусов и, соответственно, вопрос сохранения стабильности исходного генотипа в различных условиях существования микроорганизмов оказывается важным при проведении эпидемиологических исследований, а также в эволюционном анализе. Поскольку известно, что для холерного вибриона характерна высокая пластичность генома, изучение вопросов стабильности применяемых для генотипирования локусов данного патогена приобретает особую актуальность. Ранее, при макрорестрикционном анализе хромосомной ДНК, нами выявлена вариабельность пульс-электротипов изолированных при эпидемических осложнениях штаммов *Vibrio chole-*

rae Eltor [7]. Кроме того, в эксперименте показана возможность реорганизации генома токсигенного холерного вибриона посредством утраты генов СТХ профага в условиях недостатка питательных веществ [4], обнаружена способность *V. cholerae* к спонтанной элиминации детерминант патогенности в составе мобильных генетических элементов при пассаже на питательных средах [6], а также утрате генов вирулентности генетически измененными вариантами вибриона элтор [5]. Вместе с тем отсутствуют данные об экспериментальном влиянии стрессовых факторов окружающей среды на стабильность таких используемых для генотипирования холерного вибриона локусов как вариабельные tandemные повторы, участки генома, содержащие сайты узнавания редкощепящих рестриктаз и определяющие профиль рестрикции ДНК изолятов при PFGE-типировании, гены жизнеобеспечения холерного вибриона и др.

С учетом изложенного цель работы – экспериментальное исследование влияния низкой температуры и дефицита питательных веществ на стабильность комплекса генетических локусов *Vibrio cholerae* Eltor.

Материалы и методы

В эксперимент включено четыре штамма *V. cholerae* Eltor, выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока при разных эпидемиологических ситуациях из клинического материала (*V. cholerae* Eltor O1 № И-441 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB3*)*tcpA*⁺*toxR*⁺) и № И-1300 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB1*)*tcpA*⁺*toxR*⁺)) и из объектов окружающей среды (*V. cholerae* Eltor O1 № И-1310 (генотип *ctxAB*⁺(*ctxB1*)*tcpA*⁺*toxR*⁺) и № И-1462 (генотип *ctxAB*⁻ *tcpA*⁻ *toxR*⁺)).

Экспериментальные микрокосмы формировали во флаконах с забуференным физиологическим раствором, в которые вносили микробную взвесь исследуемых штаммов в конечной концентрации 10⁷ м.к./мл. Инкубацию проводили при температуре 6 °С с контрольными посевами (на 12, 26, 54 и 82-е сутки) на плотные питательные среды до прекращения высеваемости. Также исследованию подвергали последние обнаруживаемые на питательных средах вегетативные клетки штаммов.

На каждом этапе контрольных исследований оценивали морфологию колоний, отбирали по три колонии каждого штамма (субкультуры) для анализа комплекса молекулярно-генетических свойств (наличие основных генов вирулентности – *ctxAB*, *tcpA* и регуляторного гена *toxR*; определение пульс-электротипа, VNTR-профиля и сиквенса-типа). Кроме того, проводили MALDI-ToF масс-спектрометрическую оценку видовой принадлежности субкультур. После прекращения роста штаммов в посевах из микрокосмов осуществляли центрифугирование их содержимого при 6 тыс. об/мин, 30 мин, осадок подвергался комплексному молекулярно-генетическому исследованию и иммуно-флуоресцентному анализу.

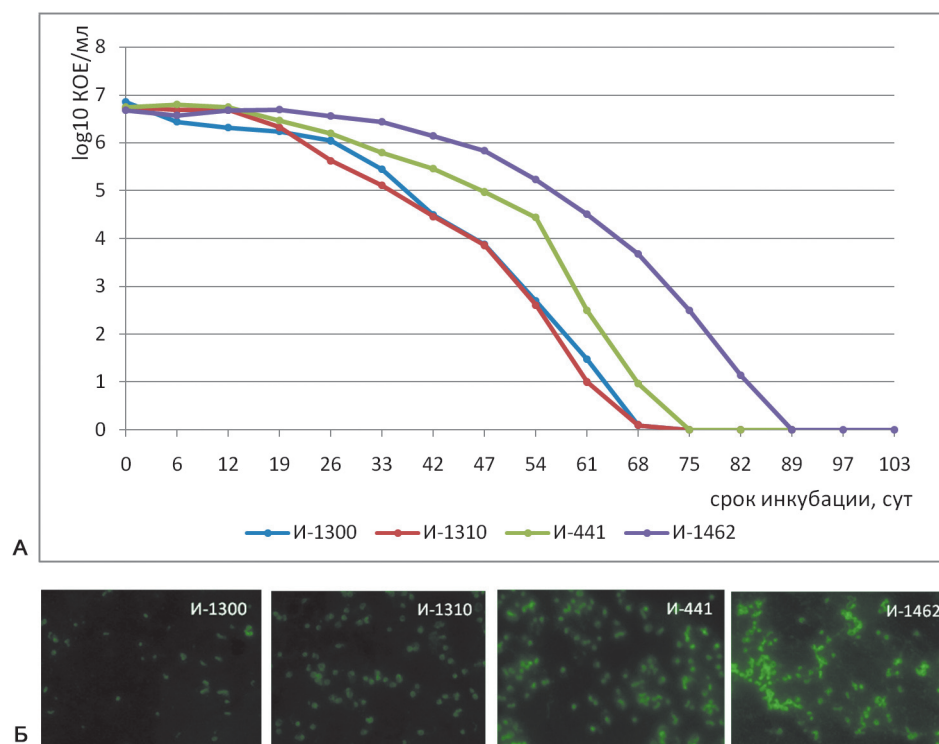
Экстракция белков для масс-спектрометрического анализа проводили посредством обработки микробной взвеси этиловым спиртом и 70 % муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. Выделение ДНК осуществляли с использованием стандартного набора для экстракции нуклеиновых кислот.

Фрагменты генов *ctxAB*, *tcpA* и *toxR* детектировали в мультиплексной ПЦР. Анализ структуры вариабельных tandemных повторов *V. cholerae* проводили по пяти локусам – VcA, VcB, VcC, VcD, VcG [2] с определением размера ампликонов капиллярным электрофорезом. Для уточнения структуры локусов с измененным размером ампликона проводили их секвенирование. Макрорестрикционный анализ хромосомной ДНК выполняли с использованием эндонуклеаз *NotI* и *SfiI* в соответствии с предложенным PulseNet протоколом. Стабильность структуры генов жизнеобеспечения изучали на основании секвенирования пяти локусов – *dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *cat*.

Результаты и обсуждение

Пребывание исследуемых культур *V. cholerae* в микрокосмах в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ привело к постепенному снижению концентрации микробных клеток: вегетативные клетки в посевах токсигенных штаммов обнаруживались до 68 сут эксперимента, нетоксигенного – до 82 сут (рис. 1, А). Полученный после прекращения высеваемости осадок содержимого микрокосмов не содержал вегетативных клеток, что подтверждено отсутствием роста при посеве его на жидкие и плотные питательные среды. Люминесцентная микроскопия полученных из осадка препаратов обнаружила присутствие в них полиморфных клеток с преобладанием округлых форм с интенсивной флуоресценцией оболочек при окрашивании специфическими холерными иммуноглобулинами. Подобные изменения морфологии клеток являются одним из свидетельств перехода микроорганизма в некультивируемое состояние (рис. 1, Б).

В ходе эксперимента существенных изменений морфологии колоний *V. cholerae* в контрольных посевах не выявлено. Однако при анализе последних посевов из микрокосмов в популяции штамма *V. cholerae* Eltor И-1300 обнаружены единичные мелкие сухие морщинистые непрозрачные желтоватые колонии. Микроскопически колонии неоднородной структуры с валиком по периферии и вдавленным центром, с признаками диссоциации и формированием дочерних, типичных для холерного вибриона, колоний (рис. 2, А). Последующие пересевы привели к постепенному увеличению в популяции доли морфологически типичных форм. Наряду с изменением морфологии колоний, произошло существенное снижение агглютанабельности холерными сыворотками О- и Огава, утрата способности ферментировать сахарозу (рис. 2, А), замедление ферментации глюкозы,



снижение подвижности микробных клеток. Масс-спектрометрически субкультура идентифицирована как *V. cholerae* (score value 2,48–2,62). Установленные изменения биологических свойств штамма могут рассматриваться как формирование «персистирующего» фенотипа («persister») – одного из вариантов адаптивной изменчивости холерного вибриона [12]. Исследование фенотипических свойств субкультуры последнего высева *V. cholerae* Eltor И-1310 выявило отсутствие у нее продукции декарбоксилазы орнитина и незначительную гемолитическую активность. У остальных штаммов изменений фенотипа в экспериментальных микрокосмах не выявлено.

MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ субкультур на контрольных этапах эксперимента показал сохранение исходного профиля референсных белков холерного вибриона (все образцы идентифи-

цированы как *V. cholerae*, score value 2,44–2,70).

При ПЦР-детекции установлено сохранение исходного набора детерминант патогенности во всех исследуемых образцах. Стабильной оказалась и нуклеотидная последовательность генов «домашнего хозяйства», определенная в полученных на последнем этапе эксперимента субкультурах.

VNTR-анализ показал изменение структуры содержащих вариабельные тандемные повторы локусов в двух отобранных при первом контрольном исследовании субкультурах: в субкультуре штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1462 (локус VcA) и штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-441 (локус VcB). В обоих случаях произошла дупликация, что привело к увеличению размера локуса на один повтор (VcA 12→13, VcB 25→26). Выявленное изменение структуры локусов подтверждено секвенированием. Частота из-

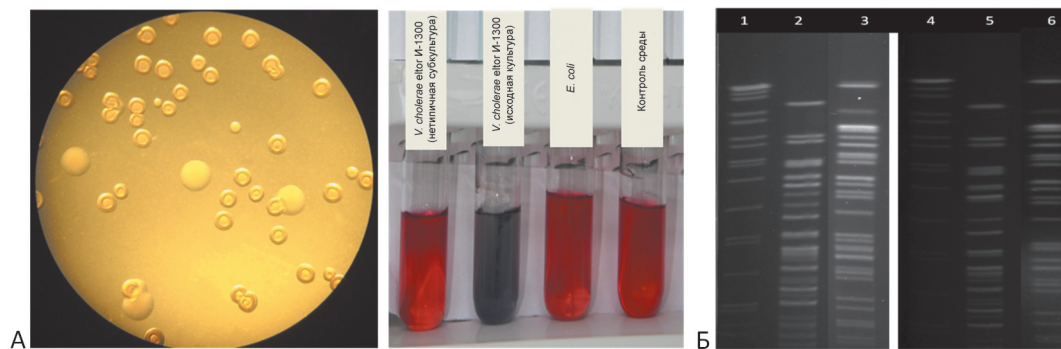


Рис. 2. Фенотипические (А) и молекулярно-генетические (Б) свойства субкультуры штамма *V. cholerae* Eltor И-1300:

А – полиморфные колонии *V. cholerae* Eltor И-1300 на щелочном агаре и ферментация сахарозы на полужидкой питательной среде; Б – PFGE-паттерны исходного штамма *V. cholerae* Eltor И-1300 и экспериментальной морфологически измененной субкультуры: 1–4 – ДНК *Salmonella* ser. Braenderup N98124, рестрицированная *XbaI* (размерный стандарт – 668,9; 452,7; 398,4; 336,5; 310,1; 244,4; 216,9; 173,4; 167,4; 138,9; 104,5; 78,2; 76,8; 54,7; 33,3; 28,8; 20,5 kb); 2–3 – *NotI*- и *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК исходного штамма *V. cholerae* Eltor И-1300; 5–6 – *NotI*- и *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК измененной субкультуры *V. cholerae* Eltor И-1300

менчивости VNTR-профиля составила $4 \cdot 10^{-2}$ и касалась только локусов VcA и VcB.

При макрорестрикционном анализе хромосомной ДНК установлено изменение структуры *NotI*- и *SfiI*-генерируемых профилей двух субкультур штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1300, полученных через 7 сут пребывания в микрокосмах. В структуре *NotI*-генерируемого паттерна произошло формирование дополнительного фрагмента и смещение в сторону уменьшения размера фрагмента в диапазоне 104,5–138,9 kb. Изменение профиля рестрикции *SfiI* заключалось в утрате бэнда в размерном диапазоне 76,8–78,2 kb. Кроме того, на 54-е сутки эксперимента (третье контрольное исследование) выявлено изменение полученного при гидролизе экзонуклеазой *SfiI* PFGE-профиля штамма *V. cholerae* Eltor O1 И-1310: профиль одной из субкультур демонстрирует сдвиг фрагмента в сторону увеличения размера в области 216,9–244,4 kb, другой – уменьшения в области 78,2–104,5 kb (рис. 3). Частота изменчивости PFGE-профиля составила $8 \cdot 10^{-2}$, с неравномерным распределением показателя между двумя рестриктазами (*SfiI* – $6 \cdot 10^{-2}$, *NotI* – $2 \cdot 10^{-2}$). Следует отметить, что модификации профиля рестрикции ДНК выявлены только у атипичных генетически измененных штаммов вибриона эльтор.

Анализ структурной организации исследуемых участков генома фенотипически измененной субкультуры *V. cholerae* Eltor O1 И-1300 выявил трансформацию паттернов рестрикции ДНК эндонуклеазами *NotI* (утрата одного фрагмента в диапазоне 104,5–138,9 kb) и *SfiI* (увеличение размера фрагмента в области 216,9–244,4 kb) (рис. 2, Б), при сохранении исходных VNTR- и амплификационных профилей.

Таким образом, инкубация холерного вибриона

в экспериментальных условиях привела к формированию клонов с геномными перестройками отдельных анализируемых локусов. Изменения VNTR-профиля выявлены только на начальном этапе эксперимента и заключались в дупликациях повторов VcA и VcB. Известно, что одним из широко распространенных вариантов адаптации бактериальных геномов к стрессовым условиям являются дупликации-амплификации генов (gene duplication-amplification), которые могут служить основой для дальнейших генетических модификаций при условии получения селективных преимуществ измененными клонами [10]. Соответственно, обнаруженные в эксперименте изменения VNTR-профиля можно рассценивать как первичную реакцию генома на стресс, а отсутствие в последующем измененных клонов в популяции свидетельствует о нестабильности вариантов с данными модификациями. Вариабельность и изменчивость VNTR-генотипа *V. cholerae* показана ранее при исследовании в динамике материала от больных холерой и контактировавших с ними лиц в Бангладеш и *in vitro* при пассаже штаммов на питательных средах [13]. Данные о возможности изменения структуры VNTR-локусов в эксперименте *in vivo* получены при исследовании *Salmonella enterica* Typhimurium [11], метициллин-резистентного *S. aureus* [14].

Менее стабильным в эксперименте оказался макрорестрикционный профиль штаммов: измененные по данному признаку клоны выявлялись на всем протяжении опыта с большей частотой в сравнении с VNTR-профилем. Характер изменений PFGE-профиля также может свидетельствовать в пользу дупликаций участков генома как в области сайтов рестрикции (генерирование дополнительных бэндов), так и за их пределами (увеличение размера фрагментов) [10]. Наряду с этим, изменение паттернов рестрикции может быть обусловлено и другими генетическими модификациями, в т.ч. не затрагивающими сайты рестрикции делециями, что рассматривается как один из признаков процесса компактизации генома микроорганизма [8, 9]. Следует сказать, что изменчивость PFGE-профилей выявлена при проспективном исследовании генотипов *V. cholerae* в ходе эпидемии холеры на о. Гаити [15], а также у метициллин-резистентного *S. aureus* *in vivo* [14].

Проведенные исследования доказывают вероятность изменения отдельных локусов генома в период пребывания *V. cholerae* в неблагоприятных условиях среды, что следует принимать во внимание при интерпретации результатов молекулярного типирования. Учитывая особенности экологии холерного вибриона (наличие сапрофитической и паразитической форм существования), необходимо проведение дальнейших экспериментальных исследований по изучению стабильности генотипа изолятов *in vitro* и *in vivo* для комплексной оценки эффективности и информативности применения того или иного подхода к типированию в рамках эпидемиологического надзора за холерой и изучения филогении возбудителя.

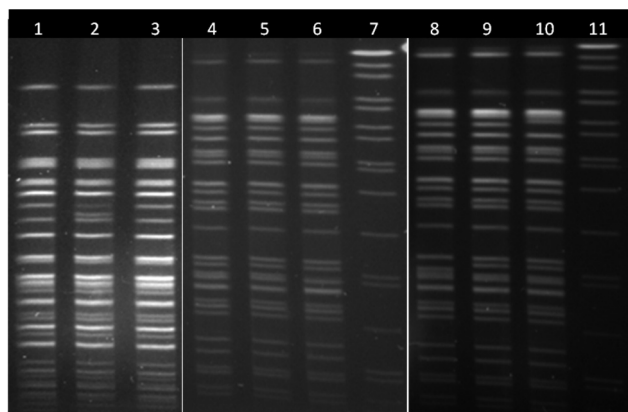


Рис. 3. PFGE-паттерны экспериментальных субкультур *V. cholerae* Eltor:

1–3 – *NotI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1300 (7 сут исследования): 1 – 1 колония, 2 – 2 колония (измененный паттерн), 3 – 3 колония; 4–6 – *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1300 (7 сут исследования): 4 – 1 колония, 5 – 2 колония, 6 – 3 колония (измененный паттерн); 8–10 – *SfiI*-генерируемые паттерны рестрикции ДНК *V. cholerae* Eltor И-1310 (54 сут исследования): 8 – 1 колония (измененный паттерн), 9 – 2 колония, 10 – 3 колония (измененный паттерн); 7, 11 – ДНК *Salmonella* ser. Braenderup H98124, рестрицированная *XbaI* (размерный стандарт – 668,9; 452,7; 398,4; 336,5; 310,1; 244,4; 216,9; 173,4; 167,4; 138,9; 104,5; 78,2; 76,8; 54,7; 33,3; 28,8; 20,5 kb)

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельский В.А., Калупкий П.В., Киселева В.В., Шаталова Е.В., Закарян Л.М. Гетерогенность микробных популяций. М.: Медицинское информационное агентство; 2008. 160 с.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Вариабельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.
3. Красильников А.П., Романовская Т.Р. Микробиологический словарь-справочник. Минск: Асар; 1999. 397 с.
4. Кулышань Т.В., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Генетические изменения вирулентных штаммов холерных вибрионов биовара Эльтор при их обитании в водной среде. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 1(91):41–4.
5. Кулышань Т.В., Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара элтор. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; 3:11–7.
6. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С., Половинкина В.С., Куликалова Е.С., Афанасьев М.В. Молекулярно-генетический анализ заносных эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 2:13–20.
7. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Басов Е.А., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Ретроспективный макрорестрикционный анализ штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных при эпидемических осложнениях на Дальнем Востоке России. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2014; 2:29–36.
8. Равин Н.В., Шестаков С.В. Геном прокариот. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013; 17(4/2):972–84.
9. Смирнов Г.Б. Механизмы приобретения и потери генетической информации бактериальными геномами. *Усп. современной биол.* 2008; 128(1):52–76.
10. Andersson D.I., Hughes D. Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43:167–95. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134805.
11. Barua H., Lindblom I.L., Bisgaard M., Christensen J.P., Olsen R.H., Christensen H. *In vitro* and *in vivo* investigation on genomic stability of *Salmonella enterica* Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2013; 166:607–16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.035.
12. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
13. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y., Khan A.I., Li S., Thierer J.H., Bailey J., Kreisel K., Tacket C.O., LaRocque R.C., Harris J.B., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B., Stine O.C. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2010; 192(17):4367–76. DOI: 10.1128/JB.00698-10.
14. O'Sullivan M.V.N., Sintchenko V., Gilbert G.L. Quantitative Estimation of the Stability of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain-Typing Systems by Use of Kaplan-Meier Survival Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1):112–16. DOI: 10.1128/JCM.01406-12.
15. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic

Vibrio cholerae from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

References

1. Bel'sky V.A., Kalutsky P.V., Kiseleva V.V., Shatalova E.V., Zakaryan L.M. [Heterogeneity of Bacterial Populations]. M.: Medical News-Agency; 2008. 160 p.
2. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, identified via computerized analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya*. 2001; 6:85–8.
3. Krasil'nikov A.P., Romanovskaya T.R. [Microbiological Glossary]. Minsk: Asar; 1999. 397 p.
4. Kul'shan' T.V., Toporkov A.V., Smirnova N.I. [Genetic Changes of Virulent *Vibrio cholerae* El Tor Biovar Strains Living in Water Environment]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 1:41–4.
5. Kul'shan' T.V., Zаднова S.P., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. [Evaluation of functional peculiarities and stress-resistance in isogenic toxigenic and non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae*, biovar El Tor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2015; 3:11–7.
6. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Kozhevnikova A.S., Polovinkina V.S., Kulikalova E.S., Afanas'ev M.V. [Molecular-genetic analysis of imported epidemically hazardous *Vibrio cholerae* eltor strains, isolated in Siberian and Far East regions of Russia]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2012; 2:13–20.
7. Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Basov E.A., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. [Retrospective macro-restriction analysis of *Vibrio cholerae* eltor strains, isolated in the period epidemic complications in the Far East region of Russia]. *Mol. Genet. Microbiol. Virusol.* 2014; 2:29–36.
8. Ravin N.V., Shestakov S.V. [Genome of prokaryotic microorganisms]. *Vavilovskiy Zh. Genet. Selektii*. 2013; 17(4/2):972–84.
9. Smirnov G.B. [Mechanisms of acquisition and loss of genetic information by bacterial genomes]. *Uspekhi Sovrem. Biol.* 2008; 128(1):52–76.
10. Andersson D.I., Hughes D. Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 2009; 43:167–95. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134805.
11. Barua H., Lindblom I.L., Bisgaard M., Christensen J.P., Olsen R.H., Christensen H. *In vitro* and *in vivo* investigation on genomic stability of *Salmonella enterica* Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark. *Vet. Microbiol.* 2013; 166:607–16. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.035.
12. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel «persister» phenotype. *PLoS One*. 2012; 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
13. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y., Khan A.I., Li S., Thierer J.H., Bailey J., Kreisel K., Tacket C.O., LaRocque R.C., Harris J.B., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B., Stine O.C. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *J. Bacteriol.* 2010; 192(17):4367–76. DOI: 10.1128/JB.00698-10.
14. O'Sullivan M.V.N., Sintchenko V., Gilbert G.L. Quantitative Estimation of the Stability of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain-Typing Systems by Use of Kaplan-Meier Survival Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(1):112–16. DOI: 10.1128/JCM.01406-12.
15. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

Authors:

Mironova L.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Mitkeeva S.K., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Миронова Л.В., Хункеева Ж.Ю., Басов Е.А., Пономарева А.С., Миткеева С.К., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 13.01.16.

Е.В.Молчанова, Я.А.Лопастейская, А.В.Незнамова, Ю.А.Кузютина, Н.П.Агеева, И.Б.Захарова,
Д.В.Викторов, А.В.Топорков

ОСОБЕННОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* С ПОМОЩЬЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА VITEK 2 COMPACT 30

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград,
Российская Федерация

Для идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* в лабораторной практике широко применяется автоматизированная система Vitek 2, основанная на сравнении биохимического профиля исследуемой бактериальной культуры с имеющейся базой данных. **Цель работы.** Проведение расширенной фенотипической характеристики штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, поддерживаемых в коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» и анализа вариаций их биохимических профилей с использованием системы Vitek 2. **Материалы и методы.** С помощью Vitek 2 (bioMérieux, Франция) проанализированы биохимические свойства 52 коллекционных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выращенных на L-агаре (Difco, США) и триптиказо-соевом агаре – TSA (HiMedia, Индия). **Выводы и результаты.** Большинство исследованных штаммов (31 из 40 *B. pseudomallei* и 8 из 12 *B. mallei*) идентифицированы с приемлемой для определения видовой принадлежности вероятностью (90–99 %). Процент правильной идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* был выше при культивировании на L-агаре, чем на TSA. В связи с вариабельностью биохимических признаков, отдельные штаммы показали нетипичные для своего вида результаты по определенным тестам (для штаммов *B. pseudomallei* – отсутствие активности β-N-ацетилглюкозаминидазы, β-N-ацетилгалактозаминидазы и способность к утилизации D-целлобиозы; для штаммов *B. mallei* – отсутствие активности L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы, наличие активности глицинариламидазы, способность к утилизации сахарозы и D-трегалозы), что привело к их неправильной идентификации. Вероятность ошибочной диагностики микроорганизмов рода *Burkholderia* диктует необходимость дополнения идентификационной базы бактериологического анализатора Vitek 2 данными по биохимическим характеристикам штаммов, имеющих особенности в профиле.

Ключевые слова: идентификация, *Burkholderia*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, Vitek 2.

Корреспондирующий автор: Молчанова Елена Владимировна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

E.V.Molchanova, Ya.A.Lopasteiskaya, A.V.Neznamova, Yu.A.Kuzyutina, N.P.Ageeva, I.B.Zakharova,
D.V.Viktorov, A.V.Toporkov

Peculiarities of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* Identification Using Microbiological Analyzer Vitek 2 Compact 30

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Automated Vitek 2 system, based on comparison of a biochemical profile of the studied bacterial cultures with the existing database, is widely used for *B. pseudomallei* and *B. mallei* identification in the laboratory practice. **Objective** of the study is to conduct extended phenotypic characterization of the strains of glanders and melioidosis causative agents, stored in the biobank of the Volgograd Research Anti-Plague Institute and analyze variations in their biochemical profiles, using Vitek 2 system. **Materials and methods.** Using Vitek 2 device, (bioMérieux, France) analyzed have been biochemical properties of 52 collection strains of *B. pseudomallei* and *B. mallei* grown on L-agar (Difco, USA) and trypticase-soy agar – TSA (HiMedia, India). **Results and discussion.** Most of the investigated strains (31 out of 40 *B. pseudomallei* and 8 of 12 *B. mallei*) have been identified with an acceptable probability for determining certain specie appurtenance, amounting to 90–99 %. The percentage of correct identification of *B. pseudomallei* and *B. mallei* is higher when strains are cultured on L-agar, than when on TSA. Due to the variability of the biochemical features, some strains have showed non-typical for its species results in certain tests (for *B. pseudomallei* strains – the absence of enzyme activity of β-N-acetyl-glucosaminidase, β-N-acetyl-galactosaminidase and ability to utilize D-cellobiose; for *B. mallei* strains – the absence of enzyme activity of L-proline-aryl-amidase and tyrosin-aryl-amidase, existence of glycine-aryl-amidase activity and ability to utilize sucrose, D-trehalose), which has led to their mal-identification. The probability of error diagnostics of microorganisms belonging to *Burkholderia* species necessitates up-dating of the database built into Vitek 2 analyzer as regards biochemical characteristics of the strains which have peculiar profiles.

Key words: identification, *Burkholderia*, *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, Vitek 2 analyzer.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Molchanova, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Molchanova E.V., Lopasteiskaya Ya.A., Neznamova A.V., Kuzyutina Yu.A., Ageeva N.P., Zakharova I.B., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Peculiarities of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* Identification Using Microbiological Analyzer Vitek 2 Compact 30. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:57–61. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-57-61

B. mallei и *B. pseudomallei* относятся ко II группе патогенности (опасности) и являются потенциальными агентами биотерроризма группы В [5]. Сап (возбудитель *B. mallei*) – зоонозная антропоургическая инфекция, регистрируемая в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Китае, Индии, Индонезии, Филиппинах [12]. Случаи заражения человека связаны с профессиональной деятельностью: ветеринары, мясники, сотрудники лабораторий, дрессировщики лошадей. *B. pseudomallei* (возбудитель мелиоидоза) входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. Эндемичными по мелиоидозу странами в настоящее время считаются Индия, Шри-Ланка, Филиппины, Индонезия, Таиланд, Сингапур, Вьетнам, Малайзия, Бирма, Бразилия, Пуэрто-Рико и Австралия. В США, Карибской области, Тихоокеанском регионе, Африке, Иране зарегистрированы спорадические случаи этой болезни у людей, прибывших с эндемичных территорий [2].

Мелиоидоз и сап у людей нередко протекают в тяжелой форме и трудно поддаются лечению. Своеобразие мелиоидоза определяется оппортунистическим характером инфекции, которая может длительное время не проявлять себя и быстро развиться до пневмонии и септицемии (летальность более 90 %) при снижении иммунитета, травмах, диабете, хронической патологии почек, ретровирусной инфекции и при гормональной терапии [3]. Однако даже при активном лечении рекомендованными химиотерапевтическими препаратами не исключена возможность рецидивов, которые могут возникать в течение ряда последующих лет [11].

Поэтому быстрая и точная идентификация возбудителей этих болезней необходима для определения средств терапии и выбора надлежащего курса специфического лечения.

Последние 10–15 лет в лабораторной практике идентификацию бактерий по биохимической активности (ферментации, ассимиляции, оксидации, деградации и гидролиза) проводят с помощью автоматических и полуавтоматических диагностических систем, одной из которых является Vitek 2 (bioMérieux). Авторы ряда работ указывают, что клинические изоляты возбудителя мелиоидоза бактериологический анализатор Vitek 2 в некоторых случаях идентифицирует как виды комплекса *Burkholderia cepacia*, что связано со спецификой биохимического профиля отдельных штаммов возбудителя мелиоидоза [4, 7, 10, 14]. Ошибочная диагностика приводит к неправильному лечению, что обуславливает высокую вероятность летального исхода.

На базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» функционирует «Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза» – координирующий, консультативно-методический, учебный, диагностический и экспертный орган по вопросам индикации и экспресс-диагностики *B. pseudomallei* и *B. mallei* на территории Российской Федерации, одной из задач

которого является совершенствование схем лабораторной диагностики данных инфекций и апробация современных диагностических тестов, используемых в системах полу- и автоматической идентификации микроорганизмов.

Целью работы было проведение расширенной фенотипической характеристики штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, поддерживаемых в коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», и анализ вариаций их биохимических профилей с использованием системы Vitek 2.

Материалы и методы

В работе использованы 52 коллекционных штамма *B. pseudomallei* и *B. mallei* (табл. 1, 2). Штаммы микроорганизмов выращивали на L-агаре (Difco, США) и триптиказо-соевом агаре – TCA (HiMedia, Индия) при температуре 37 °C.

Из 18-часовых культур готовили суспензию 0,5–0,63 плотности по МакФарланду согласно инструкции производителя bioMérieux для заполнения NG карт, предназначенных для автоматической идентификации клинически значимых ферментирующих и неферментирующих грамотрицательных палочек. Карты содержали 47 биохимических тестов с лиофилизированными биохимическими субстратами и необходимыми реагентами, позволяющими оценить утилизацию углеводов, ферментативную активность и устойчивость к ингибиторам. Лабораторный отчет содержал четкий окончательный ответ (единственный выбор) при степени соответствия биохимической активности идентифицируемой культуры профилю штамма-эталона на 85–99 %. Если биохимический профиль исследуемого образца не соответствовал ни одному из имеющихся в базе данных, лабораторный отчет системы содержал сообщение о невозможности идентификации. Время идентификации микроорганизмов не превышало 4–6 ч.

Результаты и обсуждение

Большинство из исследованных штаммов возбудителя мелиоидоза (31 из 40) имели типичный биохимический профиль и были идентифицированы анализатором как *B. pseudomallei* с вероятностью 90–99 %. Оставшиеся 9 штаммов (*B. pseudomallei* 99, 100, 102, 103, 107, 130, 135, 138, 60839) отличались нехарактерными для данного вида микроорганизма биохимическими свойствами, такими как отсутствие активности β-N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) и β-N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) и способность к утилизации D-целлобиозы. Перечисленные биохимические особенности отразились в неправильной идентификации ряда штаммов, которые были отнесены системой Vitek 2 либо к *Burkholderia cepacia group* (4 штамма), либо к роду *Burkholderia* (5 штаммов) с возможностью определения видовой

Таблица 1

Результаты идентификация коллекционных штаммов *B. pseudomallei*

Международный номер или авторское обозначение штамма	Место выделения	Источник выделения	Система Vitek 2			
			Вероятность идентификации, %, вид	Тесты с нетипичным результатом		
				dCEL	NAGA	BNAG
1	Вьетнам	Больной человек	98 <i>B. pseudomallei</i>	+	+	+
2	Вьетнам	«	97 <i>B. pseudomallei</i>	+	-	+
Tchad 97	Нет данных	Нет данных	99 <i>B. pseudomallei</i>	-	+	+
Iran Terre 98	«	«	93 <i>B. pseudomallei</i>	+	-	-
Niamay 99	«	«	<85 <i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	-	+
Dalat 100	«	«	<85 <i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	+	-
Shigan 102	«	«	<85 <i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	-	-
Cheval du. jardin 103	«	«	<85 <i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	-	-
PJ 54 107	«	«	<85 <i>B. cepacia</i>	-	-	+
Ward 108, Roos 109, Pearce 110, Mahen 111, Coopek 112, Skanmandri 113, Snider 114	Австралия	Больной человек	90–99 <i>B. pseudomallei</i>	-/+	-/+	+
Soil isolate 12 115	«	Почва	96 <i>B. pseudomallei</i>	-	-	+
Soil isolate 13 116	«	«	98 <i>B. pseudomallei</i>	+	+	+
Goat isolate 17 117	«	Коза	98 <i>B. pseudomallei</i>	+	+	+
128	«	Нет данных	99 <i>B. pseudomallei</i>	-	+	+
130	«	«	<85 <i>B. cepacia</i>	+	-	+
131, 132, 133, 134, 136, 137	Таиланд	Больной человек	97–99 <i>B. pseudomallei</i>	-/+	+	+
135	«	«	<85 <i>B. cepacia</i> / <i>B. pseudomallei</i>	+	-	+
138	«	«	<85 <i>B. cepacia</i>	+	-	-
139	«	«	96 <i>B. pseudomallei</i>	+	+	-
C-141(CIP6068), 56770, 56812, 57582, 59437, 60631, 60806, 611083	Вьетнам, Сайгон	Больной человек	95–99 <i>B. pseudomallei</i>	-/+	-/+	+
56830	«	«	98 <i>B. pseudomallei</i>	-	-	-
60839	«	«	<85 <i>B. cepacia</i>	+	-	+

Примечания: dCEL – D-целлобиоза, NAGA – β-N-ацетилгалактозоминадаза, BNAG – β-N-ацетилглюкозоминадаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат теста; «-» – отрицательная реакция, «+» – положительная реакция.

принадлежности микроорганизма с помощью дополнительных дифференциальных тестов (табл. 1).

Из 12 штаммов возбудителя сапа 8 обладали стандартными биохимическими свойствами и идентифицированы как вид *B. mallei* с вероятностью 90–99 % (табл. 2). Оставшиеся четыре штамма из-за наличия в биохимическом профиле нетипичных результатов пяти тестов (способность к утилизации сахарозы и D-трегалозы, отсутствие активности L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы, нали-

чие глицинариламидазной активности) система Vitek 2 отнесла одновременно к двум микроорганизмам – *Sphingomonas paucimobilis* и *B. mallei* – с предложением использования дополнительных тестов для их дифференциации.

В нашем исследовании использование автоматического анализатора Vitek 2 позволило правильно идентифицировать две трети штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, хранящихся в коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский

Результаты идентификации коллекционных штаммов *B. mallei*

Международный номер или авторское обозначение штамма	Место выделения	Система Vitek 2					
		Вероятность идентификации, %, вид	Тесты с нетипичным результатом				
			SAC	dTRE	ProA	TyrA	GlyA
Ц-5	Монголия	<85 <i>S. paucimobilis</i> / <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
«Иванович»	Югославия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	+	+	-
«Будапешт»	Венгрия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	-	-
P-1	Югославия	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
11	Польша	95 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
Z-12	Югославия	<85 <i>S. paucimobilis</i> / <i>B. mallei</i>	+	-	+	+	-
8	Нет данных	96 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
B-120	Улан-Удэ	<85 <i>S. paucimobilis</i>	+	-	-	-	-
Bogor-37	Индонезия	90 <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
Muksuwar-11	Индия	91 <i>B. mallei</i>	+	+	+	+	+
5584	Нет данных	99 <i>B. mallei</i>	-	-	-	+	-
«Zagreb»	Югославия	<85 <i>S. paucimobilis</i> / <i>B. mallei</i>	+	+	-	-	-

Примечания: SAC – сахароза, dTRE – D-трегалоза, ProA – L-пролинариламидаза, TyrA – тирозинариламидаза, GlyA – глицинариламидаза; серый цвет ячеек – нетипичный результат; «-» – отрицательная реакция, «+» – положительная реакция.

противочумный институт». Однако четыре штамма *B. pseudomallei* и один *B. mallei* определены ложно как микроорганизмы комплекса *B. ceracia* и *S. paucimobilis* соответственно. Именно эти штаммы характеризовались нетипичными результатами тестов BNAG(-), NAGA(-) и dCEL(+) – для штаммов возбудителя мелиоидоза и SAC(+), dTRE(+), ProA(-), TyrA(-), GlyA(+) – для *B. mallei*. Результаты нашего исследования согласуются с литературными данными о случаях ошибочной идентификации изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei* при использовании автоматической системы Vitek 2 в различных клинических лабораториях [4, 7, 14]. Так, Y.Podin *et al.* отмечали аналогичную закономерность: отрицательные результаты тестов β-N-ацетилглюкозаминидазы (BNAG) и β-N-ацетилгалактозаминидазы (NAGA) у изолятов *B. pseudomallei*, как правило, приводили к их ложной идентификации как микроорганизмов комплекса *B. ceracia* [10]. Также описаны случаи ложной лабораторной диагностики с помощью Vitek 2 возбудителя сапа как видов *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* [6].

β-N-ацетилглюкозаминидаза и β-N-ацетилгалактозаминидаза – ферменты, субстратами для которых являются структурные компоненты экзополисахарида бактерий: поли-β-(1-6)-N-ацетилглюкозамин (PNAG) и N-ацетилгалактозамин [13]. При этом PNAG, как известно, является важным элементом в формировании биопленок у многих видов *Burkholderia* и играет

определенную роль в образовании множественной лекарственной резистентности микроорганизмов [9]. N-ацетилгалактозамин также входит в состав экзополисахарида *B. pseudomallei* в качестве одного из основных компонентов [9].

Ранее нами показано наличие фитопатогенных свойств различной степени выраженности у коллекционных штаммов *B. pseudomallei*: инфицирование листовых пластинок *Pereskia aculeata* приводило к их быстрой мацерации и изъязвлению, что косвенно указывало на наличие целлюлазной активности [1]. Анализ активности фермента целлюлазы (β-глюкозидазы), катализирующей гидролиз гликозидной связи между двумя остатками глюкозы в молекуле целлюлозы показал, что этот биохимический показатель у штаммов *B. pseudomallei* является вариабельным. Интересно, что данная активность присуща, в первую очередь, фитопатогенным бактериям, так как целлюлаза в синергизме с целлюлазой выполняют существенную роль в ферментативном разрушении оболочек растительных клеток. Возможно, что нестабильность данного признака также может влиять на достоверность идентификации возбудителя мелиоидоза.

Производители системы Vitek 2 рекомендуют в качестве среды выращивания для идентификации грам-отрицательных микроорганизмов триптиказо-соевый агар (TCA). Однако, по нашим данным, процент правильной идентификации штам-

мов *B. pseudomallei* и *B. mallei* был выше при выращивании на L-агаре, чем на TCA. Зависимость результатов идентификации клинических изолятов *B. pseudomallei* с помощью Vitek 2 от среды культивирования ранее показана P.Lowe *et al.*: наиболее высокий процент правильной идентификации наблюдался при использовании кровяного агара (Colombia horse blood agar), а наименьший – агара Мак-Конки. Авторы отмечают, что при диагностике микроорганизмов, выросших на TCA, процент их корректного видового определения был средним [8].

За последнее десятилетие информационная база системы Vitek 2 расширена внесением в нее биохимических профилей штаммов *B. pseudomallei*, отличных от классического [6]. Это существенно повысило точность идентификации клинических изолятов с помощью данного прибора, однако вероятность ошибок не исключена, о чем говорят литературные данные и полученные нами результаты. Так, часть исследованных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» обладала довольно вариabельным спектром биохимических признаков и характеризовалась нетипичными результатами тестов BNAG(-), NAGA(-) и dCEL(+) – для штаммов возбудителя мелиоидоза и SAC(+), dTRE(+), ProA(-), TugA(-), GlyA(+) – для штаммов *B. mallei*.

Таким образом, при автоматизированной идентификации клинического грамотрицательно-неферментирующего изолята как *B. cepacia* или *S. paucimobilis* необходимо принимать во внимание возможность ошибки определения видовой принадлежности. Поэтому, для идентификации возбудителя следует учитывать данные эпидемиологического анамнеза и верифицировать результат молекулярно-генетическими и иммунологическими методами.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молчанова Е.В., Агеева Н.П. Использование фитопатогенного эффекта для изучения вирулентности *Burkholderia*. *Бюл. эксп. биол. мед.* 2014; 158(10):522–5.
2. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1):S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.
3. Dance D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta Tropica.* 2000; 74:115–9. DOI: 10.1016/S0001-706X(99)00059-5.
4. Deepak R.N., Crawley B., Phang E. *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and Vitek 2 GN systems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1):S42–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70012-9.
5. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., Schwartz D., Amsalem Y. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.* 2007; 9:499–503.
6. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007; 3(3):144–52.
7. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N., Kaewdaeng S. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 59:277–81. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.013.

8. Lowe P., Haswell H., Lewis K. Use of various common isolation media to evaluate the new Vitek 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:854–6. DOI: 10.1128/JCM.44.3.854-856.2006.
9. Masoud H., Ho M., Schollaardt T., Perry M.B. Characterization of the capsular polysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* 304b. *J. Bacteriol.* 1997; 179(18):5663–9.
10. Podin Y., Kaestli M., McMahon N., Hennessy J., Ngian H.U., Wong J.S., Mohana A., Wong S.C., William T., Mayo M., Baird R.W., Currie B.J. Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(9):3076. DOI: 10.1128/JCM.01290-13.
11. Puthucherry S.D., Vadivelu J. Human melioidosis. Singapore: Singapore University Press; 2002. 58 p.
12. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013; 8:131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
13. Yakandawala N., Gawande P.V., LoVetri K., Cardona S.T., Romeo T., Nitz M., Madhyastha S. Characterization of the poly-1,6-Nacetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(23):8303–9. DOI: 10.1128/AEM.05814-11.
14. Zong Z., Wang X., Deng Y., Zhou T. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the Vitek 2 system. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61:1483–4. DOI: 10.1099/jmm.0.041525-0.

References

1. Molchanova E.V., Ageeva N.P. [Utilization of phyto-pathogenic effect for studies of *Burkholderia* virulence]. *Byul. Eksp. Biol. Med.* 2014; 158(10):522–5.
2. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1):S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.
3. Dance D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta Tropica.* 2000; 74:115–9. DOI: 10.1016/S0001-706X(99)00059-5.
4. Deepak R.N., Crawley B., Phang E. *Burkholderia pseudomallei* identification: a comparison between the API 20NE and Vitek 2 GN systems. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102(1):S42–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70012-9.
5. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T., Schwartz D., Amsalem Y. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *Isr. Med. Assoc. J.* 2007; 9:499–503.
6. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. Biomed. Sci.* 2007; 3(3):144–52.
7. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N., Kaewdaeng S. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 59:277–81. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.013.
8. Lowe P., Haswell H., Lewis K. Use of various common isolation media to evaluate the new Vitek 2 colorimetric GN card for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:854–6. DOI: 10.1128/JCM.44.3.854-856.2006.
9. Masoud H., Ho M., Schollaardt T., Perry M.B. Characterization of the capsular polysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* 304b. *J. Bacteriol.* 1997; 179(18):5663–9.
10. Podin Y., Kaestli M., McMahon N., Hennessy J., Ngian H.U., Wong J.S., Mohana A., Wong S.C., William T., Mayo M., Baird R.W., Currie B.J. Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(9):3076. DOI: 10.1128/JCM.01290-13.
11. Puthucherry S.D., Vadivelu J. Human melioidosis. Singapore: Singapore University Press; 2002. 58 p.
12. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013; 8:131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
13. Yakandawala N., Gawande P.V., LoVetri K., Cardona S.T., Romeo T., Nitz M., Madhyastha S. Characterization of the poly-1,6-Nacetylglucosamine polysaccharide component of *Burkholderia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(23):8303–9. DOI: 10.1128/AEM.05814-11.
14. Zong Z., Wang X., Deng Y., Zhou T. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the Vitek 2 system. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61:1483–4. DOI: 10.1099/jmm.0.041525-0.

Authors:

Molchanova E.V., Lopasteiskaya Ya.A., Neznamova A.V., Kuzjutina Yu.A., Ageeva N.P., Zakharova I.B., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Незнамова А.В., Кузюткина Ю.А., Агеева Н.П., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 04.07.16.

Е.В.Найденова¹, С.А.Пьянков², А.А.Крицкий¹, Ж.А.Касьян¹, А.С.Раздорский¹, А.А.Лопатин¹,
В.А.Сафронов¹, Е.В.Чайсов², А.Л.Сыла³, S.Boumbaly⁴, N.Ibrachim⁴, M.G.Diallo⁴, I.S.Sow⁴, M.Barry⁴,
С.А.Щербакова¹, М.И.Боиро⁴, В.В.Кутырев¹

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К АРБОВИРУСАМ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЛЮДЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ В ПРОВИНЦИИ КИНДИЯ, ГВИНЕЙСКАЯ РЕСПУБЛИКА

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл., Российская Федерация; ³Научный клинико-диагностический центр эпидемиологии и микробиологии, Киндия, Гвинейская Республика; ⁴Исследовательский институт прикладной биологии, Киндия, Гвинейская Республика

Цель работы. Данная работа проведена с целью выявления специфических антител к вирусам Западного Нила, денге, ККГЛ и Чикунгунья в сыворотках крови людей – жителей провинции Киндия Гвинейской Республики. **Материалы и методы.** Полученные сыворотки исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител класса IgG к вирусам денге, Западного Нила, ККГЛ и Чикунгунья. **Выводы и результаты.** В результате работы выявлено 267 (82 %) положительных образцов из 326, которые содержали иммуноглобулины класса G к этим арбовирусам. Полученные данные указывают на активную циркуляцию возбудителей лихорадок денге и Западного Нила на данной территории. Показана необходимость дальнейшего изучения как иммунной прослойки населения, так и возможных носителей и переносчиков арбовирусов с целью оптимизации подходов к проведению профилактических (противоэпидемических) мероприятий.

Ключевые слова: арбовирусы, Гвинейская Республика, иммунная прослойка, антитела классов M и G, лихорадка Западного Нила, лихорадка денге, лихорадка Чикунгунья, Крымская геморрагическая лихорадка.

Корреспондирующий автор: Екатерина Владимировна Найденова, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Naydenova¹, S.A.P'yankov², A.A.Kritsky¹, Zh.A.Kas'an¹, A.S.Razdorsky¹, A.A.Lopatin¹,
V.A.Safronov¹, E.V.Chausov², A.L.Sylla³, S.Boumbaly⁴, N.Ibrachim⁴, M.G.Diallo⁴, I.S.Sow⁴, M.Barry⁴,
S.A.Shcherbakova¹, M.I.Boiro⁴, V.V.Kutyrev¹

Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of Persons Residing in Kindia Province, the Republic of Guinea

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; ³Scientific Clinical and Diagnostic Center of Epidemiology and Microbiology, Kindia, the Republic of Guinea; ⁴Research Institute of Applied Biology, Kindia, the Republic of Guinea

The aim of the work was to detect specific antibodies to West Nile, dengue, CCHF, and chikungunya viruses in blood sera of Guinean Kindia Province residents. **Materials and methods.** The obtained sera were analyzed in ELISA to discover IgG antibodies to abovementioned viruses. **Results and conclusions.** Detected were 267 (82 %) positive samples out of 326, containing immunoglobulins of G class to these arboviruses. The obtained data provide evidence for active circulation of dengue and West Nile fever agents in this territory. Further studies of immune strata of the population, and possible carriers and vectors of arboviruses were demonstrated to be advisable for optimization of approaches to prophylactic (anti-epidemic) measures implementation.

Key words: arboviruses, the Republic of Guinea, immune stratum, antibodies of M and G classes, West Nile fever, dengue fever, chikungunya fever, Crimean hemorrhagic fever.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Ekaterina V. Naydenova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Naydenova E.V., P'yankov S.A., Kritsky A.A., Kas'an Zh.A., Razdorsky A.S., Lopatin A.A., Safronov V.A., Chausov E.V., Sylla A.L., Boumbaly S., Ibrachim N., Diallo M.G., Sow I.S., Barry M., Shcherbakova S.A., Boiro M.I., Kutyrev V.V. Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of Persons Residing in Kindia Province, the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:62–65. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-62-65

По материалам ВОЗ, от острых лихорадочных болезней в странах Западной Африки ежегодно погибают более 250 тыс. человек [10]. Причем значительную долю в нозологической структуре регистрируемых лихорадок традиционно составляют малярия и брюшной тиф. Указанные цифры, тем не менее, не отражают всей полноты конъюнктуры заболеваемости в Западноафриканском регионе в связи с тем, что в качестве критериев постановки диагноза в боль-

шинстве случаев используются только клинические данные [8]. С начала 2014 г. на фоне эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), зарегистрированной на территории Гвинейской Республики, Либерии и Сьерра-Леоне, и при привлечении международных ресурсов уровень лабораторной диагностики значительно повысился [2, 3]. Но, несмотря на отработанную схему индикации отдельных возбудителей инфекционных болезней, часто регистрируются

случаи заболевания, этиологический агент которых не установлен. Возможно это связано с отсутствием достаточного объема знаний медицинского персонала в отношении других инфекций и ограниченным набором диагностических тест-систем. При этом существует вероятность того, что определенное количество лихорадочных болезней вызвано арбовирусами, которые зачастую не рассматриваются в качестве возможного инфекционного агента [9].

На территории Гвинейской Республики в разные годы выявлена циркуляция большого спектра арбовирусов: денге, желтой лихорадки, Западного Нила, Зика (сем. *Flaviviridae*), Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), лихорадки долины Рифт, Батаи (сем. *Bunyaviridae*), Чикунгунья (сем. *Alphaviridae*), которые способны вызывать лихорадочные болезни и гибель людей [1, 6]. Маркеры арбовирусов ранее обнаружены в материале от носителей и переносчиков, отловленных в разных географических зонах Гвинейской Республики [1]. Одним из ключевых показателей циркуляции арбовирусов на определенной территории и наличия природных очагов арбовирусных инфекционных болезней является выявление антител к возбудителю в сыворотках крови людей, проживающих в данной местности [4].

В настоящее время в связи с ограниченными возможностями лабораторной диагностики и недостаточным уровнем научных данных о распространении арбовирусов в Западной Африке отсутствуют достоверные и актуальные сведения по заболеваемости арбовирусными инфекционными болезнями среди населения.

Целью работы явилось изучение уровня иммунной прослойки населения к возбудителям лихорадок денге, Западного Нила, Чикунгунья и КГЛ среди жителей провинции Киндия Гвинейской Республики.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе Института Пастера Гвинеи и стационарного инфекционного госпиталя НКДЦЭМ ОК РУСАЛ (CREMS). Диагностическую работу осуществляли российские специалисты с использованием мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора (МК СПЭБ Роспотребнадзора) [3].

Образцы крови людей собраны в период с мая 2015 по февраль 2016 года от больных с симптомами, исключающими арбовирусную этиологию и без подозрения на БВВЭ, а так же от работников госпиталя НКДЦЭМ. Кровь забирали в количестве 5 мл из локтевой вены, натошак, с использованием системы для забора крови по общепринятой методике. Все полученные образцы протестированы методом ОТ-ПЦР с помощью набора реагентов «АмплиСенс EBOV Zaire-FL» (регистрационное удостоверение РЗН2014/2036 от 16.10.2014, ООО «Интерлабсервис», Россия) для исключения вероятности выявления

РНК вируса Эбола. Во всех случаях результат был отрицательным. Сыворотки также исследованы методом иммунохроматографического анализа (ИХА) с использованием набора реагентов для определения антигенов возбудителей малярии Malaria Ag P.f/ Pan («SD BIOLANE», Южная Корея). Образцы, содержащие антиген малярийного плазмодия, исключили из дальнейшего исследования с целью снижения вероятности неспецифических реакций.

Клинический материал на всех этапах исследования расценивался как потенциально опасный в связи с тем, что на территории Гвинеи регистрируются случаи болезни, вызванные вирусом Ласса [5, 7]. Работа с материалом проводилась в боксе микробиологической безопасности 3-го класса.

Полученные сыворотки исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител класса IgG к вирусам денге, Западного Нила, ККГЛ и Чикунгунья. Образцы тестировали с использованием коммерческих наборов производства ЗАО «Биосервис» (Боровск, Россия) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к препаратам. Оптическую плотность измеряли с основным фильтром 450 нм. Для подтверждения полученных результатов и исключения возможности неспецифической реакции все сыворотки дополнительно исследовали методом ИФА на наличие иммуноглобулинов класса IgM к вирусам денге, Западного Нила, ККГЛ и Чикунгунья с применением наборов того же производителя.

Для исследования отобрано 326 образцов крови жителей Киндии Гвинейской Республики, 183 (56,1 %) из них взяты у женщин, а 143 (43,9 %) – у мужчин.

С целью обеспечения репрезентативности выборки жителей региона, для исследования выбирались сыворотки от людей различных возрастов в пропорциях, соответствующих естественному демографическому распределению в Гвинейской Республике. Исключение составила группа до 15 лет в связи с отсутствием достаточного количества проб от лиц данного возраста.

Наибольшее количество образцов принадлежало людям в возрасте от 15 до 25 лет – 87 сывороток и от 25 до 35–76 (26,7 и 23,3 % соответственно). Меньше всего исследуемых проб было в группе от 75 лет – 8 (2,5 %). Данные о принадлежности жителей к возрастной группе и полу, представленных в настоящем исследовании, приведены в табл. 1.

Результаты и обсуждение

Всего во время исследований выявлено 267 (82 % от общего количества исследуемых образцов) положительных образцов. Самое большое количество сывороток содержали антитела класса G к вирусам денге (133 образца, что составило 40,7 % от общего числа исследованных проб). Антитела к вирусу Западного Нила выявлены в 120 (36,8 %) про-

Таблица 1

Характеристика исследуемого контингента

Возрастные группы	Количество проб		Общее количество (%)*
	мужчины	женщины	
до 15	11	15	26 (7,9)
от 15 до 25	28	59	87 (26,7)
от 25 до 35	36	40	76 (23,3)
от 35 до 45	21	21	42 (12,9)
от 45 до 55	19	19	38 (11,7)
от 55 до 65	12	18	30 (9,2)
от 65 до 75	11	8	19 (5,8)
от 75	5	3	8 (2,5)
Итого:	143 (43,9 %)	183 (56,1 %)	326

*Проценты указаны от общего количества исследуемых образцов.

бах. В 12 (3,7 %) случаях зарегистрированы антитела к вирусу Чикунгунья и в 2 (0,6 %) – к вирусу ККГЛ (табл. 2).

Положительные результаты, в большинстве случаев, получены при исследовании материала, собранного от людей в возрасте от 25 до 35 лет. Антитела к арбовирусам содержали 74 (22,7 %) образца из 76 обследованных, из них к вирусу Западного Нила – 33 (10,1 %) образца, к вирусам денге – 37 (11,3 %), Чикунгунья – 3 (0,9 %) и ККГЛ – 1 (0,3 %). Наименьшее количество позитивных проб зарегистрировано при исследовании материала от людей, отнесенных к возрастной группе после 75 лет. Общий уровень иммунной прослойки к арбовирусам в данной возрастной группе составил 2,5 %.

Антитела к арбовирусам содержали 154 (47,2 %) из 183 сывороток у женщин и 113 (34,7 %) из 143 – у мужчин. Достоверного отличия по уровню иммунной прослойки среди мужчин и женщин не отмечено.

При исследовании образцов сывороток крови с целью обнаружения антител класса IgM к вирусам

денге, Западного Нила, Чикунгунья и ККГЛ во всех случаях получены отрицательные результаты, что позволяет исключить острую фазу болезни и свидетельствует об отсутствии неспецифических ответов, а также косвенно подтверждает правильность полученных результатов.

При анализе иммунной прослойки у жителей городов или сельской местности выявлено относительно равномерное распределение (47,8 и 52,2 % соответственно), что не характерно для арбовирусных инфекционных болезней и может явиться следствием высокой миграционной активности в Западноафриканском регионе.

Выявление 82 % положительных образцов, преимущественно отобранных от людей в возрастной группе от 25 до 35 лет (т.е. наиболее социально активный возраст) в целом соответствует аналогичным показателям проводимых ранее в Западной Африке исследований [6].

Таким образом, полученные данные указывают на наличие иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к арбовирусным инфекциям, что является подтверждением циркуляции на территории страны вирусов Западного Нила, денге и Чикунгунья. Кроме того, выявление единичных образцов, содержащих антитела класса IgG к вирусу ККГЛ, также свидетельствует о возможной циркуляции этого возбудителя на данной территории.

Учитывая большую эпидемиологическую значимость арбовирусных инфекционных болезней, актуальной задачей является продолжение изучения вопроса о доле арбовирусов в структуре лихорадочных заболеваний на территории Гвинейской Республики. Также необходимо проведение эпизоотологического мониторинга для выявления носителей и переносчиков арбовирусов на данной территории с целью установления природной очаговости, что, в свою очередь, позволит усовершенствовать и повысить эффективность профилактических (противоэпидемических) мероприятий.

Таблица 2

Выявление антител к арбовирусам в сыворотках крови жителей провинции Киинда Гвинейской Республики

Возрастные группы	Количество проб, содержащих антитела класса IgG к вирусам:												Кол-во положительных проб (%)*
	Западного Нила			денге			Чикунгунья			ККГЛ			
	мужчины	женщины	всего (%)*	мужчины	женщины	всего (%)*	мужчины	женщины	всего (%)*	мужчины	женщины	всего (%)*	
до 15	3	5	8 (2,5)	4	1	5	0	0	0	0	0	0	13 (4,0)
от 15 до 25	5	20	25 (7,7)	5	25	30	1	4	5	0	0	0	60 (18,4)
от 25 до 35	14	19	33 (10,1)	20	17	37 (11,3)	1	2	3 (0,9)	1	0	1 (0,3)	74 (22,7)
от 35 до 45	10	10	20 (6,1)	8	12	20	0	0	0	0	0	0	40 (12,7)
от 45 до 55	8	7	15 (4,6)	10	8	18	2	1	3	0	0	0	36 (11,0)
от 55 до 65	6	6	12 (3,7)	4	8	12	1	0	1	0	0	0	25 (7,7)
от 65 до 75	3	1	4 (1,2)	3	4	7	0	0	0	0	0	0	11(3,4)
от 75	2	1	3 (0,9)	2	2	4 (1,2)	0	0	0	0	1	1 (0,3)	8 (2,5)
Итого:	51	69	120 (36,8)	56	77	133 (40,7)	5	7	12 (3,7)	1	1	2 (0,6)	267 (82,0)

*Проценты указаны от общего количества исследуемых образцов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко А.М. Изучение циркуляции арбовирусов в Гвинейской Республике. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 1996; 2:40–5.
2. Лопатин А.А., Найденова Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Уткин Д.В., Касьян Ж.А., Крицкий А.А., Терновой В.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Демина Ю.В., Хорошилов В.Ю., Попова А.Ю., Кутырев В.В. Изучение сохранения вируса Эбола в биологических жидкостях пациента на поздних стадиях выздоровления. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 3:73–7.
3. Попова А.Ю., Сафронов В.А., Магасуба Н.Ф., Уткин Д.В., Одинокоев Г.Н., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Куклев В.Е., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Никифоров К.А., Щербакова С.А., Терновой В.А., Агафонов А.П., Михеев В.Н., Кутырев В.В. Организация и проведение диагностических исследований на базе мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады в Республике Гвинея в период эпидемии лихорадки Эбола в 2014 году. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:5–8.
4. Титенко А.М. Факторы, способствующие появлению и обнаружению новых вирусных инфекций. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2004; 1:51–5.
5. Fichet-Calvet E., Rogers D.J. Risk Maps of Lassa Fever in West Africa. *PLoS Negl Trop. Dis.* 2009; 3(3):e388. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000388.
6. Jentes E.S., Robinson J., Johnson B.W., Conde I., Sakouougui Y., Iverson J., Beecher S., Bah M.A., Diakite F., Coulibaly M., Bausch D.G., Bryan J. Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(2):388–94. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0688.
7. Klempa B., Koulemou K., Auste B., Emmerich P., Thome-Bolduan C., Gunther S., Koivogui L., Kruger D.H., Fichet-Calvet E. Seroepidemiological study reveals regional co-occurrence of Lassa- and Hantavirus antibodies in Upper Guinea, West Africa. *Trop. Med. Int. Health.* 2013; 18(3):366–71. DOI: 10.1111/tmi.12045.
8. Park S.E., Pak G.D., Aaby P., Adu-Sarkodie Y., Ali M., Aseffa A., Biggs H.M., Bjerregaard-Andersen M., Breiman R.F., Crump J.A., Cruz Espinoza L.M., Eltayeb M.A., Gasmelseed N., Hertz J.T., Im J., Jaeger A., Parfait Kabore L., von Kalckreuth V., Keddy K.H., Konings F., Krumkamp R., MacLennan C.A., Meyer C.G., Montgomery J.M., Ahmed Niang A., Nichols C., Olack B., Panzner U., Park J.K., Rabezanahary H., Rakotozandrindrainy R., Sampo E., Sarpong N., Schütt-Gerowitt H., Sooka A., Soura A.B., Sow A.G., Tall A., Teferi M., Yeshitela B., May J., Wierzba T.F., Clemens J.D., Baker S., Marks F. The relationship between invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, other bacterial bloodstream infections, and malaria in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(1):S.23–31. DOI: 10.1093/cid/civ893.
9. Schoepp R.J., Rossi C.A., Khan S.H., Goba A., Fair J.N. Undiagnosed acute viral febrile illnesses, Sierra Leone. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7):1176–82. DOI: 10.3201/eid2007.131265.
10. WHO. Beyond Ebola, keeping patients and health workers safe. <http://www.who.int/features/2016/ipc-ebola-guinea/en/> (дата обращения 11.05.2016).

References

1. Butenko A.M. Studies on arboviruses circulation in the Republic of Guinea. *Med. Parazitol. i Parazitarn. Bol.* 1996; 2:40–5.
2. Lopatin A.A., Naydenova E.V., Safronov V.A., Razdorskiy A.S., Utkin D.V., Kas'yan Zh.A., Kritskiy A.A., Ternovoy V.A., Nesterov A.E., Sergeev

- A.A., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Demina Yu.V., Khoroshilov V.Yu., Popova A.Yu., Kutyrev V.V. Studies on Ebola virus persistence in the body fluids of a patient at advanced stages of convalescence. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 3:73–7.
3. Popova A.Yu., Safronov V.A., Magasuba N.F., Utkin D.V., Odinokov G.N., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Kulev V.E., Lopatin A.A., Razdorskiy A.S., Nikiforov K.A., Shcherbakova S.A., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Mikheev V.N., Kutyrev V.V. Management and performance of diagnostic investigations on the platform of specialized anti-epidemic team mobile complex during EVD epidemics in 2014 in the Republic of Guinea. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:5–8.
4. Titenko A.M. Factors promoting emerging and detection of new viral infections. *Epidemiol. i Inf. Bol.* 2004; 1:51–5.
5. Fichet-Calvet E., Rogers D.J. Risk Maps of Lassa Fever in West Africa. *PLoS Negl Trop. Dis.* 2009; 3(3):e388. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000388.
6. Jentes E.S., Robinson J., Johnson B.W., Conde I., Sakouougui Y., Iverson J., Beecher S., Bah M.A., Diakite F., Coulibaly M., Bausch D.G., Bryan J. Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(2):388–94. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0688.
7. Klempa B., Koulemou K., Auste B., Emmerich P., Thome-Bolduan C., Gunther S., Koivogui L., Kruger D.H., Fichet-Calvet E. Seroepidemiological study reveals regional co-occurrence of Lassa- and Hantavirus antibodies in Upper Guinea, West Africa. *Trop. Med. Int. Health.* 2013; 18(3):366–71. DOI: 10.1111/tmi.12045.
8. Park S.E., Pak G.D., Aaby P., Adu-Sarkodie Y., Ali M., Aseffa A., Biggs H.M., Bjerregaard-Andersen M., Breiman R.F., Crump J.A., Cruz Espinoza L.M., Eltayeb M.A., Gasmelseed N., Hertz J.T., Im J., Jaeger A., Parfait Kabore L., von Kalckreuth V., Keddy K.H., Konings F., Krumkamp R., MacLennan C.A., Meyer C.G., Montgomery J.M., Ahmed Niang A., Nichols C., Olack B., Panzner U., Park J.K., Rabezanahary H., Rakotozandrindrainy R., Sampo E., Sarpong N., Schütt-Gerowitt H., Sooka A., Soura A.B., Sow A.G., Tall A., Teferi M., Yeshitela B., May J., Wierzba T.F., Clemens J.D., Baker S., Marks F. The relationship between invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, other bacterial bloodstream infections, and malaria in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2016; 62(Suppl 1):S23–31. DOI: 10.1093/cid/civ893.
9. Schoepp R.J., Rossi C.A., Khan S.H., Goba A., Fair J.N. Undiagnosed acute viral febrile illnesses, Sierra Leone. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7):1176–82. DOI: 10.3201/eid2007.131265.
10. WHO. Beyond Ebola, keeping patients and health workers safe. [Cited 11 May 2016]. Available from: <http://www.who.int/features/2016/ipc-ebola-guinea/en/>.

Authors:

- Naydenova E.V., Kritskiy A.A., Kas'an Zh.A., Razdorskiy A.S., Lopatin A.A., Safronov V.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
- P'yankov S.A., Chaurov E.V. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
- Sylla A.L. Scientific Clinical and Diagnostic Center of Epidemiology and Microbiology. Kindia, Republic of Guinea.
- Boumbaly S., Ibrachim N., Diallo M.G., Sow I.S., Barry M., Boiro M.I. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea.

Об авторах:

- Найденова Е.В., Крицкий А.А., Касьян Ж.А., Раздорский А.С., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
- Пьянков С.А., Чаусов Е.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
- Sylla A.L. Научный клинико-диагностический центр эпидемиологии и микробиологии. Гвинейская Республика, Киндия.
- Boumbaly S., Ibrachim N., Diallo M.G., Sow I.S., Barry M., Boiro M.I. Исследовательский институт прикладной биологии. Гвинейская Республика, Киндия.

Поступила 28.07.16.

А.В.Осин, Н.С.Червякова, Т.В.Валова

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СУБЛИМАЦИОННЫХ УСТАНОВКАХ РАЗНОГО ТИПА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЛУЧЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

Цель работы. Оценка возможности применения различных сублимационных установок для лиофилизации патогенных микроорганизмов бактериальной природы и сравнительный анализ качества, полученных с их помощью препаратов коллекционных штаммов. **Материалы и методы.** В качестве контрольных использовали четыре штамма патогенных микроорганизмов, относящихся к разным видам и использующихся в качестве тестовых при проверке качества питательных сред в диагностической деятельности. Их лиофилизацию осуществляли на четырех различных сублимационных аппаратах коллекторного и камерного типов. Качество полученных препаратов лиофилизированных штаммов определяли путем установления жизнеспособности их клеток, а также с помощью ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности). **Результаты и выводы.** Подобраны условия лиофилизации коллекционных тест-штаммов патогенных бактерий III–IV групп патогенности с помощью коллекторных аппаратов нового поколения Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry. Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, полученных на них препаратов штаммов патогенных микроорганизмов с таковыми, лиофилизированными на аппарате системы К.Е.Долинова и программируемой сушилки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D. Установлено, что препараты микроорганизмов, высушенных на различных сублимационных установках, характеризуются высокой жизнеспособностью содержащихся в них бактериальных клеток и прогнозируемым сроком хранения от 4 до 105 лет, в зависимости от вида микроорганизма и типа лиофильной сушилки.

Ключевые слова: коллекционные штаммы, лиофилизация, выживаемость, тест термостабильности.

Корреспондирующий автор: Осин Александр Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Osin, N.S.Chervyakova, T.V.Valova

Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained

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

Objective of the study is to evaluate applicability of different freeze-driers for lyophilization of pathogenic microorganisms of bacterial origin, and to perform comparative analysis of the quality of the strain formulations obtained using these devices. **Materials and methods.** Four strains of pathogenic microorganisms, belonging to different species and applied as test ones for quality assessment of nutrient media, have been utilized as controls. Their lyophilization has been conducted on four different modules for sublimation, collector- and chamber-type. The quality of lyophilized strain formulations obtained has been evaluated via determination of their cell viability, as well as with the help of rapid survivability test on lyophilized bacterial cultures (thermo-stability assay). **Results and conclusions.** Specified are the conditions for lyophilization of collection test-strains of pathogenic bacteria, falling under the category of the III–IV groups of hazard, using collector devices of the new generation, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus and Heto Power Dry. Carried out has been comparative analysis of viability, survivability and prognosticated terms of storage for the strain preparations obtained with the help of the mentioned above modules and the like, lyophilized on the instrument based on K.E. Dolin technology and programmable drier of the chamber type, Martin Christ Epsilon 2-6D. It is revealed that microorganism preparation lyophilized on different sublimation devices are characterized with high viability of the contained bacterial cells and have prognosticated storage terms of 4–105 years, depending upon the microorganism species and the type of freeze-drier utilized.

Key words: collection strains, lyophilization, survivability, thermo-stability test.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksander V. Osin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Osin A.V., Chervyakova N.S., Valova T.V. Lyophilization of Pathogenic Microorganisms Strains on Freeze-Drying Modules of Different Type, and Quality Assessment of the Preparations Obtained. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:66–70. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-66-70

Наиболее важными задачами, стоящими перед государственными коллекциями патогенных бактерий, являются поддержание коллекционных штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных свойств в течение максимально возможного времени, а также обеспечение ими научно-исследовательских, образовательных, медицинских

и производственных учреждений. Для решения этих задач используют различные методы долгосрочной консервации штаммов [3].

Одним из наиболее часто используемых методов консервации патогенных микроорганизмов является лиофилизация [2, 8]. Клетки лиофилизированных бактериальных штаммов способны длительное вре-

мя сохраняться в жизнеспособном состоянии при температуре 4 °С, не утрачивая своих первоначальных свойств [1, 4, 6], что значительно упрощает деятельность по поддержанию коллекционного фонда патогенных микроорганизмов, а также легко позволяет транспортировать их в любой регион Российской Федерации.

В настоящее время единственной официально регламентированной лиофильной сушкой, предназначенной для высушивания штаммов I–IV групп патогенности, является коллекторный аппарат системы К.Е.Долинова, сильно устаревший как физически, так и морально. Однако в плане обеспечения биологической безопасности процесса лиофилизации патогенных микроорганизмов он превосходит современные установки, поскольку может полностью обрабатываться любыми дезинфекционными средствами, а также подвергаться процедуре автоклавирования, в связи с чем на данный момент является практически безальтернативным вариантом для сушки возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии, сибирской язвы и других бактерий I–II групп патогенности. Вместе с тем в продаже имеется широкий выбор современных лиофильных сушек, которые могли бы быть использованы для консервации коллекционных штаммов, относящихся к III–IV группам патогенности.

Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка возможности применения различных сублимационных установок для лиофилизации патогенных микроорганизмов и сравнительный анализ качества, полученных с их помощью препаратов коллекционных штаммов.

Материалы и методы

В качестве модели нами выбраны четыре штамма из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора: *Vibrio cholerae* non O1 P-9741, *Shigella flexneri* 8516, *Escherichia coli* 18 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209–P), использующиеся в качестве тестовых при проверке качества питательных сред в диагностической деятельности.

Микроорганизмы культивировали при 37 °С в течение 16–18 ч на агаре Хоттингера с разным pH среды: для холерного вибриона – 7,6, возбудителя дизентерии – 7,4, штаммов кишечной палочки и стафилококка – 7,2.

Накопление бактериальной массы перед лиофилизацией осуществляли путем посева отобранных на плотной питательной среде 20–30 типичных по морфологии колоний на соответствующую среду (75 мл), скошенную во флаконах, и выращивали до ранней стационарной фазы.

По окончании времени инкубации бактериальную массу смывали 2–2,5 мл соответствующей среды высушивания. При этом конечная концентрация ПБА в смыве составляла не менее $n \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл. В качестве среды высушивания для *V. cholerae* приме-

няли лактозо-желатиновую среду, состоящую из 15 % лактозы и 3 % желатины, а для остальных микроорганизмов использовали сахарозо-желатиновую среду (среда Файбича), состоящую из 10 % сахарозы, 1,5 % желатины и 0,1 % агара (pH 7,1–7,2). Лيوфилизацию штаммов на аппаратах коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry) проводили в ампулах ШПВ-1, в объеме 0,2 мл при глубине вакуума не менее 0,04–0,05 мбар в течение 7 ч; камерного типа (Martin Christ Epsilon 2-6D) – во флаконах стандарта 2R, в объеме 0,5 мл в автоматическом режиме по следующей программе: I – охлаждение препарата до температуры минус 45 °С при атмосферном давлении (1000 мбар) в течение 1 ч; II – начальная лиофилизация при температуре минус 45 °С при давлении 0,18 мбар в течение 1 ч; III – последующая лиофилизация при давлении 0,18 мбар с постепенным повышением (шаг в 3 °С) температуры до плюс 20 °С в течение 1 ч; IV – заключительная лиофилизация при давлении 0,18 мбар и температуре 20 °С в течение 1 ч; V и VI – досушивание при температуре 20 °С и давлении 0,001 мбар в течение 1 ч и при температуре 30 °С и давлении 0,001 мбар в течение 2 ч соответственно.

Жизнеспособность микробов определяли путем высева их на питательные среды с последующим подсчетом клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %.

Для определения возможного времени хранения при 4 °С использовали ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности) [5, 9].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проведена оценка жизнеспособности клеток лиофилизируемых штаммов до и после процесса высушивания. На основе этих данных рассчитан показатель их выживаемости. Полученные результаты свидетельствуют о различиях в концентрации выживших клеток как в зависимости от сублимационной установки, так и от вида микроорганизма (табл. 1).

Концентрация жизнеспособных клеток штамма *V. cholerae* non O1 P-9741 после лиофилизации падает практически на порядок. Показатели выживаемости у клеток этого штамма самые низкие в ряду использованных в исследовании культур и колеблются в интервале 12,6–36,0 %, в зависимости от используемой лиофильной установки. Это связано в первую очередь с высокой чувствительностью вибрионов к стрессовым условиям процедуры сублимации [4, 10]. Необходимо отметить, что при сушке в лиофильной камере показатель выживаемости клеток холерного вибриона составил 36 %, что более чем в два раза превышает таковой у препаратов, полученных на коллекторных аппаратах (табл. 1). Что же касается

Таблица 1

Количество жизнеспособных клеток и показатель их выживаемости у коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, лиофилизированных на различных сублимационных установках

Штамм	Количество жизнеспособных клеток (lg м.к./мл) и показатель выживаемости (%)											
	Аппарат К.Е.Долинова			Martin Christ Alpha 1-4D			Heto Power Dry			Martin Christ Epsilon 2-6D		
	До сушки*	После сушки**	%***	До сушки	После сушки	%	До сушки	После сушки	%	До сушки	После сушки	%
<i>V. cholerae</i> non O1 P-9741	10,31	9,41	12,6	10,29	9,47	14,9	9,94	9,17	16,7	10,32	9,88	36,0
<i>S. flexneri</i> 8516	10,2	10,17	77,9	10,52	10,39	75,0	9,59	9,53	86,4	10,08	9,91	68,0
<i>E. coli</i> 18	10,39	10,22	67,7	10,01	9,82	65,0	10,23	10,1	74,6	10,06	9,87	65,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10,90	10,89	97,0	11,38	11,25	74,2	10,12	10,1	94,6	10,97	10,83	73,0

* Исходная концентрация клеток микроорганизма до лиофилизации, выраженная в lg от количества микробных клеток в 1 мл.

** Концентрация клеток микроорганизма в лиофилизированном образце, выраженная в lg от количества микробных клеток в 1 мл.

*** Показатель выживаемости – соотношение исходной концентрации клеток микроорганизма к таковой после лиофилизации, выраженный в процентном исчислении.

остальных микроорганизмов, то концентрация жизнеспособных клеток в их лиофилизированных образцах также снижалась, однако показатели выживаемости оставались на высоком уровне (табл. 1).

Следующий этап нашей работы был направлен на установление концентрации жизнеспособных клеток в препаратах штаммов, лиофилизированных на разных установках, в процессе их хранения. Все изучаемые культуры были помещены в холодильник и хранились при температуре 4 °C в течение 12 месяцев, по прошествии которых проведен анализ концентрации сохранившихся живых клеток микроорганизмов. Полученные данные свидетельствуют, что препараты, сублимированные на трех лиофильных сушках коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry), сохраняют максимальное количество жизнеспособных клеток после года хранения (табл. 2). Показатели выживаемости у штаммов, высушенных на этих аппаратах, находятся в интервале от 97,3 до 98,7 %, что указывает на высокое качество их образцов. В то же время жизнеспособность клеток микроорганизмов, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, разнилась в зависимости от вида, а показатели их выживаемости были в целом ниже, чем у препаратов, лиофилизированных на аппаратах коллекторного типа (табл. 2). Так, после года хранения концентрация живых клеток штамма *V. cholerae* non O1 P-9741, высушенных в камерной сушке, оказалась на уровне 17,0 %, что является самым низким показателем выживаемости среди изучаемых штаммов. Следует

отметить снижение этого параметра и у *S. flexneri* 8516 с *E. coli* ATCC 18, который составил в процентном исчислении 63,0 и 73,0 % соответственно. При этом количество жизнеспособных клеток у штамма *S. aureus* ATCC 6538, высушенного на Martin Christ Epsilon 2-6D, практически не отличалось от такового при лиофилизации его на аппаратах коллекторного типа и составило 93,0 %.

На основе ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур (тест термостабильности) проведена оценка возможных сроков хранения высушенных на разных сублимационных установках препаратов коллекционных штаммов при температуре 4 °C. В основу данного теста положено определение количества жизнеспособных клеток в препаратах после их инкубации при различных температурах и последующей статистической обработкой полученных данных.

Установлено, что выживаемость лиофилизированных клеток изученных нами штаммов бактерий резко падает с увеличением температуры их хранения. Изучение динамики выживаемости сублимированных культур от времени хранения при разных температурах позволило провести оценку времени снижения количества жизнеспособных бактерий в высушенных препаратах. Исходя из полученных данных, установлено, что наиболее продолжительными будут сроки хранения лиофилизированных препаратов коллекционных штаммов, полученные с помощью сублимационной установки Heto Power Dry. Так, при хранении полученных на ней высушенных образцов при температуре 4 °C количество жизнеспособных клеток снизится

Таблица 2

Количество жизнеспособных клеток коллекционных штаммов, лиофилизированных на различных установках, после их хранения при 4 °C в течение 12 месяцев

Штамм	Количество жизнеспособных клеток (lg м.к./мл) и показатель выживаемости (%)							
	Аппарат К.Е.Долинова		Martin Christ Alpha 1-4D		Heto Power Dry		Martin Christ Epsilon 2-6D	
	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%	lg м.к./мл	%
<i>V. cholerae</i> non O1 P-9741	9,40	97,3	9,46	98,3	9,16	98,5	9,11	17,0
<i>S. flexneri</i> 8516	10,16	98,1	10,38	98,3	9,52	98,4	9,69	63,0
<i>E. coli</i> 18	10,21	98,7	9,81	98,6	10,09	98,7	10,28	73,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10,88	97,4	11,24	98,7	10,09	98,7	10,79	93,0

Таблица 3

Прогнозируемые сроки хранения коллекционных штаммов, лиофилизированных на разных сублимационных установках

Штамм	Срок хранения коллекционных штаммов при 4 °C (лет)			
	Аппарат К.Е.Долинова	Martin Christ Alpha 1-4D	Heto Power Dry	Martin Christ Epsilon 2-6D
<i>V. cholerae</i> non-O1 P-9741	19,7	30	34	4,5
<i>S. flexneri</i> 8516	53	84	74	22,5
<i>E. coli</i> 18	66	66	70	20,7
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	46,7	78,8	105	24,2

до 1 % (достаточная концентрация микробных клеток для их культивирования и воспроизводства) у *V. cholerae* non-O1 P9741 за 34 года, *S. flexneri* 8516 – 74 года, *E. coli* – 18–70 лет, *S. aureus* ATCC 6538 (209–P) – 105 лет (табл. 3). Прогнозируемые сроки хранения коллекционных штаммов, лиофилизированных на аппарате системы К.Е.Долинова, оказались ниже и составили от 19,7 лет у *V. cholerae* non-O1 P9741 до 66 лет у *E. coli* 18. Данные по Martin Christ Alpha 1-4 LDplus были промежуточными, прогнозируемый срок хранения высушенных на нем штаммов выше, чем у аппарата К.Е.Долинова, но ниже такового у Heto Power Dry (табл. 3). Результаты прогноза по хранению препаратов, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, оказались невысоки и значительно отличались от полученных на коллекторных аппаратах (табл. 3). По полученным данным, прогнозируемый срок хранения штамма холерного вибриона P-9741 составит всего 4,5 года, а у остальных культур находится в интервале от 20,7 до 24,2 лет.

В заключение следует отметить, что приоритетом проводимых экспериментов являлось не только получение качественных препаратов коллекционных штаммов, но и обеспечение биологической безопасности этого процесса. В этой связи все показатели, представленные в работе, рассчитывались исходя из минимальных объемов высушиваемой бактериальной взвеси. Такой подход, во-первых, избавляет от необходимости работы с большими объемами культуры на этапе накопления клеточной массы, снижая тем самым риски биологической опасности, а во-вторых, позволяет провести цикл лиофилизации в пределах рабочего дня, без необходимости ночных дежурств.

Исходя из полученных показателей выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, аппараты коллекторного типа показали лучшие результаты по сравнению с камерной сушкой, что объясняется форматом хранения полученных образцов в стеклянных ампулах, отпаиваемых под вакуумом непосредственно с коллектора. При отсутствии микротрещин в стенках ампулы разрежение в ней будет сохраняться очень долго, в то время как флаконы, использующиеся в камерной сушке, укупориваются резиновыми пробками, теряющими со временем эластичность и, вследствие этого, пропускающими молекулы кислорода, приводящими к окислительным процессам в лиофилизированном препарате штамма, что вызывает гибель его клеток. В связи с этим формат хранения штаммов во флаконах рекомендуется для тех куль-

тур, срок хранения которых не превышает 3–4 года [7], тогда как для длительного поддержания культур больше подходит лиофилизация в ампулах.

Таким образом, нами подобраны условия лиофилизации коллекционных тест-штаммов патогенных бактерий III–IV групп патогенности с помощью коллекторных аппаратов нового поколения Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry. Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения полученных на них препаратов штаммов патогенных микроорганизмов с таковыми, лиофилизированными на аппарате системы К.Е.Долинова и программируемой сушки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D. Полученные данные свидетельствуют о зависимости показателей выживаемости клеток и прогнозируемых сроков хранения как от вида микроорганизма, так и от марки лиофильного аппарата, а также контейнера хранения (ампула/флакон). Вместе с тем с учетом целей применения лиофилизированных культур (пополнение коллекционного фонда, с закладкой на длительное хранение/реализацию тест-штаммов, имеющих ограниченный срок использования) проведенная работа указывает на эффективность предлагаемого подхода к лиофилизации коллекционных штаммов патогенных бактерий и перспективность его внедрения в работу коллекционных центров.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне; 1987. 240 с.
2. Матвеева Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации. *АГРО XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Мед. науки*. 2009; 4(12):99–121.
4. Сидякина Т.М., Кузнецова Е.В., Чумакова М.Ю. Жизнеспособность и биохимическая активность дрожжей *Saccharomyces vini* при сублимационном высушивании и криоконсервации. *Пробл. криобиол.* 1986; 1:23–8.
5. Филатова С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Aspergillus parvulus*, основанное на методе ускоренного хранения. *Микробиология*. 1977; 46(2):318–23.
6. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е. Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ – 25А. *Пробл. криобиол.* 2002; 2:26–9.
7. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

8. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.
9. Porther D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.
10. Simatos D., Blond G., Dauvois P., Sauvageot F. In: La Lyophilisation. Principes et Applications. Collection de L' A.N.R.T. Paris, France; 1974. P. 349–58.

References

1. Bekker M.E., Rapoport A.I., Kalakutsky L.V. [Suppression of Cell's Life-Sustaining Activity]. Riga; 1987. 240 p.
2. Matveeva E.V. [Preservation of phyto-pathogenic bacteria gene pool, using lyophilization]. *AGRO XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Methods of extended storage of collection microorganism cultures and development trends]. *Bulletin of Higher Educational Establishments. Povolzhsky Region. Med. Sciences*. 2009; 4(12):99–121.
4. Sidiyakina T.M., Kuznetsova E.V., Chumakova M.Yu. [Viability and biochemical activity of *Saccharomyces vini* yeasts in case of sublimation and cryo-conservation]. *Probl. Kriobiol.* 1986; 1:23–8.
5. Filatova S.N., Murav'eva S.A., Fishman V.M. [Prognostication of survivability of lyophilized *Acnomyces parvullus* spores, based on accelerated storage technique]. *Mikrobiologiya*. 1977; 46(2):318–23.
6. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E. [Studies of certain lyophilization

process parameters effect on viability of spore culture *Streptomyces fradiae* VNIIG – 25 A]. *Probl. Kriobiol.* 2002; 2:26–9.

7. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

8. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.

9. Porther D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2007.03.002.

10. Simatos D., Blond G., Dauvois P., Sauvageot F. In: La Lyophilisation. Principes et Applications. Collection de L' A.N.R.T. Paris, France; 1974. P. 349–58.

Authors:

Osin A.V., Chervyakova N.S., Valova T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 30.10.15.

С.А.Пьянков¹, О.В.Пьянков¹, Е.В.Найденова², А.П.Агафонов¹, М.У.Боиро³, В.В.Солодкий¹,
А.В.Зайковская¹, Н.Л.Максимов¹, С.С.Маренникова¹, Е.Ф.Бочаров¹, В.И.Офитсеров⁴, А.А.Лопатин²,
С.А.Шчербакова², Ю.В.Демина⁵, В.В.Кутырев², В.Н.Михеев¹

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЭБОЛА ПРИ РАБОТЕ БРИГАДЫ СПЭБ В ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Исследовательский институт прикладной биологии, Киндия, Гвинейская Республика;

⁴ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово, Российская Федерация; ⁵Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация

Цель работы. Разработать набор для выявления антител классов IgM и IgG к вирусу Эбола методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Материалы и методы.** В качестве антигена использовали наработанный на культуре клеток штамм вируса Эбола Заир H.sapiens-wt/GIN/2015/Kalidie-Kindia-1022. **Выводы и результаты.** Набор использован в работе бригады МК СПЭБ Роспотребнадзора в Гвинее при расследовании случаев болезни во время эпидемии лихорадки Эбола. Установлено, что специфические антитела класса G сохраняются у переболевших лихорадкой Эбола не менее 2 лет. Показано, что использование набора в лабораторной диагностике позволяет ИФА стать основным и подтверждающим лабораторным методом выявления лихорадки Эбола.

Ключевые слова: вирус Эбола, лабораторная диагностика, иммуноферментный анализ, динамика нарастания титров антител.

Корреспондирующий автор: Степан Александрович Пьянков, e-mail: pyankov@vector.nsc.ru.

S.A.P'yankov¹, O.V.P'yankov¹, E.V.Naydenova², A.P.Agaonov¹, M.Y.Boiro³, V.V.Solodkiy¹,
A.V.Zaykovskaya¹, N.L.Maksimov¹, S.S.Marennikova¹, E.F.Bocharov¹, V.I.Ofitserov⁴, A.A.Lopatin²,
S.A.Shcherbakova², Yu.V.Demina⁵, V.V.Kutyrev², V.N.Mikheev¹

Experience of Application of the ELISA Method for Detection of Antibodies to Ebola Virus during the SAET Team Work in the Republic of Guinea

¹State Research Center of Virology and Biotechnology, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ³Research Institute of Applied Biology, Kindia, the Republic of Guinea; ⁴Vector-Best, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; ⁵Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

The aim of the work was to develop a kit for detection of IgM and IgG antibodies to Ebola virus in ELISA. **Materials and methods.** Ebola virus strain Zaire H.sapiens-wt/GIN/2015/Kalidie-Kindia-1022 grown on cell culture was used as antigen. **Results and conclusions.** The kit was used by the Rospotrebnadzor SAET team in its work in Guinea while investigating cases during Ebola fever epidemics. It was established that specific IgG antibodies persisted in Ebola fever survivors for 2 years. Application of this kit in the laboratory diagnostics permits ELISA to become the main and confirmatory laboratory method of Ebola fever detection.

Key words: Ebola virus, laboratory diagnostics, ELISA, dynamics of antibodies titer increment.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Stepan A. P'yankov, e-mail: pyankov@vector.nsc.ru.

Citation: P'yankov S.A., P'yankov O.V., Naydenova E.V., Agaonov A.P., Boiro M.Y., Solodkiy V.V., Zaykovskaya A.V., Maksimov N.L., Marennikova S.S., Bocharov E.F., Ofitserov V.I., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A., Demina Yu.V., Kutyrev V.V., Mikheev V.N. Experience of Application of the ELISA Method for Detection of Antibodies to Ebola Virus during the SAET Team Work in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:71–75. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-71-75

В 2014–2016 гг. в 3 странах Западной Африки (Гвинея, Сьерра-Леоне и Либерия) зарегистрирована эпидемия болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), которую до этого считали эндемичной только для сельских районов Центральной Африки [5]. Общее количество официально зарегистрированных случаев болезни за этот период составило около 28 тыс., 11 тыс. закончились смертельным исходом [8]. Масштаб эпидемии и угроза распространения БВВЭ на другие территории показала необходимость участия всего мирового сообщества в ликвидации данной проблемы. В страны, пострадавшие от БВВЭ, с целью оказания медицинской помощи были

направлены бригады специалистов из многих стран мира [3, 4, 8].

В августе 2014 г. Правительством Российской Федерации принято решение об оказании помощи Гвинейской Республике в ликвидации эпидемии БВВЭ. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации в Гвинейскую Республику направлен мобильный комплекс санитарной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора (МК СПЭБ) и группа специалистов, в задачи которых входило осуществление лабораторной диагностики БВВЭ и оказание консультативно-методической по-

мощи [2].

Лабораторную диагностику проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с целью выявления РНК вируса Эбола, для чего использовали зарегистрированные и разрешенные к применению наборы реагентов отечественного производства «Вектор-ПЦР_{РВ}-Эбола-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор») и «АмплиСенс® EBOV Zaire-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис»). Метод ОТ-ПЦР хорошо зарекомендовал себя при проведении диагностики БВВЭ на ранних стадиях развития инфекционного процесса, когда возбудитель персистирует в организме больного [1, 2].

Но, как известно, при диагностике инфекционных болезней вирусной природы наиболее информативно использовать комплекс методов. Чаще всего применяют молекулярно-генетические методы в сочетании с иммуносерологическими. Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет выявлять антитела классов IgM и IgG к вирусу Эбола в сыворотке крови больных, что дает возможность проводить лабораторную диагностику на более поздних сроках от начала болезни и осуществлять сероэпидемиологический мониторинг [3, 5, 6]. В Российской Федерации на момент начала работы МК СПЭБ в Гвинейской Республике зарегистрированные препараты для выявления в сыворотке крови больных антител классов IgM и IgG к вирусу Эбола методом ИФА отсутствовали [3].

Целью работы стала разработка набора реагентов для совместного и раздельного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола в сыворотке и плазме крови человека методом ИФА, апробация и последующее использование его в период эпидемических проявлений БВВЭ в Гвинейской Республике во время работы лаборатории МК СПЭБ.

Материалы и методы

Работу проводили с соблюдением требований СП 1.3.3118-13 «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинично-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (Утв. МЗ СССР 17 января 1991 г.).

При разработке тест-системы в качестве антигена использовали наработанный на культуре клеток *Vero* с использованием раствора Игла MEM с 8–10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и очищенный в градиенте плотности (10–60 %) сахарозы при режиме центрифугирования 130000 g при 4–6 °C в течение 4 ч штамм вируса Эбола Заир Н. sapiens-wt/GIN/2015/Kalidie-Kindia-1022 (депонирован в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» № V-695).

Процедуру постановки непрямого твердофаз-

ного ИФА разделили на две стадии. Контрольные и разведенные в 5 раз исследуемые образцы инкубировали с антигеном, сорбированным на полистироловые планшеты. После пятикратной отмывки от не связавшегося с антигеном материала проводили последующую инкубацию: при скрининге – со смесью конъюгатов против IgG и IgM человека; при подтверждении иммунного статуса положительных образцов – раздельно в разных лунках планшета с каждым из конъюгатов. Затем проводили вторую пятикратную отмывку от не образовавшего иммунные комплексы конъюгата и визуализацию результатов ИФА путем добавления раствора хромогена. Вносили стоп-реагент и учитывали результаты реакции на планшетном ридере при длине волны 450 нм.

Для выяснения диагностической ценности разработанного набора реагентов и валидации его диагностических и аналитических характеристик сформировали панель образцов сыворотки и плазмы крови людей, содержащих и не содержащих антитела к вирусу Эбола. В качестве положительных образцов использовали 139 образцов, собранных на территории Гвинейской Республики от больных и переболевших БВВЭ. Отрицательную референс-панель собрали из сывороток крови людей, полученных из лечебных учреждений Гвинеи от больных с установленным окончательным диагнозом (не БВВЭ), а также с различными инфекционными болезнями (малярия, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой энцефалит), обратившихся за медицинской помощью в разных городах Российской Федерации, реконвалесцентов с диагнозом «лихорадка Марбург», от вакцинированных против желтой лихорадки, а также здоровых доноров. Всего в работе использовано 902 образца сывороток крови и плазмы (табл. 1).

Результаты и обсуждение

На начальном этапе работы для отработки условий проведения ИФА была сформирована рабочая

Таблица 1

Образцы сывороток крови и плазмы людей, использованных в исследовании

Исследуемый материал	Количество образцов
Сыворотки крови больных и переболевших БВВЭ (Гвинейская Республика)	139
Сыворотки крови больных с установленным диагнозом (не БВВЭ) (Гвинейская Республика)	214
Сыворотки крови больных с различными инфекционными болезнями (Российская Федерация)	381
Сыворотки крови реконвалесцентов с диагнозом «лихорадка Марбург» (Российская Федерация)	2
Сыворотки крови людей, вакцинированных против желтой лихорадки (Российская Федерация)	23
Сыворотки крови здоровых доноров (Российская Федерация)	143
<i>Всего</i>	<i>902</i>

панель сывороток, содержащих и не содержащих антитела к вирусу Эбола, из числа указанных выше. В качестве положительных образцов использовали 5 сывороток крови, полученных в 2015 г. из Гвинеи от больных лихорадкой Эбола с подтвержденным клиническим и лабораторным диагнозом. В качестве отрицательных образцов – 1 сыворотка крови от реконвалесцента с диагнозом «лихорадка Марбург», 2 сыворотки крови от больных с диагнозом «лихорадка Западного Нила», 2 сыворотки крови от больных с диагнозом «Крымская геморрагическая лихорадка». В процессе работы были подобраны оптимальные концентрации антигена, конъюгатов, блокирующих растворов, а также условия проведения ИФА.

Диагностическую чувствительность определяли с использованием экспериментальных серий ИФА-набора при тестировании образцов сыворотки и плазмы крови реконвалесцентов и больных с лабораторно подтвержденным диагнозом БВВЭ. При проведении ИФА с одновременным применением конъюгатов «анти-IgM» и «анти-IgG» положительный результат выявлен в 100 % случаев. Последующее подтверждение полученных данных при раздельном применении конъюгатов также показало наличие антител к вирусу Эбола во всех исследуемых образцах. Таким образом, диагностическая чувствительность разработанных препаратов составила не менее 98 % с достоверной вероятностью 90 %.

Специфичность определяли при тестировании образцов сывороток крови и плазмы от людей с различными инфекционными болезнями, но не БВВЭ. При исследовании всех образцов зарегистрирован отрицательный результат как в вариантах реакции одновременного выявления специфических антител (IgM и IgG), так и при раздельной их детекции. Диагностическая специфичность составила не менее 99 %.

Проведено сравнение эффективности коммерческого набора реагентов «Human Anti-ZEBOV GP IgG» (Alpha Diagnostic Intl. Inc., США) и экспериментальной серии разработанного ИФА-набора. Для сравнительных исследований использованы 5

сывороток крови, полученных в 2015 г. из Гвинеи от больных БВВЭ, 1 – от реконвалесцента с диагнозом «лихорадка Марбург» и 4 – от больных с диагнозом «лихорадка Западного Нила». Сыворотки титровали с шагом 1:2, начиная с разведения 1:100 и заканчивая разведением 1:102400. Исследования проводили в соответствии с инструкциями по применению. В экспериментальной серии разработанного ИФА-набора использовали конъюгат против IgG человека.

При проведении тестирования сывороток крови людей с диагнозом «БВВЭ» как с использованием разработанного нами набора, так и с препаратом сравнения выявлены антитела класса IgG к вирусу Эбола. При проведении анализа сывороток крови людей с диагнозом «лихорадка Марбург» и «лихорадка Западного Нила» во всех случаях получен отрицательный результат. Проведенные испытания показали, что чувствительность разработанного ИФА-набора выше, чем у набора «Human Anti-ZEBOV GP IgG». Результаты приведены в табл. 2.

Изучение стабильности набора позволило установить допустимые колебания значений оптической плотности, регистрируемые при тестировании одной пробы с использованием разных серий наборов в течение года для всех испытанных образцов.

При исследовании полной контрольной панели (табл. 1) с использованием трех серий разработанного набора, во всех сыворотках крови от больных и переболевших БВВЭ обнаружены суммарные антитела к вирусу Эбола; в пробах от людей с другими инфекционными болезнями и доноров положительных ответов не выявлено, что свидетельствует о 100 % воспроизводимости полученных результатов.

После проведения технических и клинических испытаний «Набор реагентов для совместного и раздельного иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» зарегистрирован в установленном порядке (№ РЗН 2015/3458).

Набор «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» использовали во время работы на базе МК СПЭБ в Гвинейской Республике. При проведении диагностических ис-

Таблица 2

Сравнительное изучение эффективности наборов для выявления антител к вирусу Эбола с использованием положительных и отрицательных образцов сыворотки крови человека

Исследуемые образцы	Титр антител к вирусу Эбола / набор	
	экспериментальная серия разработанного ИФА-набора	«Human Anti-ZEBOV GP IgG»
Сыворотки крови больных с диагнозом «БВВЭ»	1:102400	1:800
	1:51200	1:800
	1:102400	1:1600
	1:51200	1:800
	1:102400	1:3200
Сыворотка крови больных с диагнозом «лихорадка Марбург»	< 1:100	< 1:100
Сыворотки больных с диагнозом «лихорадка Западного Нила»	< 1:100	< 1:100
	< 1:100	< 1:100
	< 1:100	< 1:100
	< 1:100	< 1:100

Выявление антител к вирусу Эбола в сыворотках крови реконвалесцентов, полученных в разные сроки от начала болезни

Пол	Возраст	Дата от начала болезни	Титр антител	
			IgM	IgG
М	33	1 год 8 месяцев	< 1:5	1:5
М	28	6 месяцев	< 1:5	1:10000
		1 год 7 месяцев	< 1:5	1:200
М	45	7 месяцев	1:10	1:100000
		1 год 5 месяцев	< 1:5	1:100
М	25	6 месяцев	< 1:5	1:10000
		1 год 8 месяцев	< 1:5	1:100
М	30	1 год 3 месяца	< 1:5	1:100
М	26	1 год 3 месяца	< 1:5	1:200
М	20	7 месяцев	1:10	1:100000
		2 года 1 месяц	< 1:5	1:800
М	23	2 года 1 месяц	< 1:5	1:100
М	37	7 месяцев	< 1:5	1:100000
		2 года 1 месяц	< 1:5	1:200
М	30	1 год 8 месяцев	< 1:5	1:100
М	16	2 года	< 1:5	1:100

следований установлено, что метод ИФА позволяет выявлять специфические IgM не ранее 7 и не позднее 180 сут от начала болезни, а IgG – не ранее 12–14 сут с момента появления у больного клинических признаков БВВЭ и в течение последующих двух лет после выздоровления. Также показано, что примерно к 25-м суткам болезни концентрация антител класса М к вирусу Эбола в крови достигает максимальных значений. Высокий уровень антител класса IgG зарегистрирован через 28 сут от начала болезни.

С использованием набора «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» изучены сроки циркуляции специфических антител к вирусу Эбола в крови реконвалесцентов (табл. 3). У 5 реконвалесцентов, выздоровевших 6–7 месяцев назад, обнаружены специфические IgG в титрах 1:10000–1:100000. Два из них содержали специфические IgM в титре 1:10. Через 1–1,5 года уровни антител класса IgG существенно снижались, однако продолжали определяться. В результате работы показано, что специфические антитела класса IgG сохраняются у переболевших БВВЭ не менее 2 лет после начала болезни, что указывает на возможность использования данного диагностического препарата в ретроспективных исследованиях.

Таким образом, разработанный набор «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин» позволяет выявлять как суммарные, так и специфические антитела классов М и G к вирусу Эбола в сыворотках и плазме крови людей. Показано, что ИФА может быть использован как дополнительный лабораторный тест при диагностике БВВЭ (в период клинических проявлений и детекции РНК вируса в биологических жидкостях больного), так и в качестве основного лабораторного метода при проведении ретроспективной диагностики.

Порядок работы был одобрен этическими коми-

тетами лечебных учреждений, предоставивших образцы для исследования.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопатин А.А., Найденова Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Уткин Д.В., Касьян Ж.А., Крицкий А.А., Терновой В.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Sylla A.L., Kanomou V., Voïgo M.Y., Демина Ю.В., Хорошилов В.Ю., Попова А.Ю., Кутырев В.В. Изучение сохранения вируса Эбола в биологических жидкостях пациента на поздних стадиях выздоровления. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 3:73–7.
2. Попова А.Ю., Сафронов В.А., Магасуба Н.Ф., Уткин Д.В., Одинокоев Г.Н., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Боднев С.А., Кабанов А.С., Куклев В.Е., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Никифоров К.А., Щербакова С.А., Терновой В.А., Агафонов А.П., Михеев В.Н., Кутырев В.В. Организация и проведение диагностических исследований на базе мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады в Республике Гвинея в период эпидемии лихорадки Эбола в 2014 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:5–8.
3. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Эпидемиология, профилактика и лабораторная диагностика болезни, вызванной вирусом Эбола. Саратов: Буква; 2015. 244 с.
4. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N'Faly, Soropogu B., Mamadou Salio Sow, Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2014; 371(15):1418–25. DOI: 10.1056/NEJMoa1404505.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks Chronology: Ebola Virus disease. 2014. [cited 06 Sept 2014]. Available from: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/resources/outbreak-table.html>.
6. Krähling V., Becker D., Rohde C., Eickmann M., Eroğlu Y., Herwig A., Kerber R., Kowalski K., Vergara-Alert J., Becker S. European Mobile Laboratory consortium. Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2016; 205(2):173–83. DOI: 10.1007/s00430-015-0438-6.
7. Vu H., Shulenin S., Grolla A., Audet J., He S., Kobinger G., Unfer R.C., Warfield K.L., Aman M.J., Holtsberg F.W. Quantitative serology assays for determination of antibody responses to Ebola virus glycoprotein and matrix protein in nonhuman primates

and humans. *Antiviral. Res.* 2016; 126:55–61. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.11.012.

8. WHO. Situation report, 28 April 2016. [cited 14 Jul 2016]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205686/1/WHOsitrep_28Apr2016_eng.pdf?ua=1.

References

1. Lopatin A.A., Naydenova E.V., Safronov V.A., Razdorskiy A.S., Utkin D.V., Kas'yan Zh.A., Kritskiy A.A., Ternovoy V.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Demina Yu.V., Khoroshilov V.Yu., Popova A.Yu., Kuttyrev V.V. Studies on Ebola virus persistence in the body fluids of a patient at advanced stages of convalescence. *Probl. Osobo Opasnykh Inf.* 2015; 3:73–7.
2. Popova A.Yu., Safronov V.A., Magasuba N.F., Utkin D.V., Odinkov G.N., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Kuklev V.E., Lopatin A.A., Razdorskiy A.S., Nikiforov K.A., Shcherbakova S.A., Ternovoy V.A., Agafonov A.P., Mikheev V.N., Kuttyrev V.V. Management and performance of diagnostic investigations on the platform of specialized anti-epidemic team mobile complex during EVD epidemics in 2014 in the Republic of Guinea. *Probl. Osobo Opasnykh Inf.* 2014; 4:5–8.
3. Popova A.Yu., Kuttyrev V.V., eds. *Epidemiology, prophylaxis and laboratory diagnostics of Ebola virus disease*. Saratov: Bukva; 2015. 244 p.
4. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N'Faly, Soropogu B., Mamadou Saliou Sow, Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Héleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med.* 2014; 371(15):1418–25. DOI: 10.1056/NEJMoa1404505.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreaks Chronology: Ebola Virus disease. 2014. [cited 06 Sept 2014]. Available from: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/resources/outbreak-table.html>.
6. Krähling V., Becker D., Rohde C., Eickmann M., Eroglu Y., Herwig A., Kerber R., Kowalski K., Vergara-Alert J., Becker S. European Mobile Laboratory consortium. Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2016; 205(2):173–83. DOI: 10.1007/s00430-015-0438-6.
7. Vu H., Shulenin S., Grolla A., Audet J., He S., Kobinger G., Unfer R.C., Warfield K.L., Aman M.J., Holtsberg F.W. Quantitative serology assays for determination of antibody responses to Ebola virus glycoprotein and matrix protein in nonhuman primates and humans. *Antiviral. Res.* 2016; 126:55–61. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.11.012.

8. WHO. Situation report, 28 April 2016. [cited 14 Jul 2016]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205686/1/WHOsitrep_28Apr2016_eng.pdf?ua=1.

Authors:

P'yankov S.A., P'yankov O.V., Agafonov A.P., Solodkiy V.V., Zaykovskaya A.V., Maksimov N.L., Marennikova, S.S. Bocharov E.F., Mikheev V.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Naydenova E.V., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Boiro M.Y. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea.

Oftserov V.I. Vector-Best. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation. E-mail: common@vector-best.ru.

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

Об авторах:

Пьянков С.А., Пьянков О.В., Агафонов А.П., Солодкий В.В., Зайковская А.В., Максимов Н.Л., Маренникова С.С., Бочаров Е.Ф., Михеев В.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Найденова Е.В., Лопатин А.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Боиро М.У. Исследовательский институт прикладной биологии. Гвинейская Республика, Киндия.

Офисеров В.И. ЗАО «Вектор-Бест». Российская Федерация, Кольцово. E-mail: common@vector-best.ru.

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

Поступила 28.07.16.

С.В.Титова, Е.А.Меньшикова, Е.М.Курбатова, Л.К.Лысова, И.В.Архангельская, О.В.Дуванова,
А.В.Миронова, А.В.Самородова, Э.А.Москвитина

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СРОКИ ПЕРСИСТЕНЦИИ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Цель исследования. Изучение влияния температуры и среды культивирования на сроки персистенции, сохранение *ctx* гена и ферментативную активность *V. cholerae* O1 различной токсигенности. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor: P-5879, P-19613, а также штамм P-19787. **Результаты и выводы.** При изучении холерных вибрионов Эль Тор с разной генетической характеристикой установлено, что самая длительная выживаемость (19 сут) на минеральных субстратах при 5 °C наблюдалась у токсигенных штаммов, тогда как атоксигенный штамм сохранялся не более 17 сут. В то же время холерные вибрионы могут длительное время сохраняться и даже размножаться в условиях пониженной температуры (не менее 10 °C) на минеральных субстратах. Токсигенные штаммы холерных вибрионов, независимо от среды и температуры культивирования, сохраняли в своем геноме *ctx* ген и ферментативную активность в течение всего срока наблюдения в эксперименте. Такая продолжительная персистенция холерных вибрионов при низких температурах на минеральных субстратах может рассматриваться как возможность сохранения токсигенных штаммов холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями.

Ключевые слова: холерный вибрион, токсигенность, персистенция, *ctx* ген, минеральные субстраты, ферментативная активность.

Корреспондирующий автор: Титова Светлана Викторовна, e-mail: titova_sv@antiplague.ru

S.V.Titova, E.A.Men'shikova, E.M.Kurbatova, L.K.Lysova, I.V.Arkhangel'skaya, O.V.Duvanova, A.V.Mironova,
A.V.Samorodova, E.A.Moskvitina

Impact of Cultivating Environment on the Terms of Persistence and Certain Properties of Cholera Vibrios

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

Objective of the study is to investigate the impact of cultivating temperature and medium on the terms of persistence, *ctx* gene retention, and enzymatic activity of *V. cholerae* O1 with various toxigenicity. **Materials and methods.** Utilized were the strains of *V. cholerae* El Tor: P-5879, P-19613, and also the strain P-19787. **Results and conclusions.** In the process of studying cholera vibrios El Tor with different genetic characteristics it was determined that the longest terms of persistence (19 days) on mineral substrates at 5 °C were observed for toxigenic strains, while for non-toxigenic ones it made less than 17 days. At the same time cholera vibrios can persist continuously and even reproduce on mineral substrates under the conditions of subnormal lowered temperatures (not less than 10 °C). Toxigenic strains of *Vibrio cholerae*, irrespectively of cultivating medium and temperature, retained *ctx* gene in their genome and maintained enzymatic activity throughout the experiment. Such long-term persistence of cholera vibrios at low temperatures on mineral substrates may be regarded as possibility of preservation of *V. cholerae* toxigenic strains in case of import by the infected persons or vibrio-carriers.

Key words: cholera vibrio, toxigenicity, persistence, *ctx* gene, mineral substrates, enzymatic activity.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Svetlana .V. Titova, e-mail: titova_sv@antiplague.ru.

Citation: Titova S.V., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Lysova L.K., Arkhangel'skaya I.V., Duvanova O.V., Mironova A.V., Samorodova A.V., Moskvitina E.A. Impact of Cultivating Environment on the Terms of Persistence and Certain Properties of Cholera Vibrios. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:76–80. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-76-80

Известно, что поверхностные водоемы являются составной частью среды обитания холерных вибрионов [15]. Анализ накопленных за период седьмой пандемии данных указывает также на значительный диапазон экологической толерантности водной популяции вибрионов Эль-Тор 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 [6, 11, 14]. Наряду с выделением холерных вибрионов из речной воды известны факты их обнаружения в морской [1]. Факторами передачи холерных вибрионов в таких случаях могут быть и недостаточно проваренные крабы, креветки, устрицы, рыба (морепродукты) [5]. Установлено, что холерные вибрионы El Tor хорошо сохраняются и даже размножаются в сильно минерализованных водах. Г.М.Мединским

[7], Р.М.Саямовым, А.М.Зайденовым [10] описаны факты продолжительного выделения холерных вибрионов из сульфидной воды естественных источников на территории Больших Сочи. Экспериментально показана возможность сохранения при температуре 20–24 °С до 39–65 дней и 289–413 дней при температуре 37 °С, а также размножение холерных вибрионов в речной воде с примесью сульфидного минерального источника при исследовании р. Агура г. Сочи в месте слабого течения и глубокого прогревания [8]. С июля по сентябрь 2015 г. на участке р. Агуры, где происходит естественная разгрузка минерального источника, было выделено 98 штаммов *V. cholerae* El Tor Inaba (ctxAB-tcpA⁻). Такое длительное выделение атоксигенных холерных вибрионов El Tor можно рассматривать как создание благоприятных климато-географических условий для накопления токсигенных холерных вибрионов при заносе больными или вибрионосителями [6, 12, 13].

Целью исследования было изучение влияния температуры и среды культивирования на сроки персистенции, сохранение ctx гена и ферментативную активность *V. cholerae* O1 различной токсигенности.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor: P-5879 ctxAB⁺tcpA⁺, выделенный от человека в 1972 г., P-19613 ctxAB⁺tcpA⁺, изолированный из воды р. Темерник г. Ростова-на-Дону в 2014 г., а также штамм P-19787 ctxAB⁻tcpA⁻, выделенный из р. Агура в месте впадения минерального источника в 2015 г. В качестве сред культивирования использовали водопроводную, сульфидную воду и грязевые отложения минерального источника Мацеста, воду Черного моря и р. Агуры (рН всех используемых минеральных субстратов находилось в пределах 6,5–7,0). Субстраты трижды стерилизовали на водяной бане по 20 мин с последующими посевами на специфическую стерильность, затем 18-часовую культуру холерных вибрионов вносили в 30 мл среды культивирования до конечной концентрации 10⁴ микробных единиц/мл, используя исходные субстраты в различных сочетаниях: морская вода, морская вода с водой минерального источника (1:1), морская и речная вода (1:1), речная вода, речная вода с водой минерального источника (1:1), вода минерального источника, минеральная вода с водопроводной водой (1:1), минеральные грязевые отложения и минеральная вода (1:1). В качестве контроля использовали дехлорированную стерильную водопроводную воду. Исследуемые штаммы инкубировали при температуре 5, 10 и 25 °С. Учет результатов проводили при температурах культивирования 5 и 10 °С один раз в 2–4 дня, а при 25 °С – 1 раз в 7 дней в течение 1 месяца, затем 1 раз в месяц. Наличие ctx гена определяли с использованием пары праймеров ctx A-F и ctxB-R (производства ЗАО «Евроген», Москва) методом ПЦР. Амплификат включал дистальную часть

ctx A и проксимальную ctxB. Определение N-ацетил-β-D-глюкозаминидазной, твиназной (способность гидролизовать твин-20), ДНК-азной (с использованием DNase тест агара, Дифко) и алкилсульфатазной активностей проводили согласно методикам О.В.Дувановой и соавт. [2, 3, 4].

Результаты и обсуждения

Нами установлено, что при культивировании холерных вибрионов на минеральных субстратах при 5 °С все исследуемые штаммы, независимо от токсигенности, перестали высеваться к 8–19-м суткам от начала эксперимента, тогда как в контрольных пробах гибли на 2–12-е сутки. При 5 °С самая длительная выживаемость (19 сут) наблюдалась у токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor P-5879 и P-19613 в морской (Черное море) и речной воде (р. Агура) – от 15 до 19 сут. В то же время атоксигенный штамм *V. cholerae* El Tor P-19787 дольше всего сохранялся в морской, минеральной воде и в смеси речной и морской воды (17 сут). Нами отмечено, что при 5 °С культивирования добавление воды минерального источника (Мацеста) в пробы с водой р. Агура сокращает сроки выживаемости токсигенных и атоксигенного штаммов холерных вибрионов почти в два раза (8 и 10 сут соответственно) по сравнению с вышеперечисленными субстратами.

При 10 °С на тех же субстратах сроки персистенции вибрионов значительно удлинялись по сравнению с 5 °С инкубации и варьировали в зависимости от субстрата от 21 дня до 2 месяцев. Токсигенные штаммы (P-5879 и P-19613) дольше всего выживали в смеси р. Агура и Черного моря, весь срок наблюдения (более 2 месяцев), и быстрее погибали в смеси речной воды с минеральной (около полутора месяцев). Атоксигенный штамм дольше всего сохранялся в условиях минеральной воды (44 дня) и меньше в смеси минеральной грязи с минеральной водой (23 дня). 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. В пробах со 100 % минеральной водой токсигенные холерные вибрионы выживали от одного до двух месяцев (P-19613 и P-5879 соответственно), атоксигенный – до 1,5 месяцев. Минеральная вода, разбавленная водопроводной, способствовала увеличению срока персистенции токсигенных холерных вибрионов (более 2,5 месяцев). Смесь минеральной воды с грязевыми отложениями также способствовала сохранению холерных вибрионов (*V. cholerae* El Tor № P-19787, P-5879, P-19613 – 23 дня, 1 месяц и 1,5 месяца соответственно). Отмечено размножение холерных вибрионов токсигенных и атоксигенных штаммов в морской и речной воде после первой недели культивирования в новых условиях, возможно, это срок адаптации или переход на новый источник питания (рис. 1, 2, 3).

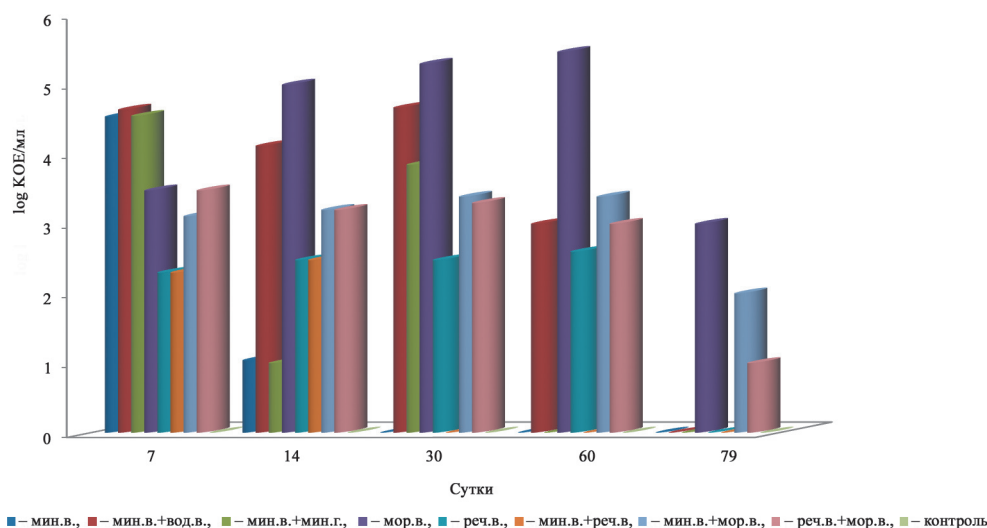


Рис. 1 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-19613 ctx⁺tcp⁺ при 10 °C на различных субстратах:

Здесь и на рис. 2 и 3: мин.в. – минеральная вода 100 %, мин.в.+вод.в. – минеральная вода + водопроводная вода (1:1), мин.в.+мин.г. – минеральная вода + минеральная грязь (1:1), мор.в. – морская вода, реч.в. – речная вода, мин.в.+реч.в. – минеральная вода + речная вода (1:1)

При 25 °C во всех экспериментальных и контрольных пробах жизнеспособность холерных вибрионов сохранялась более двух месяцев (срок наблюдения). Через 7 дней от начала эксперимента у всех исследуемых штаммов, независимо от наличия *ctx* гена, на всех субстратах отмечали увеличение концентрации вибрионов на два и более порядка (10^6 , 10^7 м.к./мл). Такая концентрация холерных вибрионов сохранялась на том же уровне весь срок наблюдения.

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

Для изучения влияния условий культивирования на ферментативную активность холерных вибрионов изучены ферменты, обеспечивающие им возможность адаптации к различным экологическим нишам. У всех исследованных штаммов обнаружены N-ацетил-β-D-глюкозаминидазная, твиназная (способность гидролизовать твин-20), ДНК-азная активности, которые сохранялись на протяжении всего

исследования у изученных штаммов при культивировании не ниже 10 °C. Наблюдалась тенденция к снижению алкилсульфатазной активности на поздних этапах исследования. Представляет интерес дальнейшее изучение ферментов холерного вибриона, учитывая важную роль N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы в сохранении/выживании холерных вибрионов во внешней среде [4].

При сопоставлении экспериментальных данных о сроках выживания холерного вибриона P-19787 ctxAB⁺tcpA⁺, выделенного при 25 °C из р. Агура в месте впадения минерального источника в 2015 г., со сроками обнаружения в естественных условиях установлено, что в речной воде с примесью сульфидных минеральных вод холерные вибрионы выделяли 63 дня, в устье – 44, а в морской воде в месте впадения р. Агура – 24 дня. Приведенные данные подтверждают, что речная вода с примесью сульфидной минеральной в случае контаминации холерными вибрионами является благоприятной экологической средой для сохранения микроба и диктует необходимость проведения эпидемиологического расследования для выявления причин нарушения эколого-гигиенического состояния водного объекта. В конкретном случае – в местах разгрузки минерального источника в р. Агура и впадения р. Агура в Черное море.

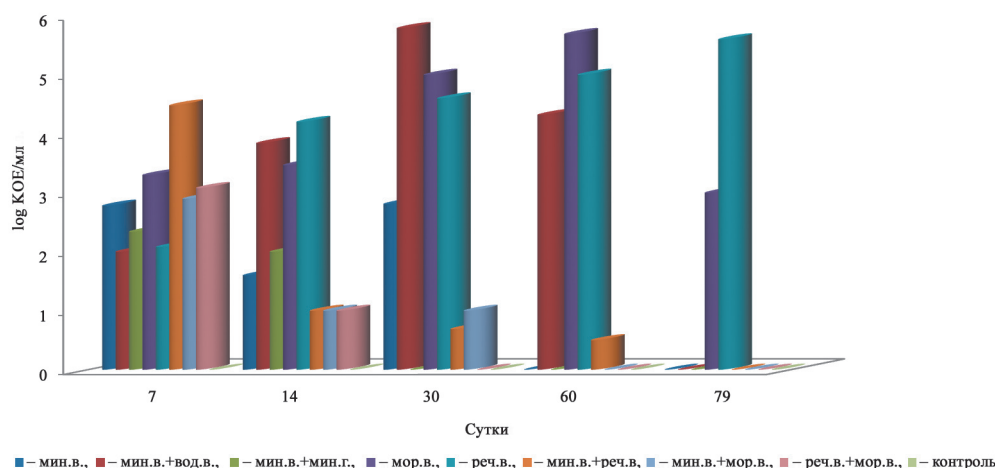


Рис. 2 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-5879 ctx⁺tcp⁺ при 10 °C на различных субстратах

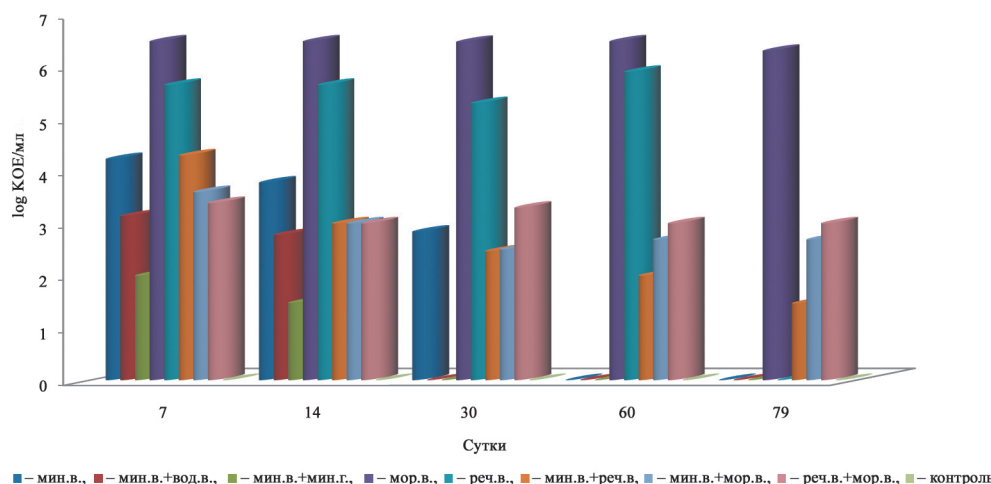


Рис. 3 Динамика концентрации штамма *V. cholerae* El Tor P-19787 stx+cp+ при 10 °C на различных субстратах

Таким образом, холерные вибрионы могут длительное время сохраняться и размножаться в условиях пониженной температуры (не менее 10 °C) на минеральных субстратах в эксперименте. Такая продолжительная персистенция холерных вибрионов с сохранением *stx* гена и ферментативной активности 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 реализации водного пути распространения возбудителя при использовании водоемов для рекреационных целей и свидетельствует о необходимости оптимизации тактики мониторинговых исследований в плане определения дополнительных точек и кратности исследования воды поверхностных водоемов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грижебовский Г.М. Холера на Кавказе. Ставрополь; 1997. 782 с.
2. Дуванова О.В., Шиманюк Н. Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин-20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. *Клин. и лаб. диагностика*. 2000; 5:48–9.
3. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы по алкилсульфатазной активности. Патент 2473697 РФ. Бюл. № 3, опубл. 27.01.2013.
4. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Сорокин В.М. N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2016; 2:41–8.
5. Мазрухо А.Б., Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Москвитина Э.А., Шестиалтынова И.С., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Зубкова Д.А., Кудрякова Т.А., Ежова М.И., Ускова Н.Н., Скачко М.В. Результаты мониторинга за холерными вибрионами акватории Таганрогского залива Азовского моря в 2011–2012 гг. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2013; 6:39–40.
6. Марамонович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 6:63–71.
7. Мединский Г.М., Ладный И.Д., Бичуль К.Г. Влияние сульфидной воды естественных источников на свойства холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1978; 2:125–9.
8. Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С. Изучение эпидемиологической значимости *Vibrio cholerae*, выделяемых из различных экологических систем. *Журн. микробиол., эпидемиол. и*

иммунобиол. 1990; 8:62–8.

9. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Шербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2016; 1:89–101.

10. Саямов Р.М., Зайденев А.М. Выживаемость и свойства холерных вибрионов при культивировании в минеральной воде. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1978; 11:66–70.

11. Сизова Ю.В., Черепашкина И.Я., Бурлакова О.С. Роль температуры поверхностных водоемов в персистенции и биопленкообразовании холерных вибрионов различной эпидемиологической значимости. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5:690.

12. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–27. DOI: 1021055/0370-1069-2016-1-20-27

13. Хотько Н.И., Дмитриев А.П. Водный фактор в передаче инфекции. Пенза; 2002. 232 с.

14. Barua D., Cvjetanović B. Холера в период 1961–1970 гг. В кн.: Принципы и практика борьбы с холерой. Женева; 1970. С. 15–22.

15. Sathiyamuthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Mikrobiol. Res. J.* 2013; 3(4):538–49.

References

1. Grizhebovsky G.M. [Cholera in the Caucasus]. Stavropol; 1997. 782 p.
2. Duvanov O.V., Shiman'yuk N.Ya., Mishan'kin B.N. [Ability to split twin-20 as differential test for cholera vibrios O139 serovar, of different origin]. *Klinich. Lab. Diagnostika*. 2000; 5:48–9.
3. Duvanov O.V., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov S.O., Pisanov R.V. [Method for differentiation between *Vibrio cholerae* strains, O139 serogroup, by reference to alkylsulphatase activity]. RF Patent No 2473697, 27.01.2013.
4. Duvanov O.V., Mishan'kin B.N., Vodop'yanov A.S., Sorokin V.M. [N-acetyl-β-D-glucosaminidase of cholera vibrios]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 2:41–8.
5. Mazrukho A.B., Kruglikov V.D., Monakhova E.V., Moskvitina E.A., Shestaltynova I.S., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Pisanov R.V., Zubkova D.A., Kudryakova T.A., Ezhova M.I., Uskova N.N., Skachko M.V. [Results of monitoring over cholera vibrios in the surface waters of the Gulf of Taganrog, Azov sea, in 2011–2012]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2013; 6:39–40.
6. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V., Kulikalova E.S. [Evolution of cholera epidemiology]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006; 6:63–71.
7. Medinsky G.M., Ladny I.D., Bichul' K.G. [Influence of sulfide water of natural sources on cholera vibrio properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1978; 2:125–9.
8. Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S. [Studies of epidemiological significance of *V. cholerae*, isolated from different ecological systems]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1990; 8:62–8.
9. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Topical issues of epidemiological surveillance, laboratory diagnostics, and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 1:89–101.
10. Sayamov R.M., Zaidenov A.M. [Survivability and properties of cholera vibrios in case of cultivation in mineral water]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1978; 11:66–70.

11. Sizova yu.V., Cherepakhina I.Ya., Burlakova O.S. [The role of temperature of surface water bodies in the persistence and biofilm formation process of cholera vibrios with different epidemiological significance]. *Sovrem. Probl. Nauki b Obrazov.* 2015; 5:690.
12. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006–2015. Prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:20–7. DOI: 1021055/0370-1069-2016-1-20-27.
13. Khot'ko N.I., Dmitrieva A.P. [Water Factor in Infection Transmission]. Penza; 2002. 232 p.
14. Barua D., Cvjetanović B. [Cholera during 1961–1970]. In: [Principles and Practice of Cholera Control]. Geneva; 1970. P. 15–22.
15. Sathiyamuthy K., Baskaran A., Kumar S.D. Prevalence of *Vibrio cholerae* and other vibrios from environmental and seafood sources, Tamil Nadu, India. *Brit. Mikrobiol. Res. J.* 2013; 3(4):538–49.

Authors:

Titova S.V., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Lysova L.K., Arkhangel'skaya I.V., Duvanova O.V., Mironova A.V., Samorodova A.V., Moskvitina E.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Титова С.В., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Лысова Л.К., Архангельская И.В., Дуванова О.В., Миронова А.В., Самородова А.В., Москвитина Э.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 17.06.16.

О.А.Волох, А.В.Комиссаров, М.В.Антонычева, О.А.Лобовикова, Н.Г.Авдеева, Н.И.Вахрушина,
Н.П.Миронова, Д.Н.Бибиков, А.К.Никифоров

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

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

Цель исследования. Разработка и апробация новых биотехнологических приемов в технологии получения живой туляреминой вакцины. **Материалы и методы:** Штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ использовали в качестве штамма-продуцента, штамм *F. tularensis* 503 – в качестве тест-заражающего. Проводили культивирование штамма-продуцента на плотных и жидких питательных средах, тангенциальную ультрафильтрацию на ультра-микрофильтрационной установке «Вива-флоу», лиофилизацию в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L. **Результаты и обсуждение.** Использование сконструированной жидкой питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина и применение глубинного культивирования штамма-продуцента позволило увеличить выход биомассы. На этапе концентрирования культуры туляреминого микроба методом микрофильтрации через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме тангенциального потока жидкости увеличено содержание микробных клеток и проведено освобождение от остатков питательной среды. Проведенный сравнительный анализ полученных по экспериментальной технологии лабораторных серий вакцины с коммерческим препаратом вакцины туляреминой живой показал их соответствие нормативным свойствам. Установлено, что применение новой жидкой питательной среды, глубинного культивирования, способов концентрирования и сепарации биомассы не оказывает отрицательного влияния на основные свойства живой туляреминой вакцины и в дальнейшем позволит в значительной степени повысить технологичность производства.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, живая туляреминая вакцина, питательная среда, культивирование, ультрафильтрация.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

O.A.Volokh, A.V.Komissarov, M.V.Antonycheva, O.A.Lobovikova, N.G.Avdeeva, N.I.Vakhrushina,
N.P.Mironova, D.N.Bibikov, A.K.Nikiforov

Enhancement of the Technology for Live Tularemia Vaccine Production

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

Objective of the study was to develop and test new biotechnological approaches for live tularemia vaccine production. **Materials and methods:** *Francisella tularensis* 15 NIEG strain was used as producer-strain; *Francisella tularensis* 503 strain – as test infecting one. Producer strain was cultivated on solid and liquid nutrient media. Tangential ultrafiltration was performed with the help of microfiltration module "Viva-flow". Lyophilization was conducted using drying installation – Free Zone 2.5 L. **Results and discussion:** Application of the designed liquid nutrient medium on the basis of enzymatic fibrin hydrolysate and submerged cultivation of the producer-strain has allowed for a significant biomass yield increment. At the stage of tularemia microbe culture concentration via microfiltration through filtering membranes with pore size of 0.2 μm, in the mode of tangential liquid flow, increased has been the content of microbe cells; the nutrient media residues – removed. Comparative analysis of the obtained in accordance with experimental technique laboratory series of the vaccine and commercial preparation of live tularemia vaccine has demonstrated their conformity with the specific normative properties. It is established that application of modified liquid nutrient medium, submerged cultivation conditions, methods of biomass concentration and separation has no negative influence on the main properties of live tularemia vaccine and will provide for considerable produce-ability increase in the future.

Key words: *Francisella tularensis*, live tularemia vaccine, nutrient medium, cultivation, ultra-filtration.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Enhancement of the Technology for Live Tularemia Vaccine Production. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:81–84. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-81-84

Вакцинопрофилактика является одним из наиболее развитых направлений противоэпидемической защиты. В РФ для специфической профилактики туляремии применяют туляремию живую сухую вакцину, которая в 2011 г. Приказом Министерства

здравоохранения и социального развития РФ (№ 51н от 31 января 2011 г.) включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

В этой связи становится очевидным необходи-

мость совершенствования технологии производства живой туляремийной вакцины (ЖТВ). Основным компонентом вакцины туляремийной живой сухой являются клетки вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ.

Поиском новых штаммов-кандидатов для живой туляремийной вакцины занимаются как отечественные [3, 4, 6], так и зарубежные исследователи [8, 9, 10, 11, 12, 13]. В настоящее время новая живая туляремийная вакцина не зарегистрирована.

Наша работа по совершенствованию этапов производства живой туляремийной вакцины проводилась в следующих направлениях оптимизации производственного процесса: разработка высокоэффективных жидких питательных сред для глубинного культивирования штамма-продуцента; подбор условий глубинного культивирования; применение щадящих методов концентрирования и сепарации для сохранения максимальной жизнеспособности и иммуногенности вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали штамм-продуцент *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, заражающий тест-штамм голарктического подвида *F. tularensis* 503. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Проведенный контроль свойств штамма-продуцента *F. tularensis* 15 НИИЭГ и заражающего тест-штамма *F. tularensis* 503 показал их соответствие требованиям, предъявляемым МУ 3.3.1.2161-07

В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа ее свойств использовали FT агар (ГНЦ ПБМ, Оболенск).

Культивирование на экспериментальной жидкой питательной среде проводили на биореакторе с рабочим объемом 14 л, на термостатируемом шейкере-инкубаторе «Multitron II» в культуральных колбах объемом 2 и 3 л. Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности – ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл⁻¹. Жизнеспособность определяли высевом на пластинки с FT агаром, учет проводили в течение 5 сут. Тангенциальную ультрафильтрацию проводили на ультра-микрофильтрационной установке «Вивафлоу» через мембраны с размером пор 0,2 мкм. Лиофилизат получали в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L. Температура коллектора – 85 °С. Значение вакуума при проведении процесса сушки – 0,133 мВар. Проверку иммуногенности, безопасности и прививаемости вакцины проводили на модели морских свинок. В качестве заражающего штамма использовали штамм голарктического подвида *F. tularensis* 503 (LD₅₀ 2 м.к.). Время наблюдения после заражения вакцинированных и контрольной групп составляло 30 сут.

Результаты и обсуждение

В технологии производства живой туляремийной вакцины получение биомассы осуществляют на полужидких питательных средах в культуральных флаконах с аэрацией [5]. В условиях глубинного культивирования на биореакторе эффективно использование жидких питательных сред. В связи с этим проведена работа по конструированию жидкой питательной среды для накопления биомассы туляремийного микроба. В результате сконструирована питательная среда на основе ферментативного гидролизата фибрина для глубинного культивирования туляремийного микроба. Использование этой питательной среды позволяло накапливать и получать в течение (20±2) ч высокую концентрацию, до (35±0,5) млрд м.к. в 1 мл среды, жизнеспособной, КОЕ (62±20) %, биомассы *F. tularensis*. Степень диссоциации составляла менее 5 % (отмечено (97±1) % SR – белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших. Культурально-морфологические признаки были типичные для туляремийного микроба: мелкие кокковидные палочки, неподвижные, грамтрицательные. Культура агглютинировалась туляремийной сывороткой до титра 1:3200. Показатель эффективности среды на основе гидролизата фибрина был в 2 раза выше по сравнению со средой, полученной на основе панкреотического гидролизата рыбкопной муки. Использование в составе жидкой среды гидролизата фибрина, являющегося отходом сывороточно-вакцинного производства, позволяет утилизировать отходы и снижает загрязнение внешней среды, а также повышает рентабельность производства вакцины за счет использования экономически выгодной питательной среды. Сконструированная питательная среда расширяет спектр питательных сред для накопления бактериальной массы *F. tularensis* в условиях глубинного культивирования. На разработанную питательную среду был получен патент на изобретение [1].

Введение в технологический процесс выращивания туляремийного микроба дополнительных операций отъемно-доливного метода в экспоненциальной фазе роста [7] позволило при однократной подготовке посевного материала увеличить выход биомассы, что привело к сокращению временных затрат и дало возможность получить максимальное количество биомассы с однотипными свойствами.

Следующим этапом было совершенствование сепарации выращенной биомассы с целью получения высококонцентрированной, не контаминированной посторонней микрофлорой, жизнеспособной клеточной массы. Для этого разработан способ концентрирования микробной массы путем микрофильтрации культуры туляремийного микроба через мембраны с размером пор 0,2 мкм в режиме тангенциального потока жидкости. Возможность использования микрофильтрационного концентрирования микробных клеток туляремии в режиме тангенциального потока жидкости установлена нами экспериментальным путем.

Экспериментальная вакцина туляремийная живая сухая

Показатель	Метод	Норма	Сер. 005	Сер. 006	Сер. 009	Сер. 010
Описание	Визуальный	Пористая желтовато-белая масса	+	+	+	+
Подлинность	Иммуно-флуоресцентный	Должна быть чистая культура вакцинного штамма туляремийного микроба	+	+	+	+
Время растворения, мин	Визуальный	В течение 3 мин	0,5	0,5	0,5	0,5
pH	Потенциометрический, ГФ XII	7,0±0,2	7,1	7,2	7,2	7,1
Размер частиц	ГФ XI	Суспензия должна свободно проходить в шприц через иглу № 0840	+	+	+	+
Отсутствие посторонней микрофлоры	Бактериологический	Не должна содержать посторонних бактерий и грибов	+	+	+	+
Безопасность	Биологический	Должна быть безвредной	+	+	+	+
Специфическая активность	Визуальный Бактериологический	От $1 \cdot 10^{10}$ до $3 \cdot 10^{10}$ м.к. в 1 мл	$1,2 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{10}$
концентрация микробных клеток, м.к.		Не менее 40 %	40	42	47	48
живые микробные клетки, %		Число SR (белых) иммуногенных колоний не менее 80 %	96	98	92	87
Степень диссоциации, %						
Количество накожных доз	По разделу «Специфическая активность»	От 15 до 50 накожных доз в ампуле	15	21	47	63
Прививаемость, мм	Биологический	При накожной иммунизации морских свинок (м.св.) дозой $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в 0,1 мл должна вызывать реакцию в виде инфильтрата и гиперемии диаметром от 5 до 15 мм вокруг насечек	5	5	9	10
Иммуногенность	Биологический	Не менее 8 из 10 морских свинок, привитых накожно $2 \cdot 10^7$ живых м.к. в объеме 0,1 мл, должны быть предохранены от гибели при подкожном заражении 1000 Dcl тест-заражающего штамма туляремийного микроба голярктической расы, 1 Dcl которого не должна превышать 5 м.к.	10 из 10 м.св. живы	8 из 10 м.св. живы	10 из 10 м.св. живы	9 из 10 м.св. живы

Примечание: «+» – соответствие нормативным показателям, «-» – несоответствие нормативным показателям.

Культуру *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ выращивают методом глубинного культивирования на подготовленной жидкой питательной среде при температуре 37 °C в течение (20±2) ч. После окончания процесса культивирования нативная культура *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имеет следующие характеристики: pH 7,0±0,1, концентрация микробных клеток (35±0,50) млрд кл. мл⁻¹ (по ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл⁻¹), коэффициент жизнеспособности (62±0,5) %, посторонняя микрофлора отсутствует. Далее полученную микробную суспензию *F. tularensis* подвергают тангенциальной микрофльтрации на ультра-микрофльтрационной установке «Вива-флоу» через мембраны с размером пор 0,2 мкм до сокращения объема микробного осадка в четыре раза. При необходимости добавляют в концентрат стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида до восстановления исходного объема нативной культуры и процесс концентрирования повторяют. Полученный концентрат микробных клеток имел следующие характеристики: pH 7,2±0,1, концентрация микробных клеток – (135±1,0) млрд кл. мл⁻¹ (по отраслевому стандарту мутности ФГБУ НЦЭСМП), коэффици-

ент жизнеспособности – (60±0,1) %, посторонняя микрофлора отсутствует. Контроль специфической стерильности фильтрата свидетельствовал об отсутствии в нем туляремийного микроба, что говорит о правильном подборе размера пор мембран.

В результате получали концентрат микробных клеток туляремийного микроба пригодный по своим характеристикам для получения живой туляремийной вакцины. В полученном концентрате не происходило ухудшения характеристик (в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ после ее глубинного культивирования). В частности, pH и коэффициент жизнеспособности оставались на прежнем уровне и не происходило контаминации посторонней микрофлорой, а концентрация увеличивалась в 3–4 раза. На данное изобретение получен патент [2].

В результате по усовершенствованной технологии получено 10 лабораторных серий экспериментальной живой туляремийной вакцины (ЭЖТВ). Из них 4 серии прошли контроль на соответствие нормативным показателям. Результаты основных показателей представлены в таблице.

В течение 2 лет (2014–2015 гг.) проводили анализ стабильности препарата ЭЖТВ по показателям спе-

цифической активности. Было установлено, что жизнеспособность снижается до 30–35 % к концу первого года и до 10–15 % к концу второго года хранения при 4 °С. Это может быть связано с условиями сушки препарата (проводили в сублимационной сушильной установке FreeZone 2,5 L) и запайки ампул (без вакуума). Для решения вопроса стабильности необходимо проведение дальнейших исследований по оптимизации условий сушки микробной массы для получения готовой лекарственной формы препарата.

Таким образом, применение новой жидкой питательной среды, глубинного культивирования, способов концентрирования и сепарации биомассы, а также оптимизированных условий сушки позволит в значительной степени повысить технологичность производства живой туляремийной вакцины.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент 2518282 РФ. Бюл. № 16, опублик. 10.06.2014.
2. Волох О.А., Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г. Способ получения концентрата микробных клеток для получения живой туляремийной вакцины. Патент 2528878 РФ. Бюл. № 26, опублик. 20.09.2014
3. Кисличкин Н.Н., Кисличкина О.Н. Живая туляремийная вакцина Nik-sp. *Francisella tularensis*. Патент 2308969 РФ. Бюл. № 30, опублик. 27.10.07.
4. Мешерякова И.С. Туляремия. В кн.: Природная очаговость болезней: исследования института им. Н.И.Гамалеи РАМН. М.; 2003. С. 137–60.
5. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
6. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.: ООО «ТиРу»; 2012. 267 с.
7. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М. Способ получения биомассы туляремийного микроба. Патент 2451743 РФ. Бюл. № 15, опублик. 27.05.2012.
8. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccine against tularemia. *Hum. Vaccine*. 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
9. Conlan J.W., Oyston P.C.F. Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:325–50. DOI: 10.1196/annals.1409.012.
10. Forslund A.L., Kuoppa, Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Bystro M., Oyston P.C.F., Michell S.L., Titball R.W. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
11. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R. *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4341–55. DOI: 10.1128/IAI.00192-10.
12. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
13. Reed D.S., Smith L'K.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 2(5):2098–2105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

References

1. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina I.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, 10.06.2014.
2. Volokh O.A., Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G. [Method for the production of microbe cell concentrate for manufacturing live tularemia vaccine]. RF Patent No 2528878, 20.09.2014.
3. Kislichkin N.N., Kislichkina O.N. [Live tularemia vaccine Nik-sp. *Francisella tularensis*]. RF Patent No 2308969, 27.10.07.
4. Meshcheryakova I.S. [Tularemia]. In: [Natural Focality of Diseases: Studies of the RAMS Research Institute after the Name of N.I. Gamaleya]. M.; 2003. P. 137–60.
5. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology, and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. M.: Meditsina; 1975. 190 p.
6. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Molecular-Genetic Studies of Bacteria *Francisella* and their Applied Significance]. M.: "TiRu" Ltd.; 2012. 267 p.
7. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremine S.A., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M. [Method of tularemia microbe biomass production]. RF Patent No 2451743, 27.05.2012.
8. Barry E.M., Cole L.E., Santiago A.E. Vaccine against tularemia. *Hum. Vaccine*. 2009; 5(12):832–8. DOI: 10.4161/hv.10297.
9. Conlan J.W., Oyston P.C.F. Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:325–50. DOI: 10.1196/annals.1409.012.
10. Forslund A.L., Kuoppa, Svensson K., Salomonsson E., Johansson A., Bystro M., Oyston P.C.F., Michell S.L., Titball R.W. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1818–30. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05061.x.
11. Jia Q., Lee B.Y., Bowen R. *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) mutant with a deletion in capB, encoding a putative capsular biosynthesis protein, is significantly more attenuated than LVS yet induces potent protective immunity in mice against *F. tularensis* challenge. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4341–55. DOI: 10.1128/IAI.00192-10.
12. Marohn M.E., Barry E.M. Live attenuated tularemia vaccines: recent developments and future goals. *Vaccine*. 2013; 31(35):3485–91. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.05.096.
13. Reed D.S., Smith L'K.P., Cole K.S., Santiago A.E., Mann B.J., Barry E.M. Live attenuated mutants of *Francisella tularensis* protect rabbits against aerosol challenge with a virulent type A strain. *Infect. Immun.* 2014; 2(5):2098–2105. DOI: 10.1128/IAI.01498-14.

Authors:

Volokh O.A., Komissarov A.V., Antonycheva M.V., Lobovikova O.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina I.I., Mironova N.P., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Волох, О.А. Комиссаров А.В., Антонычева М.В., Лобовикова О.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина И.И., Миронова Н.П., Бибииков Д.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.08.15.

З.Л.Девдариани, Н.А.Сырова, Е.А.Михеева, И.В.Терехова, Н.М.Ермаков, Г.В.Григорьева,
О.А.Лобовикова, И.В.Шульгина

КОНСТРУИРОВАНИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ ИСПЫТАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КАПСУЛОСОДЕРЖАЩИХ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА «ИФАПЕСТФ1-М»

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

Цель исследований. Разработка и медицинские испытания «Тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1-М)». **Материалы и методы.** В работе использованы материалы для постановки сэндвич-варианта ИФА. В качестве диагностического иммунореагента применяли МКА 1В3 к F1 *Y. pestis*. Для определения чувствительности и специфичности сконструированной иммуноферментной тест-системы исследованы образцы 24 природных и генетически модифицированных pFra⁺ и pFra⁻ штаммов *Y. pestis* и 56 штаммов гетерологичных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. **Результаты и выводы.** На основе моноклональных антител к капсульному антигену *Yersinia pestis* разработана «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)», которая характеризуется высокой специфичностью и позволяет выявлять капсулосодержащие штаммы возбудителя чумы в образцах биологического материала и проводить идентификацию чистых культур с чувствительностью $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ м.к./мл. Она не уступает по основным параметрам препарату сравнения «Иммуноглобулином диагностическим чумным флуоресцирующим адсорбированным лошадиным», лиофилизату для диагностических целей, производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», обладая при этом такими преимуществами, как объективный учет результатов анализа и возможность их документирования. Диагностическая моноклональная тест-система (ИФАПестФ1-М) зарегистрирована в Росздравнадзоре № РЗН 2013/711 от 31.05.2013 г. в соответствии с приказом № 2161-Пр. 113 от 31.05.2013 г. и допущена к обращению на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, капсульный антиген Ф1, моноклональные антитела, диагностическая тест-система, иммуноферментный анализ, иммунодиагностика.

Корреспондирующий автор: Девдариани Зураб Леванович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Z.L.Devdariani, N.A.Syrova, E.A.Mikheeva, I.V.Terekhova, N.M.Ermakov, G.V.Grigor'eva,
O.A.Lobovikova, I.V.Shul'gina

Construction and Medical Trials of Monoclonal Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Encapsulated Plague Agent Strains, "EIAPESTF1-M"

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

Objective of the study was to develop and then conduct medical trials of the "Monoclonal immune-enzyme test-system for the detection of plague agent ("EIAPESTF1-M"). **Materials and methods.** Utilized were materials for carrying out sandwich EIA. MCA 1B3 to *Y. pestis* F1 served as diagnostic immune-reagent. To determine sensitivity and specificity of the designed immune-enzyme test-system, investigated were samples of 24 natural and genetically modified pFra⁺ and pFra⁻ *Y. pestis* strains and 56 strains of heterologous bacteria *Enterobacteriaceae* family. **Results and conclusions.** Based on monoclonal antibodies to *Yersinia pestis* capsular antigen, constructed was "Monoclonal immune-enzyme test-system for the detection of plague agent ("EIAPESTF1-M"), which is characterized by high specificity and allows for the detection of encapsulated plague agent strains in biological samples and for identification of pure cultures with sensitivity of $5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ mc/ml. It is highly competitive with comparator drug – "Diagnostic fluorescent absorbed equine plague immunoglobulins", lyophilizate for diagnostic purposes, by RusRAPI "Microbe". It possesses such advantages as objective result recording and capability of result documentation. "EIAPESTF1-M" is registered in the RF Federal Service for Surveillance in the Sphere of Healthcare and Social Development, reference No 2013/711, dated 31.05.2013 and approved for use in the territory of the Russian Federation.

Key words: *Yersinia pestis*, capsular antigen F1, monoclonal antibodies, diagnostic test-system, enzyme immune-assay, immunodiagnostics.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Zurab L. Devdariani, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Construction and Medical Trials of Monoclonal Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Encapsulated Plague Agent Strains, "EIAPESTF1-M". *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:85–89. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-85-89

На территории стран Содружества Независимых Государств действует 42 природных очага чумы, расположенных в равнинных и горных ландшафтах

Кавказа и Закавказья, Северо-Западного и Северного Прикаспия, Средней Азии, Сибири и характеризующихся различной биоценотической, эпизоотической

и эпидемической активностью [2, 4]. В настоящее время сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка и неблагоприятный прогноз эпизоотической ситуации в очагах Северо-Западного Прикаспия и Сибири [6]. Чума в природных очагах регистрируется в виде спорадических случаев или разлитых эпизоотий в популяциях диких грызунов, как правило, основных носителей. В эпизоотический процесс могут вовлекаться также второстепенные и случайные носители из числа диких животных и синантропных грызунов [5], при этом возможно заражение чумой человека [3].

В связи с вышеизложенным по-прежнему актуальной остается разработка новых препаратов для детекции *Yersinia pestis*. Особый интерес представляет конструирование иммуноферментных тест-систем на основе моноклональных антител (МКА), которые, благодаря своей способности к взаимодействию с уникальным диагностически значимым эпитопом поверхностно расположенного бактериального антигена, обеспечивают строгую специфичность моноклональных диагностикумов [7, 8].

Отсутствие в Российской Федерации современных эффективных иммунодиагностических препаратов для обнаружения возбудителя чумы при проведении эпизоотологического обследования природных очагов этой инфекции предопределило цель данного исследования по разработке и внедрению в практику здравоохранения диагностической иммуноферментной тест-системы, основу которой составили моноклональные антитела к капсульному антигену (Ф1) *Y. pestis*.

Материалы и методы

В сконструированной тест-системе реализован сэндвич-вариант ИФА. Для сенсibilизации полистироловых планшетов отечественного производства (Медполимер, Россия), использованных в качестве твердой фазы, применяли МКА 1В₃ к Ф1 *Y. pestis*, выделенные методом высаливания [8] из асцитических жидкостей зараженных гибридомой *Y. pestis* 1В₃ мышей инбредной линии BALB/c в концентрации 10 мкг/мл. Свободные сайты на пластике блокировали 0,5 % раствором молока обезжиренного сухого (ГОСТ 10970–87). Капсульный антиген чумного микроба, содержащийся в исследуемом материале, после связывания с моноклональными иммуноглобулинами проявляли при помощи МКА 1В₃, конъюгированных с пероксидазой хрена перйодатным методом [8], в рабочем разведении. Положительным контрольным образцом (ПКО-ЧМ) служила инактивированная сухая взвесь *Y. pestis* EV в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл.

В отрицательный контроль вносили фосфатно-солевой буферный раствор.

Высушивание пероксидазного конъюгата и ПКО-ЧМ осуществляли с использованием центрифуги-концентратора CentriVar 7310030 (Labconco, США)

при температуре 4 °С, скорости вращения ротора 1425 об/мин и давлении $1 \cdot 10^{-4}$ торр. В качестве стабилизатора к препаратам добавляли 3 % сахарозы. После высушивания активность препаратов определяли в непрямом ИФА.

Хромогенным субстратом в ИФА служил 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt (ABTS) (Sigma, США).

На этапах разработки тест-системы ИФАПестФ1-М исследовали образцы инактивированных микробных взвесей 24 природных и генетически модифицированных pFra⁺ и pFra⁻ штаммов *Y. pestis*, а также 56 штаммов гетерологичных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в различных концентрациях, смешанные культуры бактерий, а также искусственно контаминированный указанными микроорганизмами биологический материал (сыворотки крови человека, суспензии внутренних органов лабораторных аутбредных мышей). Работу с патогенными бактериями и обеззараживание биологического материала проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» [1].

При проведении медицинских испытаний тест-системы использовали инактивированные чистые культуры 24 штаммов *Y. pestis* в концентрации $1 \cdot 10^7$, $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^5$ м.к./мл (всего 72 образца), чистые культуры гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, включая *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei* (20 образцов), пробы сыворотки крови человека, контаминированной *Y. pestis* (21 образец), пробы сыворотки крови человека, контаминированной гетерологичными микроорганизмами (10 образцов), суспензии внутренних органов мышей, контаминированные *Y. pestis* (21 образец), суспензии внутренних органов мышей, контаминированные гетерологичными бактериями (9 образцов).

Все виды материала тестировали с применением экспериментальных серий тест-системы, приготовленных *ex tempore*, а также хранившихся в течение шести месяцев.

Учет результатов анализа осуществляли визуально и спектрофотометрически с использованием мультканального фотометра «Multiskan EX» (Китай) при длине волны 405 нм. Результат анализа считали положительным, если показатель оптической плотности опытного образца (ОП)обр в 2 или более раз превышал показатель оптической плотности контрольного образца (К)обр.

В качестве препарата сравнения при проведении медицинских испытаний использовали «Иммуноглобулины диагностические чумные флуоресцирующие адсорбированные лошадиные, лиофилизат для диагностических целей, производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (серия 110). Подготовку и исследование материала про-

водили в соответствии с инструкцией по применению иммуноглобулинов. Окрашенные мазки просматривали под люминесцентным микроскопом Primo Star iLED (Carl Zeiss, Германия) с использованием иммерсионного масла. Учет результатов осуществляли визуально по четырехкрестовой системе.

Результаты и обсуждение

Иммунореагентную основу тест-системы «ИФАПестФ1-М» составили МКА к диагностически значимому антигену *Y. pestis* – Ф1 [5, 10], что обеспечило специфичность и стандартность разработанно-

Таблица 1

Результаты исследования проб биологического материала, контаминированного различными штаммами *Y. pestis*, с использованием тест-системы иммуноферментной для детекции чумного микроба моноклональной (ИФАПестФ1-М)

Вид биологического материала	Штамм, использованный для контаминации	Концентрация микроорганизмов в образце (м.к./мл)	Серия 02			Серия 03		
			ОПср (К-)×2 / ОП (К+)	ОП образцов ОП1/ОП2/ОПобр	Оценка результата	ОПср (К-)×2 / ОП (К+)	ОП образцов ОП1/ОП2/ОПобр	Оценка результата
Сыворотка крови человека	<i>Y. pestis</i> A-1108 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	0,081 /1,503	0,675/0,669/ 0,672	Полож.	0,081 /1,448	0,661/0,662/ 0,662	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,535/0,526/ 0,531	Полож.	«	0,541/0,537/ 0,539	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.
	<i>Y. pestis</i> 231 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,655/0,721/ 0,688	Полож.	«	0,652/0,730/ 0,691	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,502/0,592/ 0,547	Полож.	«	0,504/0,587/ 0,546	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,053/0,041/ 0,047	Отр.	«	0,053/0,042/ 0,048	Отр.
	<i>Y. pestis</i> 2377 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,709/0,606/ 0,658	Полож.	«	0,708/0,586/ 0,647	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,614/0,483/ 0,549	Полож.	«	0,619/0,487/ 0,553	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,039/ 0,041	Отр.	«	0,043/0,039/ 0,041	Отр.
	<i>Y. pestis</i> KM-225 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,822/0,733/ 0,778	Полож.	«	0,817/0,737/ 0,777	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,595/0,537/ 0,566	Полож.	«	0,586/0,543/ 0,565	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,039/0,044/ 0,042	Отр.	«	0,039/0,044/ 0,042	Отр.
	<i>Y. pestis</i> И-3131 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,673/0,649/ 0,661	Полож.	«	0,673/0,651/ 0,662	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,463/0,585/ 0,524	Полож.	«	0,463/0,546/ 0,505	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,041/0,050/ 0,046	Отр.	«	0,042/0,050/ 0,046	Отр.
	<i>Y. pestis</i> И-3358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	0,074 /1,952	0,556/0,522/ 0,539	Полож.	0,075 /1,991	0,582/0,550/ 0,566	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,398/0,522/ 0,460	Полож.	«	0,407/0,557/ 0,482	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,042/0,038/ 0,040	Отр.	«	0,042/0,038/ 0,040	Отр.
Суспензия внутренних органов мышей	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,808/0,869/ 0,839	Полож.	«	0,840/0,900/ 0,870	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,362/0,407/ 0,386	Полож.	«	0,378/0,422/ 0,400	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,081/0,094/ 0,088	Полож.	«	0,085/0,103/ 0,094	Полож.
	<i>Y. pestis</i> M-1814 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,867/0,824/ 0,846	Полож.	«	0,903/0,861/ 0,882	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,371/0,393/ 0,382	Полож.	«	0,392/0,405/ 0,399	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,080/0,074/ 0,077	Полож.	«	0,082/0,077/ 0,080	Полож.
	<i>Y. pestis</i> A-1122 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,784/0,961/ 0,873	Полож.	«	0,810/1,002/ 0,906	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,359/0,456/ 0,408	Полож.	«	0,373/0,473/ 0,423	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,087/ 0,081	Полож.	«	0,077/0,089/ 0,083	Полож.
	<i>Y. pestis</i> И-3131 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,907/0,859/ 0,883	Полож.	«	0,943/0,894/ 0,919	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,428/0,384/ 0,406	Полож.	«	0,444/0,396/ 0,420	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,072/ 0,074	Отр.	«	0,078/0,076/ 0,077	Полож.
	<i>Y. pestis</i> И-3358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,828/0,827/ 0,828	Полож.	«	0,859/0,874/ 0,867	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,391/0,370/ 0,381	Полож.	«	0,405/0,395/ 0,400	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,074/0,069/ 0,072	Отр.	«	0,077/0,074/ 0,076	Полож.
	<i>Y. pestis</i> M-570 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,675/0,789/ 0,732	Полож.	«	0,690/0,816/ 0,753	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,382/0,398/ 0,390	Полож.	«	0,402/0,417/ 0,410	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,075/0,079/ 0,077	Полож.	«	0,078/0,081/ 0,080	Полож.
	<i>Y. pestis</i> C-358 (pFra ⁺)	1·10 ⁷	«	0,820/0,811/ 0,816	Полож.	«	0,855/0,834/ 0,845	Полож.
	«	1·10 ⁶	«	0,344/0,358/ 0,351	Полож.	«	0,361/0,375/ 0,368	Полож.
	«	1·10 ⁵	«	0,073/0,073/ 0,073	Отр.	«	0,076/0,076/ 0,076	Полож.

Примечания: ОП1 – оптическая плотность в 1-й лунке; ОП2 – оптическая плотность во 2-й лунке; ОПобр – среднее арифметическое значение двух лунок с одинаковым образцом.; ОПср(К-) – среднее арифметическое значение в лунках с отрицательным контрольным образцом; ОП (К+) – значение оптической плотности в лунках с положительным контролем.

го препарата.

На первом этапе исследований тест-систему «ИФАПестФ1-М» применяли для тестирования чистых культур микроорганизмов. Из 24 штаммов *Y. pestis* 23 культуры (95,8 %) выявлены в минимальной концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к./мл; лишь 1 штамм (*Y. pestis* 2377 (pFra⁺) (4,2 %) обнаружен в более низкой концентрации – $1 \cdot 10^5$ м.к./мл. В связи с этим в последующих экспериментах *Y. pestis* использовали в трех концентрациях – $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^7$ м.к./мл. Ни с одним из тестируемых штаммов гетерологичных бактерий взаимодействия не зарегистрировано, что подтверждает высокую специфичность МКА 1В₃, полученных к капсульному антигену чумного микроба.

При исследовании смешанных культур и искусственно контаминированного биологического материала с помощью тест-системы «ИФАПестФ1-М» показатель чувствительности совпадал с таковым при тестировании чистых культур. Положительная реакция отмечалась только с пробами, содержащими pFra⁺ штаммы *Y. pestis*.

С целью увеличения стабильности и срока хранения моноклонального чумного конъюгата и ПКО-ЧМ после проведения предварительных исследований с жидкими формами названных реагентов осуществляли их высушивание под вакуумом, используя методику, предложенную нами ранее [7]. Оказалось, что реакционная способность ПКО-ЧМ после высушивания сохранялась. В то же время активность конъюгата снижалась в среднем на 20 %, что нередко отмечается при высушивании белковых препаратов [9]. Изменения активности высушенных форм реагентов в течение срока наблюдения (6 месяцев) не происходило, что позволило сделать вывод о приемлемости включения их в состав тест-системы «ИФАПестФ1-М».

Следующим этапом стало изучение стабильности скомпонованной тест-системы при хранении. Результаты тестирования образцов, аналогичных вышеописанным, с использованием экспериментальных серий тест-систем, хранившихся в течение 3 и 6 месяцев, полностью коррелировали с таковыми, полученными при применении реагентов, приготовленных непосредственно перед постановкой ИФА. Это свидетельствовало о стабильности разработанного диагностикума в течение срока наблюдения.

При проведении медицинских испытаний использовали 2 серии (02 и 03) набора реагентов «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)». Всего исследовано 153 образца чистых культур микроорганизмов и контаминированного биоматериала.

Установлено, что тест-система «ИФАПестФ1-М» позволяет выявлять капсулосодержащие штаммы чумного микроба в чистых культурах и биологическом материале от людей и животных в минимальной концентрации $5 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.к./мл при отрицательной реакции с гетерологичными бактериями. Чумной ми-

кроб выявлен в концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к./мл в 100 % случаев, а в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл – в 8,3.

При испытании тест-системы «ИФАПестФ1-М» серий 02 и 03 отмечалось допустимое расхождение среди положительных результатов в 2,0 % случаев, преимущественно при исследовании биологического материала (таблица). Расхождения по отрицательным результатам не было. Тест-система «ИФАПестФ1-М», не уступая по основным параметрам препарату сравнения, обладала такими несомненными преимуществами как отсутствие субъективности учета реакции и возможность документирования результатов анализа.

Разработанный набор реагентов «Тест-система иммуноферментная для детекции чумного микроба моноклональная (ИФАПестФ1-М)» зарегистрирован в Росздравнадзоре № РЗН 2013/711 от 31.05.2013 и допущен к обращению на территории Российской Федерации.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118–13. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2014. 195 с.
2. Бурделов Л.А., редактор. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан. Алматы; 2012. 232 с.
3. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2004. 192 с.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
6. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малеев О.В., Григорьев М.П., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы РФ в 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:10–7.
7. Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Иваненко И.Л., Захарова Н.Б., Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Конструирование и медицинские испытания моноклональной до-иммуноферментной тест-системы для детекции туляремийного микроба «ДИАТул-М». *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:42–5.
8. Фримель Г., редактор. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
9. Abdou-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1886–916. DOI: 10.1002/jps.20842.
10. Butler T. Plague into the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(5):736–42. DOI: 10.1086/604718.

References

1. [Safety of work with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity (hazard)]. SR 1.3.3118–13. M.: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of the Rosпотребнадзор; 2014. 195 p.
2. Burdelov L.A., editor. [Atlas of Dissemination of Particularly Dangerous Infections in the Republic of Kazakhstan]. Amaty; 2012. 232 p.
3. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky

E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.

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

5. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: "Shiko"; 2013. 560 p.

6. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A., Fedorov Yu.M., Popov V.P., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Chipanin E.V., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Grigor'ev M.P., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kuttyrev V.V. [Epizootic activity of natural plague foci in the territory of the Russian Federation in 2014 and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:10–7.

7. Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Ivanenko I.L., Zakharova N.B., Bezrukova G.A., Spirin V.F. [Constructing and medical trials of a monoclonal dot-immuno-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:42–5.

8. Frimel G., editor. [Immunological Methods]. M.: Meditsina; 1987. 472 p.

9. Abdul-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1886–916. DOI: 10.1002/jps.20842.

10. Butler T. Plague into the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49(5):736–42. DOI: 10.1086/604718.

Authors:

Devdariani Z.L., Syrova N.A., Mikheeva E.A., Terekhova I.V., Ermakov N.M., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Девдариани З.Л., Сырова Н.А., Михеева Е.А., Терехова И.В., Ермаков Н.М., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 13.01.16.

А.В.Степанов, Н.В.Майоров, Н.А.Осина, А.К.Никифоров

ПУТИ ОПТИМИЗАЦИИ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

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

Цель работы. Изучение влияния активатора, окислителя и деблокирующего раствора на количественный выход олигонуклеотидов при производстве тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол». **Материалы и методы.** В качестве объекта исследований были выбраны праймеры ctx2 и ctx3, входящие в состав «Тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол». Для проведения исследований использовали экспериментальные составы растворов для деблокирования, активатора и окислителя и «стандартные» растворы, рекомендованные производителем ООО «Биоссет». Специфическую активность синтезированных праймеров ctx2 и ctx3 проверяли с использованием трех штаммов *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 и *E. coli* 12226 O-55, готовили бактериальную суспензию возбудителей с конечной концентрацией $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ м.к./мл. ДНК выделяли методом нуклеосорбции в присутствии гуанидинизотиоцианата. **Результаты и вывод.** Показана возможность оптимизации производства генодиагностических препаратов путем увеличения выхода олигонуклеотидов при фосфорамидитном синтезе за счет использования в качестве деблокирующего раствора 3 % дихлоруксусной кислоты в дихлорметане и окислителя – 0,1 М раствор йода в уксусной кислоте и пиридине в соотношении 1:9. Применение таких реагентов увеличивает выход конечного продукта (праймеров) на 6 и 95 % соответственно. Использование усовершенствованной технологии синтеза позволит снизить затраты на дорогостоящие импортные реагенты и повысить количество выпускаемых генодиагностических препаратов для детекции особо опасных патогенов.

Ключевые слова: синтез олигонуклеотидов, деблокирование, активация, окисление.

Корреспондирующий автор: Степанов Андрей Владимирович, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, N.A.Osina, A.K.Nikiforov

Approaches to Optimization of Oligonucleotide Synthesis during Manufacturing of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

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

Objective of the study is to investigate the impact of activator, oxidize, and unblocking solution on the quantitative yield of oligonucleotides during manufacturing of the test-system for *Vibrio cholerae* (ctxA+) DNA detection "GenChol", using polymerase chain reaction. **Materials and methods.** The subject of the study is ctx2 and ctx3 primers, incorporated in the test-system "GenChol". Utilized have been experimental formulations of solutions for unblocking, activator, and oxidizer and "standard" solutions, recommended by the manufacturer "BioSet" Ltd. Specific activity of the synthesized primers ctx2 and ctx3 has been evaluated on three different strains: *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 and *E. coli* 12226 O-55. Bacterial suspension from the pathogen with final concentration of $1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ m.c./ml has been produced. The DNA has been isolated applying nucleosorption in presence of guanidinium isothiocyanate. **Results and conclusions.** Demonstrated is the possibility of optimization of diagnostic preparation production via increment of oligonucleotide yield in the process of phosphoramidite synthesis, due to application of 3% dichloroacetic acid in dichloromethane as unblocking solution and oxidizer – 0.1 M iodine in acetic acid and pyridine in the ratio of 1:9. Utilization of such reagents increases the yield of the end product (primers) by 6 and 95 %, respectively. Enhanced technology for oligonucleotide synthesis will provide for the reduction of costs, associated with expensive imported reagents and the raise in the numbers of gene-diagnostic preparations for the detection of particularly dangerous pathogens.

Key words: oligonucleotide synthesis, unblocking, activation, oxidation.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Andrey V. Stepanov, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Citation: Stepanov A.V., Mayorov N.V., Osina N.A., Nikiforov A.K. Approaches to Optimization of Oligonucleotide Synthesis during Manufacturing of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 3:90–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-90-94

Приоритетными задачами для поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия Российской Федерации являются исследования, направленные на разработку новых высокоэффективных препаратов для лабораторной диагностики возбудителей особо опасных инфекций и совершенствование технологии их изготовления.

На сегодняшний день среди признанных методов лабораторной диагностики необходимо отметить полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Она позволяет в течение 2–4 ч детектировать ДНК (РНК) особо опасных патогенов и в настоящее время хорошо адаптирована к применению в Российских лабораториях

Своевременное обеспечение препаратами для генной индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций лабораторий территориального, регионального и федерального уровней, а также специализированных противоэпидемических формирований (СПЭБ) является мощным фактором в обеспечении биологической безопасности РФ и противодействии возможным проявлениям биологического терроризма.

С 2003 г. лаборатория генодиагностических препаратов РосНИПЧИ «Микроб» в рамках Межгосударственного центра по генной диагностике особо опасных инфекций производит зарегистрированные ПЦР-тест-системы и наборы реагентов для выявления ДНК чумы, холеры, сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии.

Одним из важных компонентов генодиагностических препаратов являются олигонуклеотидные праймеры, представляющие собой химически синтезированные одноцепочечные фрагменты ДНК. В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» используется технология твердофазного фосфорамидитного синтеза, включающая несколько химических реакций, замкнутых в цикл: деблокирование, конденсация, кэппирование, окисление с последующим аммонолизом, необходимым для снятия олигонуклеотидов с полимерного носителя [3].

Необходимо отметить, что каждый этап синтеза и используемые в нем растворы оказывают существенное влияние на количество и качество конечного продукта [4]. Кроме того, сам процесс синтеза, используемое в нем оборудование и реагенты относятся к высоким технологиям и являются чрезвычайно затратными. В связи с этим представляется актуальным проведение работ по оптимизации каждого из этапов синтеза праймеров с целью увеличения выхода целевого продукта и снижения себестоимости производимого препарата.

Целью работы явилось изучение влияния активатора, окислителя и деблокирующего раствора на количественный выход олигонуклеотидов при производстве тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол».

Материалы и методы

В качестве объекта исследований были выбраны праймеры ctx2 и ctx3, входящие в состав «Тест-системы для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции «ГенХол» (ФСР 2007/00100). Синтез олигонуклеотидов проводили в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом.

Для проведения исследований использовали экспериментальные составы растворов для деблокирования, активатора и окислителя и «стандартные» растворы, рекомендованные производителем ООО

«Биоссет». Состав каждого раствора представлен далее по тексту.

В качестве деблокирующих растворов применяли: № 1 (Dbl № 1) – 3 % трихлоруксусная кислота (Serva, Германия) в дихлорметане (Panreac, Испания); № 2 (Dbl № 2) – 3 % дихлоруксусная кислота (Sigma-Aldrich, США) в дихлорметане; № 3 (Dbl № 3) – 3 % дихлоруксусная кислота в 1,2-дихлорэтане (Panreac, Испания); № 4 (Dbl № 4) – 1 % трихлоруксусная кислота в дихлорметане.

В качестве активатора использовали растворы: № 1 (Act № 1) – 0,4 М 1-Н-тетразол (Биоссет, Россия) в ацетонитриле (Panreac, Испания); № 2 (Act № 2) – 0,25 М 5-этилтио-1-Н-тетразол (Биоссет, Россия) в ацетонитриле.

В качестве окислителя применяли растворы: № 1 (Oxd № 1) – 0,1 М йод (Экрос, Россия) в тетрагидрофуране (Panreac, Испания), пиридине (Нева Реактив, Россия) и воде в соотношении 8:1:1; раствор № 2 (Oxd № 2) – 0,1 М йод в ацетонитриле, пиридине и воде в соотношении 7:1:2; раствор № 3 (Oxd № 3) – смесь, состоящая из 0,1 М йода в уксусной кислоте (Экрос, Россия) и пиридине в соотношении 1:9.

Для проведения синтеза также использовали 0,05 М раствор амидофосфитных производных нуклеозидов (Glen Research, США) в ацетонитриле; кэппирующий раствор А, состоящий из уксусного ангидрида (Acros, США), 2,6-лутидина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэппирующий раствор Б, состоящий из 1-метилимидазола (Sigma-Aldrich, США), пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8.

Уксусный ангидрид и пиридин очищали обычной перегонкой, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан и ацетонитрил перегоняли над пентоксидом фосфора (Panreac, Испания).

Аммонолиз проводили с концентрированным водным раствором аммиака (НеваРеактив, Россия) в течение 12 ч при температуре 55 °С. Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) в двухканальной системе OPS-201 (Биоссет, Россия). Затем олигонуклеотиды пересаживали 6 % раствором перхлората лития (Sigma-Aldrich, США) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия).

Качество синтезированного продукта проверяли методом электрофореза в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях с 7 М мочевиной. В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 0,01 М NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос использовали 0,75 % Stains-all (Sigma-Aldrich, США) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически при 260 нм на при-

боре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и пересчитывали в пмоль/мкл с помощью формулы:

$$C = \frac{100 \cdot A_{260}}{1,54 \cdot nA + 0,75 \cdot nC + 1,17 \cdot nG + 0,92 \cdot nT},$$

где A_{260} – коэффициент поглощения при длине волны 260 нм, а nA, nC, nG, nT – количество оснований в нуклеотидной последовательности праймера.

Специфическую активность синтезированных праймеров ctx2 и ctx3 проверяли с использованием реагентов тест-системы «ГенХол». Исследования проводили с тремя штаммами *V. cholerae* 569B, M-1298, 158 и *E. coli* 12226 O-55. В соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007 готовили бактериальные суспензии возбудителей с конечной концентрацией $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. ДНК выделяли методом нуклеосорбции в присутствии гуанидинизотиоцианата, проведение ПЦР и учет результатов – в соответствии с инструкцией к тест-системе. Результаты электрофореза документировали с помощью системы Bio-Rad Gel Doc™ XR System (США). Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов [2].

Результаты и обсуждение

Каждый этап синтеза и используемые в нем растворы оказывают существенное влияние на количество и качество олигонуклеотидов. Поэтому наши исследования были направлены на совершенствование состава растворов для деблокирования, активатора, окислителя с целью повышения количественного выхода праймеров.

В первой серии экспериментов изучали влияние деблокирующего раствора. На первом этапе синтеза, чтобы высвободить 5'-гидроксильную группу, удаляли димитокситритильную защиту. От числа свободных активных групп, зависит количество олигонуклеотидов, вступающих в реакцию конденсации. Для высокого выхода продукта необходимо чтобы эффективность удаления защитной группы в каждом цикле составляла 100 %. Однако во время удаления димитокситритильной защитной группы гликозидная связь пуриновых оснований гидролизует – происходит процесс депуринизации, который приводит к разрушению олигонуклеотида на стадии аммонолиза. Для предотвращения этого явления наши исследования были направлены на подбор условий деблокирования, снижающих депуринизацию и повышающих количество свободных активных групп.

Для определения влияния растворов для деблокирования на выход олигонуклеотидов в качестве «стандартного» использовали 3 % раствор трихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 1). В качестве «экспериментальных» изучали подобранные из литературных источников следующие растворы: 3 % дихлоруксусная кислота в дихлорметане [5] (Dbl

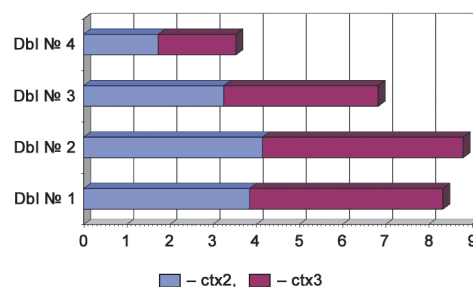


Рис. 1. Влияние деблокирующих растворов на выход праймеров. На оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах (ОЕ), на оси ординат – используемые реагенты

№ 2); 3 % дихлоруксусная кислота в 1,2-дихлорэтано (Dbl № 3) [9]; 1 % трихлоруксусная кислота в дихлорметане (Dbl № 4) [6].

Изучение влияния деблокирующих растворов, а также растворов активатора и окислителя по сравнению со стандартной методикой проводили в условиях одинакового масштаба синтеза – 40 нмоль. Результаты изучения влияния деблокирующих растворов на выход олигонуклеотидов приведены на рис. 1.

Как видно из данных рис. 1, наименьший выход олигонуклеотидов 3,53 ОЕ по сравнению с контролем (Dbl № 1) отмечался при использовании 1 % раствора трихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 4). Средний показатель – 6,83 ОЕ был продемонстрирован в случае применения 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в 1,2-дихлорэтано (Dbl № 3). Наибольший выход продукта – 8,8 ОЕ наблюдался при использовании 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане (Dbl № 2).

Во второй серии экспериментов изучали влияние раствора активатора, обеспечивающего образование ковалентной связи 3'-фосфитной группы фосфорамидита с 5'-гидроксильной группой олигонуклеотида, присоединенного к носителю. От эффективности активирования фосфорамидита напрямую зависит реакция присоединения.

Для изучения влияния активатора на выход олигонуклеотидов в качестве «стандартного» использовали раствор в составе: 0,4 М 1-Н-тетразола в ацетонитриле (Act № 1). В качестве «экспериментального» применяли подобранный из литературных источников раствор, включающий 0,25 М 5-этилтио-1-Н-тетразола в ацетонитриле [1] (Act № 2). Всего было синтезировано 16 праймеров; из них 8 – ctx2 и 8 – ctx3, каждый из которых был охарактеризован количественно (по оптической плотности) и по специфической активности – в ПЦР. Количественный выход олигонуклеотидов (в ОЕ) представлен в таблице.

Влияние активатора на количественный выход олигонуклеотидов ctx2 и ctx3

Синтезируемый праймер	Активатор и выход продукта (М±м) ОЕ	
	Act № 1	Act № 2
ctx2	3±1,88	2,75±0,53
ctx3	3,78±1,33	3,75±1,06

Как следует из данных таблицы, использование «экспериментального» раствора активатора 5-этилтио-1-Н-тетразола не привело к повышению выхода продукта. При включении в синтез «стандартного» раствора активатора (1-Н-тетразола) выход праймеров ctx2 и ctx3 составил 3 и 3,75 ОЕ соответственно, а при использовании «экспериментального» раствора с 5-этилтио-1-Н-тетразолом – 2,75 и 3,75 ОЕ соответственно.

Полученные результаты указывают на возможность использования 0,25 М раствора 5-этилтио-1-Н-тетразола в ацетонитриле в качестве альтернативного активатора при проведении синтеза праймеров.

В третьей серии экспериментов изучали влияние раствора окислителя, который обеспечивал перевод фосфит триэфира (Р(III)), образовавшегося после присоединения основания, в более устойчивую форму – (Р(V)). Для этих целей используют растворы, содержащие йод. Эффективность окисления влияет на стабильность олигонуклеотида и, соответственно, от нее в значительной степени зависит выход конечного продукта.

Для оценки влияния окислителя на выход олигонуклеотидов использовали «стандартный» раствор Oxd № 1 в составе: 0,1 М йод в тетрагидрофуране, пиридине и воде в соотношении 8:1:1. В качестве «экспериментальных» изучали подобранные из литературных источников следующие растворы: Oxd № 2 – 0,1 М йод в ацетонитриле, пиридине и воде в соотношении 7:1:2 [7] и Oxd № 3 – 0,1 М йод в уксусной кислоте и пиридине в пропорции 1:9 [8]. Всего проведено 4 синтеза с одновременным использованием всех 8 каналов олигосинтезатора. Полученные данные выражали в виде суммарной величины, включающей общее количество праймеров ctx2 и ctx3 (рис. 2).

Как видно из представленных данных, использование «экспериментальных» растворов окислителя привело к повышению выхода синтезируемого продукта. Наибольшее значение – 14,1 ОЕ отмечалось в случае применения «экспериментального» раствора Oxd № 3. Несколько меньшая величина выхода (12,2 ОЕ) регистрировалась при использовании «экспериментального» раствора Oxd № 2. Введение

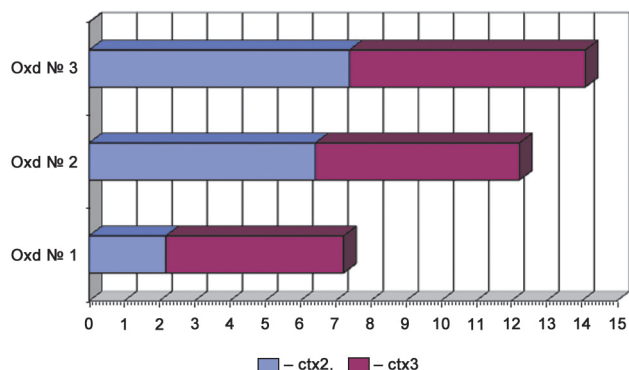


Рис. 2. Влияние растворов окислителя на выход праймеров. На оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах (ОЕ); на оси ординат – изучаемые реагенты

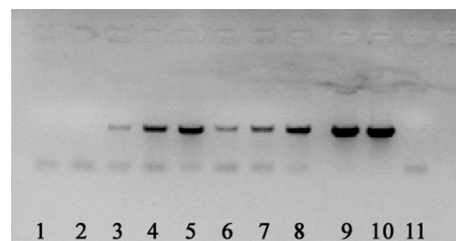


Рис. 3. Электрофореграмма результатов проверки тест-системы «ГенХол» с праймерами ctx2 и ctx3, синтезированными в соответствии с усовершенствованной технологией:

1 – *V. cholerae* eltor 158 (ctxA-) $1 \cdot 10^7$ м.к./мл; 2 – *E. coli* 12226 O-55 $1 \cdot 10^7$ м. к./мл; 3–5 – *V. cholerae* classica 569B (ctxA+) $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м. к./мл соответственно; 6–8 – *V. cholerae* eltor M-1298 (ctxA+) $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м. к./мл; 9, 10 – препарат контрольной ДНК в концентрации 0,1 и 1 нг/мкл, 11 – отрицательный контроль

в синтез в качестве окислителя раствора Oxd № 3 позволило увеличить суммарный выход синтезируемого продукта на 95 % по сравнению со «стандартным» реактивом, а раствора Oxd № 2 – на 69 %.

На следующем этапе нашей работы праймеры ctx2 и ctx3, синтезированные с учетом усовершенствованной технологии (с деблокирующим раствором Dbl № 2, активатором Act № 2 и окислителем Oxd № 3), оценивали по чистоте и специфической активности. На электрофореграмме в ПААГ были выявлены полосы без признаков расщепления, что свидетельствовало о полноценной структуре синтезированных олигонуклеотидов и их чистоте. При определении специфической активности с реагентами тест-системы «ГенХол» установлено, что праймеры обеспечивали амплификацию ДНК холерных вибрионов при содержании в бактериальной суспензии от 1000 до 10 м.к./мл (рис. 3).

Результат ПЦР, приведенный на электрофореграмме (рис. 3), подтверждает соответствие праймеров, синтезированных по усовершенствованной технологии, требованиям качества, предъявляемым к препарату «ГенХол».

Таким образом, нами определены подходы, позволившие повысить выход олигонуклеотидных праймеров ctx2 и ctx3, входящих в состав тест-системы «ГенХол» при сохранении их аналитических и специфических свойств. Установлено, что использование 3 % раствора дихлоруксусной кислоты в дихлорметане на стадии деблокирования приводит к повышению выхода праймеров на 6 %; применение окислителя в составе 0,1 М йод в растворе уксусной кислоты и пиридина в пропорции 1:9 существенно увеличивает количественный выход олигонуклеотидов – на 95 %.

Продemonстрированная эффективность усовершенствованной схемы синтеза указывает на перспективность ее использования для оптимизации производства генодиагностических препаратов с целью увеличения объемов выпускаемой продукции и снижения затрат на дорогостоящие реагенты.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аралов А. В., Чахмахчева О. Г. Защитные группы в химическом синтезе олигорибонуклеотидов. *Биоорг. химия*. 2013; 39(1):3–25. DOI: 10.7868/S0132342313010028.
2. Гайдышев И. Анализ и обработка данных: специальный справочник. Санкт-Петербург: Питер; 2001. 752 с.
3. Beucage S.L., Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites – A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22(20):1859–62. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7.
4. Ellington A., Pollard Jr. J.D. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 2.11 Synthesis and Purification of Oligonucleotides. 1998. P. 2.11.1–2.11.25. DOI: 10.1002/0471142727.mb0211s42.
5. Ferretti L., Karnik S.S., Khorana H.G., Nassal M., Oprian D.D. Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:599–603. DOI: 10.1073/pnas.83.3.599.
6. Kaplan B.E., Itakura K. 2-DNA Synthesis on Solid Supports and Automation. In: Synthesis and Applications of DNA and RNA. Academic Press; 1987. P. 9–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-514030-0.50007-4.
7. Song F., Krull U.J. Selectivity of hybridization controlled by the density of solid phase synthesized DNA probes on glass substrates. In: Optical waveguide sensing and imaging. Springer Science and Business Media; 2008. P. 195–210. DOI: 10.1007/978-1-4020-6952-9_8.
8. Wang C., Trau D. A portable generic DNA bioassay system based on *in situ* oligonucleotide synthesis and hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26(5):2436–41. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.028.
9. White H.A. Manual Oligonucleotide Synthesis Using the Phosphoramidite Method. New Nucleic Acid Techniques. *Methods Mol. Biol.* 1988; 4:193–213. DOI: 10.1385/0-89603-127-6:193.

References

1. Aralov A.B., Chakhmakheva O.G. [Protective groups in chemical oligoribonucleotide synthesis]. *Bioorg. Khimiya*. 2013; 39(1): 3–25. DOI:

10.7868/S0132342313010028.

2. Gaidyshev I. [Data Analysis and Processing: Specialized Reference-Book]. Saint Petersburg: "Piter"; 2001. 752 p.
3. Beucage S.L., Caruthers M.H. Deoxynucleoside phosphoramidites – A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22(20):1859–62. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7.
4. Ellington A., Pollard Jr. J.D. Current Protocols in Molecular Biology. Unit 2.11 Synthesis and Purification of Oligonucleotides. 1998. P. 2.11.1–2.11.25. DOI: 10.1002/0471142727.mb0211s42.
5. Ferretti L., Karnik S.S., Khorana H.G., Nassal M., Oprian D.D. Total synthesis of a gene for bovine rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83:599–603. DOI: 10.1073/pnas.83.3.599.
6. Kaplan B.E., Itakura K. 2-DNA Synthesis on Solid Supports and Automation. In: Synthesis and Applications of DNA and RNA. Academic Press; 1987. P. 9–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-514030-0.50007-4.
7. Song F., Krull U.J. Selectivity of hybridization controlled by the density of solid phase synthesized DNA probes on glass substrates. In: Optical waveguide sensing and imaging. Springer Science and Business Media; 2008. P. 195–210. DOI: 10.1007/978-1-4020-6952-9_8.
8. Wang C., Trau D. A portable generic DNA bioassay system based on *in situ* oligonucleotide synthesis and hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26(5):2436–41. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.028.
9. White H.A. Manual Oligonucleotide Synthesis Using the Phosphoramidite Method. New Nucleic Acid Techniques. *Methods Mol. Biol.* 1988; 4:193–213. DOI: 10.1385/0-89603-127-6:193.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 26.10.15.

Пробл. особо опасных инф. 2016; 3:95–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-95-97

УДК 616.9:595.42(571.63)

А.Я.Никитин¹, Е.И.Андаев¹, Е.А.Сидорова¹, А.В.Алленов², Н.С.Гордейко², Т.В.Зверева², И.М.Морозов¹, С.В.Балахонов¹

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ И ПРОГНОЗ РИСКА ПРОЯВЛЕНИЯ ИНФЕКЦИЙ, ПЕРЕДАЮЩИХСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ, НА О. РУССКОМ В 2016 г. (ПРИМОРСКИЙ КРАЙ)

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, Уссурийск, Российская Федерация

Изучен видовой состав и зараженность возбудителями природно-очаговых инфекций иксодовых клещей, собранных на флаг в 2014–2015 гг. на острове Русском (Приморский край). Среди 817 особей зарегистрированы *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*. Больше всего нимф (46 экз.) собрано у *I. pavlovskyi*. Методом иммуноферментного анализа установлен достоверно больший уровень вирусофорности *I. pavlovskyi* (2,2 %), по сравнению с *I. persulcatus* (0,5 %). Методом полимеразной цепной реакции достоверных различий по уровню вирусофорности между видами не выявлено: *I. pavlovskyi* – 1,3, *I. persulcatus* – 0,5 %. Этим же методом в клещах зарегистрирована ДНК боррелий (*I. pavlovskyi* – 25,1, *I. persulcatus* – 46,4 %), анаплазм (*I. pavlovskyi* – 1,9, *I. persulcatus* – 5,7 %) и эрлихий (*I. pavlovskyi* – 1,3, *I. persulcatus* – 7,2 %). В нимфах *I. pavlovskyi* выявлены только РНК клещевого энцефалита и ДНК боррелий, причем их зараженность спирохетами (45,7 %) достоверно выше, чем имаго. Природный очаг клещевого энцефалита на о. Русском оценивается как малоактивный, а иксодовых клещевых боррелиозов – как активный. Высокий уровень инфицированности боррелиями нимф дает основания ожидать в 2016 г. рост риска заболеваемости иксодовыми клещевыми боррелиозами для людей, посещающих остров в период наибольшей активности клещей (май–июнь).

Ключевые слова: инфицированность иксодовых клещей, прогноз, остров Русский, Приморский край.

Корреспондирующий автор: Никитин Алексей Яковлевич, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

A.Ya.Nikitin¹, E.I.Andaev¹, E.A.Sidorova¹, A.V.Allenov², N.S.Gordeiko², T.V.Zvereva², I.M.Morozov¹, S.V.Balakhonov¹

Epizootological Monitoring and Forecast of the Risks Associated with Infections, Transmitted by Ixodidae Ticks, on the Island Russky in 2016 (Primorsk Territory)

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor; Irkutsk, Russian Federation; ²Primorsk Plague Control Station of the Rospotrebnadzor, Ussuriysk, Russian Federation

Species composition and contamination by the causative agents of natural focal infections, notably *Ixodes* ticks, collected in 2014–2015 on the Island Russky were studied. The total of 817 ticks was collected, including *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*. The most of the nymphs (46 specimens) were observed in *I. pavlovskyi*. Using immune-enzyme analysis, reliably higher rate of positive findings was revealed in *I. pavlovskyi* (2.2 %) compared to *I. persulcatus* (0.5 %) while analyzing individual contamination of two *Ixodes* species. The pattern of inter-specific distinctions did not changed (*I. pavlovskyi* – 1.3 %; *I. persulcatus* – 0.5 %) when investigating tick virus burden by means of polymerase chain reaction. However, in case of comparative evaluation, using the same method, of their contamination with borrelia (*I. pavlovskyi* – 25.1 %; *I. persulcatus* – 46.4 %), agents of granulocytic anaplasmosis (*I. pavlovskyi* – 1.9 %; *I. persulcatus* – 5.7 %) and monocytic ehrlichiosis (*I. pavlovskyi* – 1.3 %; *I. persulcatus* – 7.2 %) *I. persulcatus* showed higher indicators. Only tick-borne encephalitis RNA and borrelia DNA were revealed in *I. pavlovskyi* nymphs, whereat their contamination by spirochetes (45.7 %) was authentically higher than of imagoes. The natural focus of tick-borne encephalitis on the Island Russky is estimated now as low-active one. At the same time, of *Ixodes* tick-borne borreliosis – as active, with significant contamination of the tick nymphs with spirochetes. In terms of high nymph contamination it is supposed that in 2016 the risk of *Ixodes* tick-borne borreliosis morbidity rate will increase for humans visiting the Island within the period of high vector activity (May–June).

Key words: contamination of *Ixodes* ticks, forecast, Island Russky, Primorsk Territory.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksey Ya. Nikitin, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Sidorova E.A., Allenov A.V., Gordeiko N.S., Zvereva T.V., Morozov I.M., Balakhonov S.V. Epizootological Monitoring and Forecast of the Risks Associated with Infections, Transmitted by Ixodidae Ticks, on the Island Russky in 2016 (Primorsk Territory). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 3:95–97. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-95-97

Наибольший вклад в заболеваемость населения клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ) и иксодовыми клещевыми боррелиозами (ИКБ) на Дальнем

Востоке вносит Приморский край. Наше исследование направлено на анализ эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекциям, ас-

соцированным с иксодовыми клещами, складывающейся на о. Русском. Особое внимание к этой территории (98 км²) обусловлено произошедшим за 2010–2013 гг. кратным увеличением числа людей, постоянно находящихся на о. Русском, а также ежедневно его посещающих. Остров стал местом проведения масштабных российских и международных мероприятий, требующих контроля биологической безопасности его участников и гостей.

Цель сообщения – на основе данных эпизоотологического мониторинга 2014–2015 гг. дать прогноз изменения эпидемиологических рисков по инфекциям, передающимся иксодовыми клещами, на о. Русском в 2016 г.

Сбор иксодовых клещей на флаг с растений проведен стандартным методом [5] вокруг населенных пунктов в бухтах Воеводиха, Рында, на п-ве Саперный, у форта № 9 в мае–июне 2014–2015 гг. Для определения их видов использована работа Н.А. Филипповой [6].

Клещи индивидуально изучены методами иммуноферментного анализа (ИФА) на содержание антигена вируса клещевого энцефалита и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией на наличие РНК/ДНК вируса клещевого энцефалита, боррелий (*Borrelia burgdorferi* sl), анаплазм (*Anaplasma phagocytophilum*) и эрлихий (*Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris*).

В ходе эпизоотологического обследования о. Русского собрано 817 иксодовых клещей четырех видов: *Ixodes persulcatus* (404 экз.; индекс доминирования 49,4 %), *I. pavlovskyi* (318; 38,9 %), *Haemaphysalis concinna* (64; 7,8 %), *H. japonica douglasi* (31; 3,8 %). Установленное соотношение видов соответствует ранее полученным данным о структуре сообществ иксодид, которая в конце XX – начале XXI веков претерпела изменение, выразившееся, главным образом, в распространении на острове *I. pavlovskyi* [2, 4]. Именно у этого вида собрано самое большое число нимф (46 экз.). На некоторых участках острова, активно посещаемых туристами (например, окрестности форта № 9), *I. pavlovskyi* стал не только фоновым, но и доминирующим видом. В то же время, на п-ве Саперный, где находится кампус Дальневосточного федерального университета, преобладает *I. persulcatus*.

При выявлении в клещах генетического материала возбудителей природно-очаговых инфекций показано, что наиболее высокая доля положительных проб наблюдается у представителей рода *Ixodes*.

При индивидуальном изучении 401 особи *I. persulcatus* антиген вируса клещевого энцефалита выявлен в двух (0,5 %). Количество положительных проб на содержание в этих клещах РНК/ДНК возбудителей природно-очаговых инфекций, при их исследовании методом ПЦР, составило: вирус клещевого энцефалита – 2 (0,5 %), боррелии – 186 (46,4 %), анаплазмы – 23 (5,7 %), эрлихии – 29 (7,2 %).

При изучении методом ИФА 315 особей *I. pav-*

lovskyi выявлено семь зараженных клещей (2,2 %), что достоверно больше ($P < 0,05$), чем у *I. persulcatus*. Методом ПЦР зарегистрирована РНК вируса клещевого энцефалита в четырех особях *I. pavlovskyi* (1,3 %), ДНК боррелий – в 79 (25,1 %), анаплазм – в шести (1,9 %), эрлихий – в четырех (1,3 %). Таким образом, впервые за время обследования острова у *I. persulcatus* установлен уровень вирусофорности ниже, чем *I. pavlovskyi*. Зараженность боррелиями *I. persulcatus* достоверно выше, чем у *I. pavlovskyi* ($P < 0,001$). Статистически значимые межвидовые различия по доле положительных проб на содержание ДНК анаплазм и эрлихий отсутствуют.

Исследование зараженности нимф *I. pavlovskyi* выявило РНК вируса клещевого энцефалита в одной особи (2,2 %), а ДНК боррелий – в 21 (45,7 %), причем их зараженность спирохетами достоверно выше ($P < 0,001$), чем у имаго этого вида. ДНК других возбудителей природно-очаговых инфекций в нимфах *I. pavlovskyi* не выявлена.

Таким образом, в настоящее время природный очаг КВЭ на о. Русском, в соответствии с предложенной в литературе оценкой [1], является малоактивным (антиген выявлен в 0,5 % особей, тогда как для эпидемиологически активных очагов в среднем должно быть 2,5 %).

Высокая зараженность клещей рода *Ixodes* боррелиями не выходит за пределы, характерные для других регионов страны. Считается, что вертикальная передача боррелий осуществляется в основном за счет дополнительного заражения личинок иксодид при их питании на мелких млекопитающих и птицах [3]. Учитывая высокий уровень заражения боррелиями голодных нимф, следует признать, что на о. Русском сформировался активный природный очаг ИКБ с резервуаром возбудителя в переносчике и носителях, что требует детализации видов животных, принимающих участие в поддержании его циркуляции, и учета этого при планировании мер профилактики.

В литературе приводятся данные о почти 100 % трансфазовой передаче боррелий от нимф к имаго [3]. Так как круг прокормителей для двух видов рода *Ixodes* достаточно близок, нельзя исключить, что высокая зараженность боррелиями характерна не только для нимф *I. pavlovskyi*, но и *I. persulcatus*, то есть, для вида наиболее агрессивного по отношению к человеку, распространенного на острове и в высокой степени инфицированного боррелиями. В этом случае, в 2016 г. риск заболеваемости ИКБ для людей, посещающих о. Русский в период наибольшей активности переносчика (май–июнь), возрастет.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочкова Н.Г., Башкирцев В.Н., Левина Л.С., Ларина Г.И., Погодина В.В., Рясова Р.А., Сергеева В.А., Москвина С.О., Маньилова А.В. Опыт применения иммуноферментного метода

для индикации вируса клещевого энцефалита в различных очагах. *Вопр. вирусол.* 1990; 2(35):165–7.

2. Колонин Г.В. Материалы по фауне иксодовых клещей юга Приморского края. *Паразитология*. 1986; 20(1):15–8.

3. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М.; 2013. 463 с.

4. Онищенко Г.Г., редактор. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012. Новосибирск: Изд-во «Наука-Центр»; 2013. 419 с.

5. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней. МУ 3.1.3012. М.; 2012. 74 с.

6. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсем. Amblyomminae. Фауна России и сопредельных стран. Паукообразные. СПб.: Изд-во «Наука»; 1997. 430 с.

References

1. Bochkova N.G., Bashkirtsev V.N., Levina L.S., Larina G.I., Pogodina V.V., Ryasova R.A., Sergeeva V.A., Moskvina S.O., Manylova A.V. [Experience in application of immune-enzyme method for indication of tick-borne encephalitis virus in different foci]. *Vopr. Virusol.* 1990; 2(35):165–7.

2. Kolonin G.V. [Findings on the Ixodidae ticks fauna in the south of Primorsk Territory]. *Parazitologiya*. 1986; 20(1): 15–8.

3. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. [Natural-Focal Infections Transmitted by Ixodidae Ticks]. М.: 2013. 463 с.

4. Onischenko G.G., editor. [Provision of Sanitary-Epidemiological

Welfare of the Population during Preparation and Holding of APEC-2012 Summit]. Novosibirsk: «Nauka-Tsenter», 2013. 419 с.

5. [Collection, record keeping and preparation for laboratory testing of blood-sucking arthropods in natural foci of dangerous infectious diseases]. MR 3.1.3012. М.; 2012. 74 с.

6. Filippova N.A. [Ixodidae ticks of Amblyomminae subfamily. Fauna of Russia and bordering countries. Arachnids]. St. Petersburg.: «Nauka»; 1997. 430 p.

Authors:

Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Sidorova E.A., Morozov I.M., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Allenov A.V., Gordeiko N.S., Zvereva T.V. Primorsk Plague Control Station. 46, Dzerzhinskogo St., Ussuriisk, 692512, Russian Federation. E-mail: ppchadm@mail.ru.

Об авторах:

Никитин А.Я., Андаев Е.И., Сидорова Е.А., Морозов И.М., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Алленов А.В., Гордейко Н.С., Зверева Т.В. Приморская противочумная станция. Российская Федерация, 692512, Уссурийск, ул. Дзержинского, 46. E-mail: ppchadm@mail.ru.

Поступила 15.04.16.

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВИТАЛИЯ АКСЕНОВИЧА АГАПОВА

Виталий Аксенович Агапов родился 20 сентября 1946 г. в Чите. После окончания средней школы в 1963 г. поступил в Читинский государственный медицинский институт на лечебно-профилактический факультет.

В июне 1971 г. принят на работу в Читинскую областную санэпидстанцию врачом-эпидемиологом. В 1973 г. становится заведующим эпидотделом, а в 1983 г. назначен заместителем главного врача Областной санэпидстанции, заместителем главного Государственного санитарного врача Читинской области.

В 1991 г. он утвержден начальником Читинской противочумной станции. В тяжелые 90-е годы Виталий Аксенович принимал неординарные меры, чтобы сохранить кадровый потенциал, старался интегрировать станцию в территориальную систему здравоохранения, придать ее работе эпидемиологическую направленность.

Виталий Аксенович – эпидемиолог высокого класса, внесший значительный вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия и санитарной охраны восточно-сибирского региона России. Он – достойный представитель противочум-



ной системы, всегда следующий ее лучшим традициям. Под его руководством специалисты станции осуществляют мониторинг территории в отношении особо опасных и природно-очаговых инфекционных болезней, оказывают большой объем консультативно-методической помощи лечебным учреждениям. Станция планомерно работает и развивается, обновляется материально-техническая база, расширяется спектр исследований.

За многолетний и добросовестный труд Виталий Аксенович награжден знаком Министерства Здравоохранения Российской Федерации «Отличник здравоохранения», медалью «За заслуги перед Читинской областью», ему присвоено звание «Заслуженный работник здравоохранения Читинской области». В октябре 2003 г. Указом Президента Российской Федерации ему присвоено звание «Заслуженный врач Российской Федерации».

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляют Виталия Аксеновича с юбилеем, желают ему творческой и плодотворной работы, уважения коллег и любви близких.

ПАМЯТИ ГЕННАДИЯ ИВАНОВИЧА ЛЯМКИНА



8 сентября 2016 г. на 61 году ушел из жизни Лямкин Геннадий Иванович – заместитель директора по научной работе ФКУЗ Ставропольского противочумного института Роспотребнадзора, профессор, доктор медицинских наук, ученый, замечательный человек.

Вся трудовая деятельность Геннадия Ивановича связана с противочумной службой, которой он посвятил 37 лет своей жизни, пройдя путь от аспиранта до заместителя директора по научной работе. На этой должности он проработал 28 лет.

С 2008 г. был руководителем Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза, созданного на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Он впервые предложил для внесения в классификацию рода бруцелл новый самостоятельный биовар 5 *Brucella suis* и его референтный штамм *Brucella suis* 513, циркулирующий среди грызунов в природном очаге. Решением подкомитета по таксономии бруцелл ФАО/ВОЗ Международного комитета по номенклатуре бактерий новый биовар включен в качестве самостоятельного биовара *B. suis* в классификацию рода бруцелл.

Геннадий Иванович внес большой вклад в Российскую науку в области разработки, профилактики и лабораторной диагностики бруцеллеза, создания новых средств диагностики особо опасных ин-

фекций, в совершенствование систем эпидемиологического надзора и мониторинга за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности, развивал информационно-аналитическое и прогнозно-моделирующее направления в эпидемиологии особо опасных зоонозных инфекций.

Лямкиным Геннадием Ивановичем опубликовано более 300 научных работ, он является соавтором более двадцати методических документов федерального уровня внедрения, а также 28 авторских свидетельств и патентов. Геннадий Иванович всегда выполнял большую общественную работу, был организатором многих научных мероприятий регионального и федерального уровней, проводимых на базе института.

За многолетний и добросовестный труд он неоднократно поощрялся почетными грамотами и благодарностями Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения РФ, дирекции института. Награжден нагрудным знаком «Отличник Госсанэпидслужбы». Ему было присвоено звание «Отличник здравоохранения Российской Федерации».

Уход из жизни Геннадия Ивановича – большая, невосполнимая утрата для всех, кто с ним работал.

Геннадий Иванович был настоящим ученым и педагогом, великодушным, добрым, порядочным и отзывчивым человеком.

Светлая память о нем навсегда сохранится в сердцах его друзей, коллег и учеников.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают искреннее соболезнование семье и близким Геннадия Ивановича, его друзьям и коллегам.

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА РЫЖКО ИННЫ ВАСИЛЬЕВНЫ (1934–2016 гг.)



5 августа 2016 г. ушла из жизни известный ученый, доктор медицинских наук, профессор, бывшая заведующая лабораторией лечения чумы и других особо опасных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Инна Васильевна Рыжко.

В стенах родного института Инна Васильевна провела всю свою трудовую деятельность, пройдя долгий путь от лаборанта до заведующей лабораторией, профессора. Под руководством Инны Васильевны создана коллекция иммуногенных вариантов штам-

мов чумного микроба с хромосомной и плазмидной устойчивостью к антибактериальным препаратам, позволившая разработать оптимальные схемы сочетанного применения средств специфической и экстренной профилактики чумы. Инна Васильевна охотно передавала свои знания молодому поколению ученых. В разные годы учениками Инны Васильевны успешно защищены десять кандидатских диссертаций.

В нашей памяти Инна Васильевна останется достойным представителем противочумной системы, ученым, педагогом, прекрасным человеком.

Редакционный совет и редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают искренние соболезнования семье Инны Васильевны, ее близким и друзьям.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

При направлении статьи в редакцию журнала «Проблемы особо опасных инфекций» следует соблюдать следующие правила:

1. Присылать один распечатанный экземпляр статьи и электронную копию на компакт-диске или по электронной почте. Каждая статья должна иметь направление от учреждения, в котором она выполнена, экспертное заключение и лицензионный договор о предоставлении права использования произведения.

2. Размер статей (включая таблицы, рисунки, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 9 стр. (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, межстрочный интервал 1,5, поля 2 см), обзоров – 12–15 стр., кратких сообщений – 4 стр. Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: цель исследования, материалы и методы, результаты и обсуждение. К оригинальным, проблемным статьям, обзорам и кратким сообщениям должны прилагаться резюме и ключевые слова. Резюме и ключевые слова должны быть на русском и английском языках.

4. Резюме должно отражать основное содержание статьи (не менее 100 и не более 250 слов). Для оригинальных статей резюме должно быть структурированным. В нем должны быть отражены цель, материалы и методы, результаты и выводы. Использование сокращений и условных обозначений в резюме не рекомендуется.

5. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, названия учреждений – мест работы всех авторов, их должности и контактная информация (почтовый адрес с указанием индекса, телефон, адрес электронной почты). Если авторов несколько, у каждой фамилии и соответствующего учреждения проставляется цифровой индекс.

Статья должна быть подписана всеми авторами с указанием фамилии, имени и отчества (полностью).

В конце статьи должно быть приведено заявление об отсутствии/наличии конфликта финансовых либо иных интересов, связанных с написанием статьи. Заявление об отсутствии конфликта интересов может быть сформулировано следующим образом (авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, связанных с написанием статьи. Если статья была написана в результате работы, которая финансировалась из дополнительных источников (грант, контракт, ФЦП и т.д.), это должно быть указано в конце статьи).

6. Если в работе имело место участие животных или людей как объектов исследования, авторы должны указать в рукописи, что все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также одобрены соответствующими комитетами. В рукописи должно быть четко отражено, что от всех людей, ставших объектами исследований, получено информированное согласие.

7. Количество иллюстраций не должно превышать 3 (либо 3 рис., либо 3 табл., либо 3 в совокупности).

Место расположения таблиц и рисунков в тексте отмечать ссылками на полях (только в распечатанных экземплярах).

8. Таблицы не должны дублировать графики, должны иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Числа в таблицах должны быть статистически обработаны. Цифровой материал из таблиц не должен повторяться в тексте статьи.

9. Рисунки должны быть четкими. Количество обозначений должно быть сведено к минимуму. Все объяснения следует давать в подрисующей подписи.

10. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом («Руководство по систематике бактерий Берги», 9 изд.). Первый раз название микроорганизма пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род – только одной прописной буквой, вид – полностью, со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

11. Сокращение слов, имен, названий (кроме общеприня-

тых сокращений, мер физических и математических величин и терминов) допускается только с первоначальным указанием полного названия.

12. Математические формулы должны быть тщательно выверены.

13. В списке литературы (в оригинальных статьях – не более 15 источников, проблемных и обзорах – не более 50, кратких сообщениях – не более 5–8) приводятся работы отечественных и зарубежных авторов за последние 10 лет и печатаются в алфавитном порядке (сначала русские авторы, потом – иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка (в квадратных скобках), а не на фамилию и годы.

Количество ссылок на собственные работы (самоцитирование) не должно превышать три. Под самоцитированием подразумевается цитирование не только первого, но и каждого из соавторов статьи.

В списке литературы приводятся авторы работы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы, DOI. Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>). Для книг и патентов давать точное название.

Для статей из журналов необходимо перечислить всех авторов статьи.

Для источников из Интернет следует указывать адрес страницы сайта, где размещена информация, на которую ссылаются, и дату доступа.

Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Не допускаются ссылки на издания, недоступные для большинства читателей. К ним относятся приказы, распоряжения, ведомственные издания и инструкции, ГОСТы, ТУ, тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов, авторефераты докторских и кандидатских диссертаций и неопубликованные работы.

Ссылки на нормативно-методические документы (СП, САНПиН МУ, МР), законы, подзаконные акты следует давать в тексте статьи, не включая эти источники в список литературы. Для НМД достаточно указать соответствующий номер, для законов и подзаконных актов – номер и дату издания/принятия.

Например,

Обеззараживание исследуемого материала проводили согласно МУ..... и т.д.

14. Фамилии иностранных авторов при упоминании в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

15. Требования к электронным вариантам статей: файлы с текстом и подрисующими подписями должны быть в формате DOC (редактор Microsoft Word) или RTF; рисунки и фотографии – в отдельных файлах в формате TIFF (разрешение – 300 пикс/дюйм); диаграммы и графики должны быть выполнены в программе Excel (в отдельных файлах в формате xls). Рисунки, фотографии, диаграммы и графики не вставлять в текст в программе Microsoft Word.

16. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

17. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять, а также публиковать их в виде кратких сообщений (4–5 стр. текста с резюме и литературой без рисунков и таблиц). Вся работа проводится по авторскому оригиналу. После сокращения работа направляется на согласование автору.

18. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование.

19. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

20. Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

410005, Саратов, Университетская, 46. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб».

Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12.

E-mail: jour@microbe.ru, rusrapi@microbe.ru