ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
КООРДИНАЦИОННЫЙ НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»

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 2

2017

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, докт. 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.Безсмертный, 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, академик РАН (Оболенск)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, член-корр. РАН (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 ВИНИТИ, 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», 2017

2017, Issue 2

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., Doctor 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, Member of the RAS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Corresponding Member of the RAS (Stavropol)
Kutyrev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Saratov)
L`vov 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 Т.А.Поршакова. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. 2017. Вып. 2. 1–88
Редактор *Е.С.Герасимова.* Технический редактор *Т.К.Меркулова.* Перевод на английский *А.П.Рыжовой, Т.Б.Караваевой*

Подписано в печать 09.06.17. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10,78. Гарнитура Таймс. Заказ 528
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

СОДЕРЖАНИЕ

Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Пакскина Н.Д., Удовиченко С.К., Карнаухов И.Г., Шиянова А.Е., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Эффективность Международных медико-санитарных правил при предупреждении и контроле чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического и биологического характера 5

Эпидемиология

Базарова Г.Х., Лукьяненко Н.В., Рождественский Е.Н., Салдан И.П., Шевченко В.В. Характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов на современном этапе развития в Алтайском крае 9

Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Куликалова Е.С., Храмов М.В., Дятлов И.А., Транквилевский Д.В. Эпидемиологический и эпизоотологический анализ ситуации по туляремии в Российской Федерации в 2016 г., прогноз на 2017 г. 13

Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Шилов М.М. Изменение границ природных очагов чумы Волго-Уральского междуречья 19

Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Об эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2016 г. и прогноз на 2017 г. 23

Стариков В.П., Винарская Н.П., Бородин А.В., Берников К.А. Комплексная оценка природного очага туляремии в слиянии рек Оби и Иртыша 28

Микробиология

Никифоров К.А., Уткин Д.В., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Конструирование ДНК-чипа для дифференциации основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида *Yersinia pestis* 32

Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И. Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae* 36

Полунина Т.А., Заднова С.П., Краснов Я.М. Применение 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов возбудителей чумы и холеры 40

Сазанова Е.В., Малахаева А.Н., Малюкова Т.А., Бойко А.В., Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Моделирование чумной инфекции при заражении авирулентными штаммами *Yersinia pestis* 45

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Андрус А.Ф., Борисевич С.В. Молекулярно-биологические особенности репродукции аренавирусов в чувствительных клетках 50

Щелканова Е.Ю., Агафонова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Агафонов Д.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Влияние делеции профага CTXφ на изменение фенотипических свойств *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, связанных с вирулентностью и персистентностью 54

CONTENTS

Popova A.Yu., Toporkov V.P., Smolensky V.Yu., Pakskina N.D., Udovichenko S.K., Karnaukhov I.G., Shiyanova A.E., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Effectiveness of International Health Regulations in Prevention and Control of Emergency Situations of Sanitary-Epidemiological and Biological Character

Epidemiology

Bazarova G.Kh., Luk'yanenko N.V., Rozhdestvensky E.N., Saldan I.P., Shevchenko V.V. Characteristics of Stationary Hazardous as Regards Anthrax Areas in Altai Territory in the Modern Period

Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kulikalova E.S., Khramov M.V., Dyatlov I.A., Trankvilevsky D.V. Epidemiological and Epizootiological Analysis of the Situation on Tularemia in the Russian Federation in 2016 and Forecast for 2017

Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Chekashov V.N., Shilov M.M. Modifications to the Boundaries of the Natural Plague Foci in the Volga-Ural Interfluve

Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Epizootiological-Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2016 and Prognosis for 2017

Starikov V.P., Vinarskaya N.P., Borodin A.V., Bernikov K.A. Comprehensive Evaluation of the Natural Tularemia Focus in the Confluence of Irtysh and Ob Rivers

Microbiology

Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Construction of a DNA-Microarray for Differentiation between the Main and Non-Main Subspecies and Biovars of the Main Subspecies of *Yersinia pestis*

Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. The Role of Small RNAs in Controlling Expression of Genes Involved in the Implementation of *Vibrio cholerae* Pathogenicity

Polunina T.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. 2D-Electrophoresis in Protein Spectrum Construction for Exoprotein Fractions of Plague and Cholera Agents

Sazanova E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., Popov Yu.A. Plague Infection Simulating in Case of Inoculation with Avirulent *Yersinia pestis* Strains

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Pantyukhov V.B., Andrus A.F., Borisevich S.V. Molecular-Biological Peculiarities of Arenavirus Reproduction in Sensitive Cells

E.Yu.Shchelkanova, E.Yu.Agafonova, L.F.Livanova, D.A.Agafonov, Yu.V.Lozovsky, N.I.Smirnova Effect of the Prophage CTXφ Deletion upon Phenotypic Properties in Strains of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor, Associated with Virulence and Persistence

Биотехнология, иммунология

Бугоркова С.А., Курылина А.Ф., Щуковская Т.Н. Морфофункциональная характеристика иммунокомпетентных органов мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции 58

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. Характеристика протективного антигенного комплекса из *Francisella tularensis* subsp. *novicida* 63

Куклина Г.В., Елагин Г.Д., Фоменков О.О., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза 67

Максютов Р.А. Живые противооспенные вакцины..... 72

Михайлов Л.М., Баранникова Н.Л., Токарева Л.Е., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Кузнецов В.И., Ястремская К.Ю., Балахонов С.В. Получение моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки на основе термоэкстракта из бруцелл в S-форме 78

Краткие сообщения

Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба 81

Севских Т.А., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю. Протективные свойства вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и бескапсульного штамма *Bacillus anthracis* 363/11 84

Юбилеи

К 70-летию со дня рождения Зураба Левановича Девдариани 87

Памяти коллеги

Памяти Любови Владимировны Самойловой 88

Biotechnology, Immunology

Bugorkova S.A., Kurylina A.F., Shchukovskaya T.N. Morphological-Functional Characteristics of Immune Competent Organs of BALB/c Mice in Case of Vaccination with *Yersinia pestis* NIIEG Strain against the Background of Immune Modulation

Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. Characteristics of the Protective Antigen Complex Obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*

Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Antibodies to Brucellosis Agent Antigens

Maksyutov R.A. Live Antivariolic Vaccines

Mikhailov L.M., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Kuznetsov V.I., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Monospecific Brucella Anti-Abortus Serum Based on Thermoextract From S-Form Brucella

Brief Communication

Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmatov K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Liquid Nutrient Medium for Submerged Cultivation of Tularemia Microbe

Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. Protective Properties of the Vaccine Strain 55-VNIIVViM and Acapsular Strain *Bacillus anthracis* 363/11

Anniversaries

To the 70-th Anniversary of Zurab L. Devdariani

Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Lyubov V. Samoilova

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:5–8. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-5-8**

УДК 614.4+614.8

А.Ю.Попова[1,2], В.П.Топорков[3], В.Ю.Смоленский[1], Н.Д.Пакскина[1], С.К.Удовиченко[3], И.Г.Карнаухов[3], А.Е.Шиянова[3], С.А.Щербакова[3], В.В.Кутырев[3]

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕДИКО-САНИТАРНЫХ ПРАВИЛ ПРИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ И КОНТРОЛЕ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО И БИОЛОГИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА

[1]Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;
[2]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва;
[3]ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В статье Международные медико-санитарные правила (2005 г.), далее ММСП (2005 г.), на примерах борьбы с ТОРС, гриппом A/H5N1/, A/H1N1/09, лихорадкой Зика, БВРС-CoV охарактеризованы как эффективный инструмент предупреждения возникновения и контроля чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения (ЧС санитарно-эпидемиологического характера) международного значения. Позднее обнаружение эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке (2013–2016 гг.) и объявление ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения в тот период, когда эпидемия приняла масштабы угрозы национальной безопасности для затронутых стран и приоритетной угрозы для всего мирового сообщества (ЧС биологического характера), объясняются не использованием методических возможностей ММСП (2005 г.) по верификации ЧС на начальном этапе развития эпидемии из-за неготовности местных, региональных, национальных и международных структур здравоохранения к такой эпидемической ситуации. ВОЗ планирует достичь сокращения сроков от начала эпидемических событий до осуществления эффективных ответных мер на научной основе. Российская Федерация, осуществляющая научно обоснованное внедрение ММСП (2005 г.) с самого начала и разработавшая методологию имплементации ММСП (2005 г.) на национальном уровне, имеет серьезный задел в научном обеспечении этого процесса.

Ключевые слова: ММСП (2005 г.), чрезвычайная ситуация санитарно-эпидемиологического (биологического) характера международного значения, эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке, методология реализации ММСП (2005 г.) на национальном уровне.

Корреспондирующий автор: Топорков Владимир Петрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.Yu.Popova[1,2], V.P.Toporkov[3], V.Yu.Smolensky[1], N.D.Pakskina[1], S.K.Udovichenko[3], I.G.Karnaukhov[3], A.E.Shiyanova[3], S.A.Shcherbakova[3], V.V.Kutyrev[3]

Effectiveness of International Health Regulations in Prevention and Control of Emergency Situations of Sanitary-Epidemiological and Biological Character

[1]Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; [2]Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation; [3]Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The paper describes the International Health Regulations (2005), hereinafter referred as IHR (2005), by the example of SARS, A/H5N1/, A/H1N1/09, Zika fever, and MERS-CoV control as an effective tool for prevention and control of public health emergences (ES of sanitary-epidemiological character) of international concern. Late detection of Ebola fever epidemic in West Africa (2013–2016) and announcement of public health emergency of international concern at the time when epidemic up-scaled to a threat to national security of the affected countries and high-priority threat to global community (ES of biological character) is attributed to non-use of methodological capacities of IHR (2005) on verification of ES at an early stage of epidemic development because of unpreparedness of local, regional, national and international public health services to such an epidemic situation. WHO plans to achieve scientifically-based reduction of the time from the onset of epidemic events to the effective response measures. Russian Federation, scientifically implementing IHR (2005) from the very beginning and having devised methodology of IHR implementation on the national level, has a strong premise for scientific provision of this process.

Key words: IHR (2005), emergency situation of sanitary-epidemiological (biological) character of international concern, Ebola fever epidemic in West Africa, methodology of IHR (2005) implementation on the national level.

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

Corresponding author: Vladimir P. Toporkov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Popova A.Yu., Toporkov V.P., Smolensky V.Yu., Pakskina N.D., Udovichenko S.K., Karnaukhov I.G., Shiyanova A.E., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Effectiveness of International Health Regulations in Prevention and Control of Emergency Situations of Sanitary-Epidemiological and Biological Character. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:5–8. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-5-8

Международные медико-санитарные правила (2005 г.), далее ММСП (2005 г.), по прошествии 11 лет после их принятия на сессии ВАЗ (Резолюция ВАЗ 58.3) в 2005 г. и девяти лет после вступления в силу в 2007 г., совершенно определенно зарекомендовали себя как эффективный инструмент предупреждения и контроля чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения международного значения (ЧС). Между тем, в связи с необычно широким распространением эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке (2013–2016 гг.) на этапе имплементации ММСП (2005 г.) на национальном уровне, определенном ВОЗ на период до 2016 г., пропуском начала эпидемии и поздним объявлением

ЧС, переросшей в чрезвычайную ситуацию в области биологической безопасности (ББ), возникла необходимость актуализации научной аргументации относительно их эффективности и разрешающих возможностей методического инструментария.

Первым аргументом в пользу эффективности ММСП (2005 г.) являются наши наблюдения и данные ВОЗ о том, что все негативные моменты, связанные с пропуском начала эпидемии лихорадки Эбола, обусловлены недостаточным уровнем имплементации ММСП в странах пораженного региона и не владением инструментарием ММСП для верификации ЧС по таким признакам как неожиданность, необычность возникшей эпидемической ситуации, серьезный характер проявления, возникновение рисков международного распространения и ограничений международных сообщений. Все вышеуказанные признаки были манифестирующими с самого начала эпидемии, на их основе можно было намного раньше заподозрить ЧС (через 2–3, а не 8 месяцев) и предупредить перерастание ЧС санитарно-эпидемиологического характера в ЧС в области ББ. Все эти вопросы, то есть извлеченные из эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке уроки, послужили предметом обсуждения на 68-й (2015 г.) и 69-й (2016 г.) сессиях ВАЗ.

При проведении исследования в направлении актуализации всего комплекса научной аргументации относительно эффективности ММСП (2005 г.) обращаем внимание на две составляющих этой проблемы: инструментарий ММСП (2005 г.) – набор признаков и алгоритм принятия решений о ЧС, по которым тестируются актуальные инфекционные болезни (известные и новые); результаты эффективного практического использования инструментария ММСП (2005 г.) при крупных эпидемических событиях международного масштаба, в том числе ассоциируемых с новыми инфекционными болезнями.

В этом контексте необходимо напомнить о том, что в свое время именно лихорадка Эбола, вследствие широкого распространения в Центральной Африке (1995 г.), стала важнейшей из предпосылок для постановки вопроса на сессии ВАЗ в 1995 г. (резолюция 48.3) о несоответствии старых ММСП (1969 г. с изменениями в 1973 и 1981 гг.), далее ММСП (1969 г.), современным эпидемиологическим реалиям. Это несоответствие состояло в том, что документ регламентировал готовность на международном уровне только к трем инфекционным (карантинным) болезням: чуме, холере, желтой лихорадке. Наряду с ограниченным спектром болезней недостатком ММСП (1969 г.) было также и то, что противоэпидемические мероприятия, как и сами болезни, были строго регламентированы в основном тексте документа. Поэтому их корректировка, являвшаяся прерогативой ВАЗ, не могла быть выполнена оперативно в соответствии с изменениями эпидемиологической обстановки.

На период разработки новых ММСП, в целях нивелирования недостатков еще действовавших ММСП (1969 г.), ВОЗ был предложен синдромный подход как прием, позволяющий более оперативно верифицировать эпидемические ситуации и гибко реагировать на них практически до определения этиологического агента (возбудителя) болезни. Между тем, результаты полевых испытаний синдромного подхода в 22 странах-членах ВОЗ оказались негативными. Основные возражения в плане ограниченности данного подхода при эпидемиологических оценках исходили из стран с хорошо развитыми технологическими, кадровыми возможностями, лабораторной инфраструктурой, необходимыми для оперативного выявления и идентификации этиологических агентов и их маркеров.

Выход в свет ММСП (2005 г.) по отношению к ММСП (1969 г.) и синдромному подходу представлялся как инновационный прорыв в сфере правового, нормативного и методического обеспечения предупреждения и контроля ЧС, включая и новые (неизвестные ранее) инфекционные болезни. Конструктивной особенностью ММСП (2005 г.) стал динамичный, открытый для новых инфекционных болезней их списочный состав, вынесенный в Приложение 2, где приведена схема и алгоритм верификации ЧС. Все качественные характеристики ММСП (2005 г.) были рассчитаны на раннее, предупредительное, гибкое, без громоздких процедур, осуществление скрининга, мониторинга и контроля угроз, реализация которых представляла опасность возникновения ЧС. Все это изначально нацелено на высокий потенциал эффективности ММСП (2005 г.), прежде всего, по отношению к современным, самым опасным угрозам и вызовам и особенно новым инфекционным болезням, масштаб разрушительных последствий которых прогностически сильно варьировал, вплоть до катастрофических для международного сообщества. Синдромный подход здесь используется как вспомогательная часть верификации ЧС.

Именно такая стратегически выверенная концепция ММСП (2005 г.) еще на этапе проекта документа успешно продемонстрирована во время эпидемического распространения в 2003 г. новой инфекционной болезни – атипичной пневмонии (ТОРС, SARS). Сущность ЧС состояла в том, что первоначально возникнув в провинции Гуандун в Китае, болезнь была завезена в Гонконг (отель Метрополь) врачом, лечившим больных ТОРС и заболевшим в момент приезда в Гонконг. Суточного пребывания врача в отеле оказалось достаточно, чтобы болезнь была завезена посредством авиационного транспорта в пять стран Азии, Америки и Европы контактировавшими с ним лицами. В последующем для купирования эпидемии, охватившей 30 стран мира, потребовались беспрецедентные меры, предпринятые ВОЗ и национальными службами охраны общественного здоровья.

Медицинские учреждения, с одной стороны, были тормозом в территориальном распространении болезни, а с другой – служили местом устойчивой и, в ряде случаев, повторной циркуляции среди медицинского персонала, больных и их родственников возбудителя болезни, распространявшейся в

странах как нозокомиальная инфекция (реализация заносов преимущественно начиналась с медицинских учреждений).

Следующим примером использования ММСП (2005 г.), свидетельствовавшим об их эффективности, был 2006 г., когда ВОЗ, в связи с широким распространением в мире эпизоотий гриппа птиц A/H5N1/ и заболеваний людей с высокой летальностью (до 60 %), рекомендовала использовать отдельные положения ММСП (2005 г.) (до их официального вступления в силу) в целях предупреждения возникновения пандемии гриппа нового подтипа (резолюция ВАЗ 59.2). В дальнейшем эффективность инструментария ММСП (2005 г.) была продемонстрирована на примере пандемии гриппа, вызванного новым вариантом вируса – A/H1N1/09. Пандемия началась неожиданно в Мексике, а затем в США в марте–апреле 2009 г., когда был зарегистрирован подъем заболеваемости населения гриппом и ОРВИ и более высокий уровень летальных исходов у заболевших с тяжелыми пневмониями, в том числе среди молодых групп населения. Мексика и США оказались необычной территорией возникновения пандемии гриппа, поскольку до этого практически все пандемии гриппа начинались в Азии, в основном в Китае, где и прогнозировалось возникновение пандемии гриппа нового подтипа.

В этом, исходя из критериев ММСП (2005 г.), заключалась серьезность ситуации, которая усиливалась тем, что подтипом гриппа A/H1N1/ в 1918 г. была вызвана самая тяжелая пандемия гриппа, унесшая около 60 млн человеческих жизней. В начале пандемии гриппа A/H1N1/09, в связи с тяжелым течением и летальными исходами среди лиц молодого возраста, возникло подозрение на начало эпидемии высоколетального гриппа нового подтипа. В связи с распространением гриппа в двух странах Американского континента 25 апреля 2009 г. ситуация была признана ВОЗ как ЧС, требующая скоординированных международных ответных действий. Определение ЧС соответствовало требованиям ММСП (2005 г.) и имело прогностическое значение, поскольку практически через месяц о лабораторно подтвержденных случаях заражения и смерти от гриппа A/H1N1/09 сообщили 74 страны и территории. А 11 июня 2009 г. ВОЗ объявила о наступлении пандемии гриппа A/H1N1/09.

Одним из недавних примеров эффективного использования ММСП (2005 г.) являются эпидемические проявления в мире лихорадки Зика, известной с 1947 г. Серьезность ситуации в настоящее время состоит в неуклонном росте числа больных и стран, в которых регистрируется синдром Гийена-Барре, в связи с чем ситуация соответствует признакам ЧС.

Другим примером является новая инфекционная болезнь – Ближневосточный респираторный синдром (БВРС-CoV), впервые диагностированный на территории Саудовской Аравии в июне 2012 г. К настоящему времени число стран, в которых регистрировались случаи БВРС-CoV, достигло 27. По данным ВОЗ, с 2012 г. по 10 мая 2017 г. лабораторно подтверждено 1952 случая БВРС-CoV, из них 693 – летальных. В Саудовской Аравии зарегистрировано около 80 % лабораторно подтвержденных случаев болезни. Единственная крупная вспышка указанной болезни, обусловленная завозом и последующим распространением ее как внутрибольничной инфекции, зарегистрирована в Республике Корея в мае 2015 г. – 186 больных, из них 36 умерших (19,3 %). Настораживающим фактором является достаточно высокая летальность. Сдерживающим фактором для возникновения ЧС является в основном нозокомиальный вариант распространения болезни.

В Российской Федерации, активно участвовавшей в разработке сущностных параметров проекта ММСП (2005 г.), имплементация документа велась на существующей платформе противоэпидемической готовности. Эта платформа была создана огромным опытом борьбы с инфекционными болезнями в первой половине XX века (чума, сыпной, возвратный, брюшной тифы, холера, оспа, полиомиелит, сибирская язва, туляремия, бруцеллез, малярия, грипп «испанка», желтая лихорадка, туберкулез, дифтерия, проказа и др.), опытом ликвидации натуральной оспы в мире, санитарной охраны территории от заноса и распространения опасных инфекционных болезней и полнотой реализации ММСП (1969 г.). Для организации и координации работы по борьбе с инфекционными болезнями в России было создано первое министерство здравоохранения (Наркомздрав России в 1918 г., Минздрав СССР в 1936 г.). В последующем эту функцию взяла на себя профильная государственная санитарно-эпидемиологическая служба (включавшая в том числе систему противочумных учреждений), в дальнейшем – отдельный орган исполнительной власти – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Были созданы и активно функционировали стационарные сетевые структуры и мобильные формирования санитарно-эпидемиологического (включая СПЭБ) и лечебно-профилактического профилей, тесно взаимодействовавшие с другими ведомствами. В настоящее время межведомственное взаимодействие осуществляется на основе постановления Правительства Российской Федерации от 16 мая 2005 г. № 303 «О разграничении полномочий федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации» (с изменениями от 23 марта 2006 г.; 13 марта, 2, 5 июня, 8 декабря 2008 г.; 27 января, 26 февраля, 22 апреля 2009 г.; 8, 13 сентября 2010 г.; 4 февраля, 14 ноября 2011 г.; 4 сентября, 1 ноября 2012 г.; 5, 6 июня, 1 августа 2013 г.; 26 января, 14 февраля 2017 г.).

При вступлении в силу ММСП (2005 г.) в Российской Федерации была разработана методология их реализации, включающая тщательную проработку нормативно-методической базы на основе инвентаризации утративших актуальность положений ММСП (1969 г.) и ориентирования на новые

требования ММСП (2005 г.), научное и материально-техническое обеспечение интеграции принципов ММСП (2005 г.) в методологию эпидемиологического надзора, содержание санитарной охраны территории, развитие межведомственного взаимодействия.

По существу речь шла об определении в качестве объекта надзора и контроля при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения (санитарно-эпидемиологического благополучия или санитарно-эпидемиологического характера), имеющей международное значение. А это – готовность стационарных сетевых структур и мобильных формирований ко всему спектру актуальных инфекционных болезней (фоновых, новых – неизвестных, возвращающихся, распространяющихся на новые территории) и массовых неинфекционных болезней, обусловленных действием биологических, химических и радиоактивных факторов.

Повышение готовности состояло в совершенствовании организационной, методологической, технологической, материально-технической, кадровой основ, правовой, нормативно-методической базы таких направлений деятельности как санитарная охрана территории, эпидемиологический надзор за опасными, природно-очаговыми зоонозными инфекционными болезнями, предупреждение и контроль ЧС в условиях стихийных бедствий и техногенных катастроф, предупреждение и контроль ЧС в области биологической безопасности, обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия при массовых мероприятиях с международным участием. Важным аспектом стала разработка структурно-функциональных основ и тактики деятельности СПЭБ, в том числе за рубежом, с учетом которых была осуществлена их модернизация.

Методология имела унифицированный характер, принципиально применимый на национальном и международном уровне, и была транспонирована на СНГ и Евразийский экономический союз при формировании модели международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия.

Таким образом, основной результат проведенной нами актуализации научной аргументации относительно высокой эффективности ММСП (2005 г.) при предупреждении и контроле ЧС совпадает с оценками ВОЗ по отношению к этому документу при условии его надежной и универсальной имплементации. Проведенные ВОЗ оценки выявили, что во многих странах, ранее уведомивших ВОЗ о соблюдении обязательств в отношении основных возможностей в соответствии с ММСП, фактически имеются значительные пробелы в плане готовности к таким ЧС, как эпидемия БВВЭ в Западной Африке. В материалах доклада Генерального директора ВОЗ на 69-й сессии ВАЗ (A69/21, A69/26) достаточно подробно рассмотрен весь комплекс факторов, являющихся препятствием для осуществления ММСП (2005 г.), и намечены меры, повышающие надежность имплементации этого документа. До практической реализации предложенных мер, на наш взгляд, разделяемый рядом других стран, требуется их дополнительное согласование и проработка с государствами-членами ВОЗ во избежание разногласий в толковании ММСП и размывания центральной координирующей роли ВОЗ в их имплементации. Направления работ по ускорению внедрения ММСП, заложенные в предложения ВОЗ, являются всеобъемлющими.

В материалах доклада Генерального директора ВОЗ на 69-й сессии ВАЗ предложено перевести процесс имплементации ММСП (2005 г.) с формальной основы на научную, что представляет собой серьезную корректировку, сделанную ВОЗ, в ходе реализации соответствующей стратегии по указанному вопросу. В материалах доклада Секретариата ВОЗ на 140-й сессии Исполнительного комитета ВОЗ (январь 2017 г.) научная проблематика названа как «Научные исследования и разработки в области потенциально эпидемических болезней. Программа обеспечения готовности к научным исследованиям и разработкам и оперативного реагирования в части проведения научных исследований» (Программа НИОКР). Основная цель Программы НИОКР – сокращение временного интервала между выявлением вспышки болезни и развертыванием эффективных противоэпидемических мероприятий (до 48 ч).

В Российской Федерации, при завершенном процессе имплементации ММСП (2005 г.), продолжается, в том числе в рамках реализации ММСП (2005 г.), решение вопросов методологического и технологического совершенствования, что соответствует позиции ВОЗ, озвученной на 68-й и 69-й сессиях ВАЗ (A68/22, A69/21), рассматривающей укрепление национальных возможностей как непрерывный процесс, не ограничивающийся поставленными сроками имплементации ММСП (2005 г.).

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

Authors:

Popova A.Yu. 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. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Smolensky V.Yu., Pakskina N.D. 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.

Toporkov V.P., Udovichenko S.K., Karnaukhov I.G., Shiyanova A.E., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Попова А.Ю. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация,125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Смоленский В.Ю., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Топорков В.П., Удовиченко С.К., Карнаухов И.Г., Шиянова А.Е., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 12.01.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:9–12. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-9-12**

УДК 616.98:579.852.11(571.15)

Г.Х.Базарова[1], Н.В.Лукьяненко[2], Е.Н.Рождественский[1], И.П.Салдан[2], В.В.Шевченко[3]

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ ПУНКТОВ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ

[1]ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск; [2]ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул; [3]ГБУЗ «Краевая клиническая больница», Барнаул, Российская Федерация

Цель работы – комплексная оценка ситуации и прогнозирование развития эпидемического процесса при сибирской язве в Алтайском крае. **Материалы и методы.** Материалы по стационарно неблагополучным по сибирской язве пунктам (СНП) получены при анализе кадастров СНП Алтайского края, а также справочника «Кадастр стационарно-неблагополучных пунктов по сибирской язве Российской Федерации». Для ретроспективного анализа заболеваемости сибирской язвой в Алтайском крае за 1953–2015 гг. использованы статистические и отчетные формы учреждений Роспотребнадзора, Россельхознадзора в Алтайском крае, ФКУЗ «Алтайская противочумная станция». Лабораторные исследования на сибирскую язву полевого и клинического материалов проведены в соответствии с МУ 4.2.2413-08. **Результаты и выводы.** Проблема сибирской язвы остается актуальной для Алтайского края в связи с наличием 1262 СНП, заболеваемости животных и людей. Плотность СНП Алтайского края превышает в 7,5 раза плотность СНП по Сибири. Условия формирования СНП и их сохранения определялись почвенно-климатическими аспектами. Наибольшее количество СНП приходилось на степную и лесостепную зоны, преимущественно по ходу скотопрогонных трасс. В Алтайском крае в период 1953–2015 гг. из 1262 учтенных СНП 314 проявили активность, из них 246 – новые. Заболеваемость среди людей зарегистрирована в 36 районах (59,1 %), а в 21 (34,4 %) показатель заболеваемости превышал средний по краю. Общая динамика заболеваемости сельскохозяйственных животных сибирской язвой Алтайского края в 1953–2015 гг. имеет тенденцию к снижению. Комплексная оценка ситуации и прогнозирование развития эпидемического процесса при сибирской язве посредством обобщенного показателя – индекса эпизоотичности (ИЭТ) – и выделение зон потенциального риска эпидемических осложнений позволяет усовершенствовать управленческие решения в целях проведения адекватных противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты, заболеваемость, скотопрогонные трассы, активность СНП.

Корреспондирующий автор: Базарова Галина Хамроевна, e-mail: altai-chuma@mail.ru.

G.Kh.Bazarova[1], N.V.Luk'yanenko[2], E.N.Rozhdestvensky[1], I.P.Saldan[2], V.V.Shevchenko[3]

Characteristics of Stationary Hazardous as Regards Anthrax Areas in Altai Territory in the Modern Period

[1]Altai Plague Control Station, Gorno-Altaisk, Russian Federation; [2]Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation; [3]Territorial Clinical Hospital, Barnaul, Russian Federation

Objective of the study is to comprehensively evaluate and forecast the development of epidemic process in case of anthrax in Altai Territory. **Materials and methods**. The data on stationary hazardous as regards anthrax areas (SHA) were obtained while analyzing cadastres of SHA in Altai Territory, as well as the reference book "Cadastre of stationary hazardous as regards anthrax areas in the Russian Federation". Statistical and report forms from the institutions of the Rospotrebnadzor and Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance in Altai Territory, and from Altai Plague Control Station were used for retrospective analysis of anthrax morbidity rates in Altai Territory over the period of 1953–2015. Laboratory investigations of field and clinical samples were carried out in compliance with Methodological Regulations 4.2.2413-08. **Results and conclusions**. Anthrax remains topical issue for Altai Territory as there are 1262 stationary hazardous areas situated in here, as well as registered animal and human infections. The density of such areas in Altai Territory is 7.5 times higher than across Siberia. Factors for the SHA formation and their sustainability are soil-climatic aspects of the region. The majority of hazardous areas are found in steppe and forest-steppe zones, predominantly along the cattle-driving paths. In Altai Territory, between 1953 and 2015, out of 1262 registered areas, 314 ones manifested epidemiological activity, including 246 new ones. Human infections were reported in 36 districts (59.1 %), while in 21 (34.4 %) – morbidity rates exceeded the territorial average. Cumulative dynamics of anthrax morbidity as regards livestock in Altai Territory in 1953–2015 showed downward trends. Complex evaluation of the situation and forecast of epidemic process development, employing composite index – epizootiological index and zoning of the territory according to the risk of epidemic complications – allows for the improvement of managerial decisions with the view to adequate anti-epidemic measures.

Key words: anthrax, stationary hazardous as regards anthrax areas, morbidity, cattle-driving routes, SHA activity.

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

Corresponding author: Galina Kh. Bazarova, e-mail: altai-chuma@mail.ru.

Citation: Bazarova G.Kh., Luk'yanenko N.V., Rozhdestvensky E.N., Saldan I.P., Shevchenko V.V. Characteristics of Stationary Hazardous as Regards Anthrax Areas in Altai Territory in the Modern Period. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:9–12. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-9-12

Сибирская язва представляет собой серьезную проблему для системы здравоохранения и сельского хозяйства всех стран, включая Россию [1, 3]. За пятилетний период в России зарегистрировано 182 случая заболеваний и 18 случаев падежа сельскохозяйственных животных в 22 неблагополучных пунктах на территории 14 субъектов Российской Федерации [8]. Риск возникновения вспышек сохраняется из-за наличия почвенных очагов сибирской язвы, определить точные границы которых не представляется возможным [9, 10]. Несвоевременное выявление эпизоотии среди животных приводило к формированию эпидемического очага, как показала вспышка сибирской язвы на Ямале в 2016 г., ликвидация которой потребовала огромных затрат. В Ямало-Ненецком автономном округе в августе 2016 г. зарегистрировано 36 случаев сибирской язвы среди людей на фоне крупной эпизоотии среди северных оленей [13]. Современная эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по сибирской язве определяет необходимость постоянного мониторинга большого количества показателей для прогнозирования [7] и комплексной оценки с целью своевременного проведения оперативных противоэпидемических эпизоотологических мероприятий [11]. Это определяет необходимость оптимизации информационной подсистемы эпидемиологического надзора за сибирской язвой и представления единой интегрированной оценки.

Цель работы – комплексная оценка ситуации и прогнозирование развития эпидемического процесса при сибирской язве в Алтайском крае.

Материалы и методы

Ретроспективный эпизоотолого-эпидемиологический анализ заболеваемости сибирской язвой в Алтайском крае проведен за 1953–2015 гг. на основании статистических и отчетных форм Роспотребнадзора (№ 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях) и Россельхознадзора (№ 1-ВЕТ «Сведения о заразных болезнях животных»), сборников статистических и аналитических материалов Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, отчетов ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», данных управлений ветеринарии и Роспотребнадзора по Алтайскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», кадастров стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации и Алтайского края [4, 12]. Эпидемиологический анализ проведен с применением статистических методов. Лабораторные исследования на сибирскую язву полевого и клинического материалов проведены в соответствии с МУ 4.2.2413-08.

Результаты и обсуждение

Наличие большого количества СНП (1262) на территории Алтайского края определяет необходимость постоянного мониторинга более 12 показателей для прогнозирования ситуации по сибирской язве и ее комплексной оценки.

Проведен анализ основных показателей, характеризующих СНП. Плотность СНП Алтайского края составляет 7,46 на 1 тыс. км^2, что в 7,5 раза больше, чем в среднем по Сибири (0,99) и в 3,9 раза больше, чем в западносибирском регионе [5]. Удельный вес СНП Алтайского края в общей структуре Западной Сибири составил 26,0 %. По данному показателю СНП Алтайского края разделены на категории с высокой плотностью 9,3–37,4 на 1 тыс. км^2 (21 район, 34,4 %), средней 7,5–9,2 (9 районов, 14,75 %), низкой 4–7,4 (25 районов, 41 %) и крайне низкой 0–3,9 (6 районов, 9,8 %).

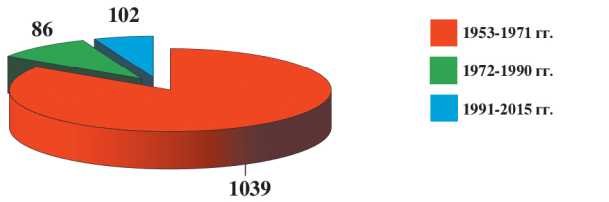
Согласно классификации СНП Б.Л.Черкасского, установлено, что за период наблюдения с 1953 по 2015 год 19,5 % СНП относятся к впервые выявленным или вновь образовавшимся; 75,1 % являются старыми неманифестными (неактивными), где за исследуемый период сибирская язва не регистрировалась; 5,4 % СНП – манифестными (постоянно действующие и рецидивирующие).

Кратность проявления случаев сибирской язвы за изучаемый период в Алтайском крае снижалась. Двукратно случаи были зарегистрированны в 52, трехкратно – в 14, четырехкратно – в одном (Родинский район, с. Родино) и семикратно – в одном СНП (Красногорский район, с. Красногорское). Неблагополучные пункты Алтайского края проявляли свою активность через различные промежутки времени. За исследуемый период из 1262 СНП были активны 314. В 21 районе СНП проявляли активность однократно, через 1–4 года – в 28. В трех районах активность СНП проявилась через 5–9 лет, в шести – через 10–19, в трех – через 20–29.

Условия формирования СНП и их сохранения на современном этапе определялись почвенно-климатическими аспектами.

Удельный вес СНП Алтайского края в общей структуре Сибирского федерального округа составляет 22,5 % [5]. Наибольшее количество СНП приходится на степную (35,3 %) и лесостепную (29,7 %) зоны Алтайского края, преимущественно по ходу скотопрогонных трасс. Территориальное распределение заболеваемости сибирской язвой сельскохозяйственных животных имело отчетливо выраженную ландшафтную зональность, определяемую степной, лесостепной, предгорной и салаирской зонами. Степная зона, включающая в себя 22 (36,0 %) административных района из 61, насчитывала 446 (35,3 %) СНП, лесостепная (18 (29,5 %) районов) – 376 (29,8 %), предгорная (15 (24,5 %) районов) – 266 (21,0 %) и салаирская (6 (9,8 %) районов) – 174 (13,8 %) соответственно.

Количество заболевших животных в период 1953–1971 гг. превышает аналогичный показатель за другие периоды более чем в 10 раз (рисунок).



Количество больных сибирской язвой сельскохозяйственных животных в 1953–2015 гг.

В целом общая динамика заболеваемости сельскохозяйственных животных сибирской язвой Алтайского края в 1953–2015 гг. имеет положительную тенденцию к снижению.

Анализ эпизоотической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве свидетельствует о том, что в течение 63 лет на территории Алтайского края сибирской язвой заболели 99 человек, пали 1227 голов сельскохозяйственных животных (таблица).

Заболеваемость среди людей была зарегистрирована в 36 районах (59,1 %), а в 21 (34,4 %) показатель заболеваемости превышает средний по краю.

Динамика заболеваемости сибирской язвой в период 1953–1963 гг. определялась регистрацией больных с пиком неблагополучия в 1955, 1958, 1962 гг. С 1968 г. отмечается спорадический характер заболеваемости с периодами благополучия от одного года до десяти лет.

Одной из основных особенностей эпидемического процесса при сибирской язве является обычно наблюдаемая спорадичность заболевания людей. С 1953 по 2015 год в 36 неблагополучных по сибирской язве районах края из 61 сибирской язвой заболели 99 человек. Более половины случаев заболеваемости людей и животных – 59,6 % (59 случаев) совпадали по месту и времени регистрации, 35,4 % (35 случаев) – только по месту регистрации, в 3,0 % (3 случая) болезнь диагностировали только у людей и в 2,0 % (2 случая) взаимосвязь установить не удалось.

Средний многолетний интенсивный показатель заболеваемости в 1953–2015 гг. составил 2,17 на 100 тыс. населения. Отмечается положительная сильная корреляционная связь между заболеваемостью людей (71,8 %) и сельскохозяйственных животных (85,0 %) в период 1953–1971 гг. ($r=0,89$, $p<0,01$). Период снижения заболеваемости сибирской язвой в 80-е годы, на наш взгляд, связан с введением на всей территории Сибирского федерального округа двукратной вакцинации животных. Период 1991–2015 гг. в связи с разрушением сельского хозяйства, комплекса санитарно-ветеринарных мероприятий, в том числе вакцинации животных против сибирской язвы, характеризовался ростом заболеваемости людей и сельскохозяйственных животных на 4,8 и 1,4 % соответственно по сравнению с предыдущим периодом.

Количество больных людей и павших от сибирской язвы животных на территории Алтайского края по периодам в течение 1953–2015 гг.

Показатели	Период						Всего 1953–2015	
	1953–1971		1972–1990		1991–2015			
	люди	СХЖ	люди	СХЖ	люди	СХЖ	люди	СХЖ
Абсолютное кол-во	70	1039	12	86	17	102	99	1227
%	70,7	84,7	12,1	7,0	17,2	8,3	100	100

Важным звеном информационной подсистемы является микробиологический мониторинг. Из семи штаммов, выделенных на территории Алтая в 1961, 2006, 2012 гг. VNTR-анализ был проведен у четырех. При проведении VNTR-анализа штаммов, циркулирующих на территории Алтая, установлено, что они принадлежат к главной (глобальной) линии А, единой для штаммов, выделенных в различных регионах Сибири и Дальнего Востока. Полный набор связанных с вирулентностью плазмид – pXO1 и pXO2 – выявлен у всех штаммов. При этом данные о выделенных в 2012 г. на территории Алтайского края штаммах не могут быть объяснены недавним заносом, поскольку еще в 1961 г. на территории Алтая по ходу скотопрогонной трассы был изолирован штамм этого генотипа [2].

Для комплексной оценки ситуации и прогнозирования развития эпидемического процесса при сибирской язве на территории Алтайского края использован обобщенный показатель – индекс эпизоотичности (ИЭТ) [6], характеризующий напряженность эпизоотической и эпидемиологической ситуации, учитывающий долю и уровень активности неблагополучных пунктов. Показатель рассчитан нами за 63-летний период (1953–2015 гг.).

В первую группу входили 15 (24,6 %) районов края из 61, которые характеризовались напряженностью эпизоотологической и эпидемиологической ситуации; учитывали как долю неблагополучных пунктов, так и степень их активности. Стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты, в которых на протяжении времени наблюдения ежегодно регистрировали 1–2 заболевания, более активны и потенциально опасны, чем те, где возникла одна, пусть даже крупная, вспышка.

Во вторую группу входили 16 (26,2 %) районов края, где за период наблюдения сохранялся средний риск заражения, а также риск, характеризовавшийся большим количеством неблагополучных пунктов и динамикой проявления их активности.

В третью группу – 20 (32,8 %) районов края с умеренным риском заражения сибирской язвой.

В четвертую группу входят 10 (16,4 %) районов края с низким риском заражения сибирской язвой.

Таким образом, территория Алтайского края, согласно ИЭТ, нами разделена на зоны потенциального риска:

1. Зона потенциально высокого риска заражения возбудителем сибирской язвы, где показатель ИЭТ превышает 0,11.

2. Зона среднего риска заражения возбудителем сибирской язвы – показатель в пределах 0,06–0,10.

3. Зона умеренного риска заражения возбудителем сибирской язвы – показатель в пределах 0,03–0,05.

4. Зона условно-благополучная – показатель в

пределах менее 0,02.

Таким образом, в Алтайском крае в 1953–2015 гг. наблюдается выраженное неблагополучие по сибирской язве, определяемое большим количеством СНП (1262 пунктов) и их плотностью (7,46), превышающей в 7,5 раза плотность СНП по Сибири (0,99).

На условия формирования СНП и их сохранения на современном этапе влияют биоценотические свойства различных типов почв, содержание гумуса и тяжелых металлов, в том числе кислотность с преобладанием в степных и лесостепных природно-географических областях.

Большое количество СНП находится преимущественно по ходу скотопрогонных трасс и приходится на степную (35,3 %) и лесостепную (29,7 %) зоны Алтайского края.

За исследуемый период из 1262 учтенных СНП проявляли активность 314, из них 246 – новые.

Общая динамика заболеваемости сельскохозяйственных животных сибирской язвой Алтайского края в 1953–2015 гг. имеет положительную тенденцию к снижению, при этом за наблюдаемый период заболеваемость среди людей зарегистрирована в 36 районах (59,1 %), а в 21 (34,4 %) показатель заболеваемости превышал средний по краю.

Комплексная оценка ситуации и прогнозирование развития эпидемического процесса при сибирской язве позволяют усовершенствовать управленческие решения в целях проведения адекватных противоэпидемических мероприятий.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амиреев С.А., Лухнова Л.Ю., Айкимбаев А.М. Эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика, лечение и профилактика сибирской язвы. Алматы; 2009. 121 с.

2. Афанасьев М.В., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Такайшвили В.Е., Половинкина В.С., Балахонов С.В. Сравнительный мультилокусный VNTR- и SNP-анализ вакцинных штаммов *Bacillus anthracis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2014; 2:36–40.

3. Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Андаев Е.И., Косилко С.А., Бренева Н.В. Эпидемиологическая обстановка и профилактика зоонозных и природноочаговых инфекционных болезней в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 1:62–6.

4. Барышников П.И., Федорова Г.А., Высочин А.В., Миронов А.В., Салдан И.П., Азарова Н.А., Калинина У.В. Заболеваемость сибирской язвой среди населения и Кадастр неблагополучных пунктов болезни животных в Алтайском крае. Рекомендации. Барнаул, ИП «Зимодра Л.С.»; 2013. 83 с.

5. Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Родзиковский А.В. Анализ эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве в Сибири в 2000–2011 гг. и прогноз на 2012–2015 гг. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН.* 2012; (2-1):85–7.

6. Лухнова Л.Ю., Айкимбаев А.М., Пазылов Е.К., Дубянский В.М., Бекенов Ж.Е. Дифференциация территории Республики Казахстан по степени опасности заражения сибирской язвой. *Вестник сельскохоз. науки Казахстана*. 2004; 9:56–9.

7. Мицаев Ш.Ш., Исраилова С.А. Экологическая эпизоотология сибирской язвы. *Известия Чеченского гос. пед. ин-та*. 2015; 2(2):44–50.

8. Об усилении мероприятий, направленных на профилактику сибирской язвы в Российской Федерации. Постановление от 10.12.2014 г. № 81 Главного государственного санитарного врача Российской Федерации. 2014. 7 с.

9. Симонова Е.Г., Локтионова М.Н., Картавая С.А. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве на территории Приволжского федерального округа Российской Федерации. *Мед. альманах.* 2012; 3:93–6.

10. Хокконена Т.С., Эйхман В.О. Эпидемиологическая оценка эндемичности территорий по степени риска возникновения вспышек сибирской язвы. *Инфектология*. 2016; 1:9–11.

11. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2002. 384 с.

12. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2005. 829 с.

13. Шестакова И.В. Сибирская язва ошибок не прощает: оценка информации после вспышки на Ямале летом 2016 года. *Журн. инфектологии*. 2016; 8(3):5–27. DOI: 10.22652/2072-6732-2016-8-3-5-27.

References

1. Amireev S.A., Lukhnova L.Yu., Aikimbaev A.M. [Epidemiology, Clinical Features, Laboratory Diagnosis, Treatment, and Prophylaxis of Anthrax]. Almaty; 2009. 121 p.

2. Afanas'ev M.V., Kravets E.V., Dugarzhapova Z.F., Takaishvili V.E., Polovinkina V.S., Balakhonov S.V. [Comparative multi-locus VNTR and SNP-assay of *Bacillus anthracis* vaccine strains]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2014; 2:36–40.

3. Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Andaev E.I., Kosilko S.A., Breneva N.V. [Epidemiological situation and prophylaxis of zoonotic and natural-focal infectious diseases in Siberia and Far East]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2013; 1:62–6.

4. Baryshnikov P.I., Fedorova G.A., Vysochin A.V., Mironov A.V., Saldan I.P., Azarova N.A., Kalinina U.V. [Anthrax incidence among the population and Cadastre of stationary hazardous areas as regards animal infections in the Altai Territory]. Recommendations. Barnaul; 2013. 83 p.

5. Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Rodzikovsky A.V. [Analysis of epizootiological-epidemiological situation on anthrax in Siberia in 2000-2011 and forecast for 2012-2015]. Bulletin of East-Siberian Scientific *Center of RAMS Siberian Branch*. 2012; (2–1):85–7.

6. Lukhnova L.Yu., Aikimbaev A.M., Pazylov E.K., Dubyansky V.M., Bekenov Zh.E. [Differentiation of the territory of the Republic of Kazakhstan according to the risk of exposure to anthrax]. *Vestnik Sel'skokhozyaystvennoy Nauki Kazakhstana* 2004; 9:56–9.

7. Mitsaev Sh.Sh., Israilova S.A. [Ecological Epizootiology of Anthrax]. *Izvestiya Chechenskogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Instituta.* 2015; 2(2):44–50.

8. Resolution No. 81, dated December 10, 2014 of the Chief State Sanitary Officer of the Russian Federation "On strengthening the efforts aimed at prevention of anthrax in the Russian Federation". 2014. 7 p.

9. Simonova E.G., Loktionova M.N., Kartavaya S.A. [Epizootiological-epidemiological situation on anthrax in the territory of the Volga Federal District of the Russian Federation]. *Meditsinskiy Al'manakh.* 2012; 3:93–6.

10. Hokkonena T.S., Eichmann V.O. [Epidemiological evaluation of territorial endemicity according to the risk of anthrax outbreaks]. *Infektologiya*. 2016; 1:9–11.

11. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax]. M.: "InterSEN"; 2002. 384 p.

12. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Hazardous as Regards Anthrax Areas in the Russian Federation]. M.: "InterSEN"; 2005. 829 p.

13. Shestakova I.V. [Anthrax does not forgive errors: assessment of the data, following the outbreak in Yamal in the summer, 2016]. *Zhurnal Infektologii.* 2016; 8(3):5–27. DOI: 10.22652/2072-6732-2016-8-3-5-27.

Authors:

Bazarova G.Kh., Rozhdestvensky E.N. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altaisk, 649002, Russian Federation. E-mail: altai-chuma@mail.ru.

Luk'yanenko N.V., Saldan I.P. Altai State Medical University. 40, Lenina Avenue, Barnaul, 656038, Russian Federation. E-mail: rector@agmu.ru.

Shevchenko V.V. Territorial Clinical Hospital. 1, Lyapidevskogo St., Barnaul, 656024, Russian Federation.

Об авторах:

Базарова Г.Х., Рождественский Е.Н. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: altai-chuma@mail.ru.

Лукьяненко Н.В., Салдан И.П. Алтайский государственный медицинский университет. Российская Федерация, 656038, г. Барнаул, проспект Ленина, д. 40. E-mail: rector@agmu.ru.

Шевченко В.В. Краевая клиническая больница. Российская Федерация, 656024, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, 1.

Поступила 27.04.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:13–18. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-13-18**

УДК 616.98:579.841.95(470)

Т.Ю.Кудрявцева[1], В.П.Попов[2], А.Н.Мокриевич[1], А.В.Мазепа[3], Л.П.Окунев[3], А.В.Холин[3], Е.С.Куликалова[3], М.В.Храмов[1], И.А.Дятлов[1], Д.В.Транквилевский[4]

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИТУАЦИИ ПО ТУЛЯРЕМИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016 г., ПРОГНОЗ НА 2017 г.

[1]ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск; [2]ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, Москва; [3]ФКУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск; [4]ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии», Москва, Российская Федерация

На территории Российской Федерации в 2016 г. зарегистрировано 123 случая инфицирования человека *Francisella tularensis,* 90 % из них приходится на три федеральных округа: Северо-Западный, Сибирский и Центральный. Эпизоотические проявления инфекции различной степени интенсивности выявлены в 56 регионах. Значительное число больных туляремией наблюдалось в Республике Карелия, Ненецком автономном округе, Омской и Рязанской областях, Санкт-Петербурге. Обращают на себя внимание некоторые современные особенности проявления туляремии: неспецифичность клинических симптомов, особенно на ранних стадиях заболевания, их разнообразие возрастает при наблюдающихся в последнее время случаях микст-инфицирования возбудителями туляремии и других природноочаговых инфекций. Наиболее выраженными симптомами болезни являются лихорадка и лимфаденит; диагноз «туляремия» устанавливается в первые дни обращения за медицинской помощью у 40–45 % заболевших. На основании анализа данных о заболеваемости людей, эпизоотологическом состоянии природных очагов туляремии, числе выделенных культур возбудителя, численности основных носителей и переносчиков, а также с учетом объемов вакцинопрофилактики в регионах определены территории, на которых наиболее вероятны эпидемические осложнения в 2017 г.

Ключевые слова: туляремия, *Francisella tularensis*, природные очаги, эпидемическая ситуация, эпизоотическая ситуация.

Корреспондирующий автор: Мокриевич Александр Николаевич, e-mail: mokrievich@obolensk.org.

T.Yu.Kudryavtseva[1], V.P.Popov[2], A.N.Mokrievich[1], A.V.Mazepa[3], L.P.Okunev[3], A.V.Kholin[3], E.S.Kulikalova[3], M.V.Khramov[1], I.A.Dyatlov[1], D.V.Trankvilevsky[4]

Epidemiological and Epizootiological Analysis of the Situation on Tularemia in the Russian Federation in 2016 and Forecast for 2017

[1]State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; [2]Plague Control Center of the Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation; [3]Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; [4]Federal Center of Hygiene and Epidemiology, Moscow, Russian Federation

123 cases of human infection with *Francisella tularensis* were registered in the territory of the Russian Federation in 2016. 90 % of the total number was reported by three Federal Districts: North-Western, Siberian, and Central ones. Epizootic manifestations of varying intensity were detected in 56 regions. A considerable number of tularemia cases were observed in the Republic of Karelia, Nenets Autonomous District, Omsk and Ryazan Regions, and in Saint-Petersburg. Conspicuous are some recent peculiarities of tularemia manifestations: non-specificity of clinical symptoms, especially at early stages of the disease, their increasing variability against the background of mixed infections with tularemia and other natural-focal infections agents. The most expressed symptoms are fever and lymphatic adenitis; the patients are diagnosed with tularemia during initial days of the sought treatment in 40-45 % of the cases. Based on the data on morbidity rates in humans, epizootiological condition of natural tularemia foci, the numbers of isolated cultures and incidence of the vectors and carriers of the agent, as well as taking into consideration the scope of preventive vaccination in the regions, identified were the territories in which epidemic complication are most likely to occur in 2017.

Key words: tularemia*, Francisella tularensis,* natural foci, epidemic situation, epizootic situation.

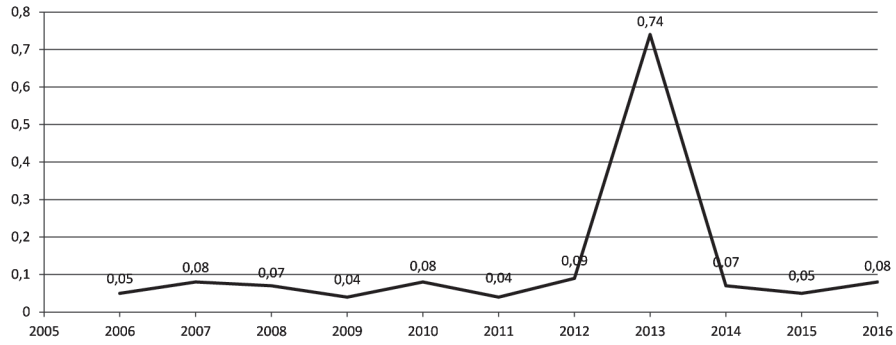
Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aleksandr N. Mokrievich, e-mail: mokrievich@obolensk.org.

Citation: Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N., Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kulikalova E.S., Khramov M.V., Dyatlov I.A., Trankvilevsky D.V. Epidemiological and Epizootiological Analysis of the Situation on Tularemia in the Russian Federation in 2016 and Forecast for 2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:13–18. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-13-18

На территории России в последние десятилетия туляремия проявляется спорадической заболеваемостью (от 50 до 150 случаев в год) и эпидемическими вспышками. Динамика заболеваемости туляремией за 2006–2016 годы представлена на рисунке.

В 2016 г. зарегистрировано 123 случая заболевания людей туляремией на территории 23 субъектов Российской Федерации, 90 % из них приходится на три федеральных округа: Северо-Западный (СЗФО) – 55 случаев, Сибирский (СФО) – 33 случая и Центральный (ЦФО) – 21 случай (таблица). Для сравнения, в 2015 г. зарегистрирован 71 случай. Можно выделить субъекты, в которых последние десять лет регистрируются случаи заболевания лю-



Динамика заболеваемости туляремией в Российской Федерации в 2006–2016 гг. (на 100 тыс. населения)

дей туляремией практически ежегодно. В СЗФО – Архангельская, Ленинградская области и Санкт-Петербург, в ЦФО – Москва, Московская и Рязанская области, в Приволжском (ПФО) – Нижегородская область, в Уральском (УФО) – Челябинская область, в СФО – Кемеровская, Новосибирская, Омская и Томская области. Только в Архангельской, Новосибирской и Омской областях объемы вакцинопрофилактики за последние годы снизились не так значительно, как в остальных «постоянно болеющих туляремией» регионах. К концу 2016 г. уровень иммунопрофилактики туляремии превысил прошлогоднее значение, но находится на очень низких показателях в 27 субъектах Российской Федерации, в которых в последние годы регистрировались случаи заболевания человека.

Зарегистрированные случаи заболевания человека туляремией на территории Российской Федерации в 2016 г.

Субъект	Число случаев туляремии среди населения	Число случаев туляремии по федеральным округам
Владимирская область	3	ЦФО – 21
Воронежская область	1	
Московская область	3	
Орловская область	1	
Рязанская область	10	
Москва	3	
Республика Карелия	25	СЗФО – 55
Архангельская область	5	
Ненецкий авт. округ	10	
Вологодская область	1	
Мурманская область	1	
Санкт-Петербург	13	
Краснодарский край	1	ЮФО – 4
Крым	3	
Кировская область	1	ПФО – 8
Нижегородская область	5	
Ульяновская область	2	
Челябинская область	1	УФО – 1
Кемеровская область	2	СФО – 33
Новосибирская область	7	
Омская область	24	
Приморский край	1	ДФО – 1
Всего по РФ	123	

Обязательная регистрация случаев заболевания людей туляремией была введена в 1941–1942 гг. Однако до сих пор диагностика туляремии является трудной задачей из-за наличия неспецифических симптомов, характерных для других инфекционных заболеваний, особенно в ранний период. Наиболее манифестными симптомами болезни являются лихорадка и лимфаденит. В настоящее время диагноз «туляремия» устанавливается в первые дни обращения за медицинской помощью не более чем у 40–45 % больных. В структуре диагнозов при обращении к врачу отмечены: лимфаденит, лихорадка неясного генеза, ангина, пневмония, ОРЗ, ОРВИ, бронхит, инфекционный мононуклеоз, фурункулез, менингит, энцефалит, полинейропатия, иерсиниоз, геморрагический васкулит, узловатая эритема, конъюнктивит, грипп, острая кишечная инфекция, укус насекомого [1, 6].

Еще большее разнообразие клинических симптомов добавляют установленные в последнее время случаи заражения людей одновременно (или неодновременно) туляремией и возбудителями других природно-очаговых инфекций: в Котласском районе Архангельской области зарегистрированы два микстинфицированных больных туляремией и лептоспирозом [2], а в Челябинской области – туляремией и псевдотуберкулезом [3].

Своевременность и адекватность назначения антибиотиков при подозрении на туляремию имеет большое значение. Анализ лечения больных в Архангельской области в последние годы показал, что только 10–13 % больных получали эффективную стартовую терапию антибиотиками из групп аминогликозидов, тетрациклинов или фторхинолонов. Иногда пациента лечили до двух месяцев и прописывали до 7 курсов различных антибиотиков [6]. Назначение бета-лактамных антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы) обычно малоэффективно, так как микроб обладает бета-лактамазной активностью. Также значительная часть культур *F. tularensis* subsp. *holarctica,* выделяемых на территории Российской Федерации, представлена эритромицинустойчивыми штаммами.

Высокая спорадическая заболеваемость туляремией в 2016 г. наблюдалась в Республике Карелия, Ненецком автономном округе, Омской и Рязанской областях.

На территории ЦФО зарегистрирован в 2016 г. 21 больной туляремией (за аналогичный период прошлого года – 10), случаи отмечены в 6 субъектах округа: Рязанской, Владимирской, Воронежской, Орловской, Московской областях и Москве. Исследования зоолого-энтомологического материала в 2016 г. проводились во всех субъектах ЦФО. Среди них к территориям с высокой численностью мелких млекопитающих (15 % попадания в орудия лова и более) относятся Тульская, Калужская, Липецкая, Воронежская, Ярославская и Брянская области. Активность природных очагов туляремии отмечена в 14 субъектах ЦФО. При помощи иммунологических и молекулярно-генетических методов среди грызунов и насекомоядных положительные находки были отмечены в Тульской, Рязанской, Липецкой, Тамбовской, Калужской, Курской, Смоленской, Тверской, Ивановской, Воронежской, Брянской областях и Москве. При исследовании погадок хищных птиц антигены возбудителя выявлены в Московской, Рязанской и Орловской областях. Выделено 4 культуры в Ярославской области.

В Рязанской области ежегодно регистрируются случаи заболевания туляремией. В 2016 г. заболели 10 человек, 4 – дети. Следы эпизоотий выявлены в 2016 г. в 10 из 25 районов области: Чучковском, Сасовском, Рыбновском, Ряжском, Спасском, Шиловском, Старожиловском, Скопинском, Клепиковском и Михайловском. В Старожиловском и Клепиковском районах лабораторно исследовано 43 погадки хищных птиц, 15 из них с наличием антигена возбудителя туляремии, что составляет 34,8 %. По непонятным пока причинам с 2014 г. в Рязанской области резко снизился уровень вакцинации. Если в 2012 г. было вакцинировано и ревакцинировано 48240 человек, то в 2014 г. – 9993, в 2015 г. – 1778, а в 2016 г. – 13015.

На территории СЗФО в 2016 г. зарегистрировано 55 больных туляремией (11 – в аналогичный период прошлого года), случаи отмечены в 6 субъектах округа: Республике Карелия, Ненецком автономном округе (АО), Архангельской, Вологодской, Мурманской областях и Санкт-Петербурге.

Исследования зоолого-энтомологического материала проводились во всех субъектах СЗФО, кроме Ненецкого АО. Циркуляция возбудителя туляремии установлена в Калининградской, Ленинградской, Псковской, Архангельской, Мурманской областях и Республике Карелия. Инфицированные мелкие млекопитающие обнаружены в Калининградской, Ленинградской, Псковской, Архангельской областях, Республике Карелия. Антигены возбудителя туляремии выявлены при исследовании клещей в Ленинградской и Архангельской областях, комаров – Архангельской области, погадок хищных птиц – Республике Карелия, Мурманской и Псковской областях, помета грызунов – Республике Карелия, воды открытых водоемов – Республике Карелия и Архангельской области, гнезд грызунов – Республике Карелия. Выделено 10 культур в Ленинградской области. В 2017 г. прогнозируется продолжение эпизоотий в Архангельской, Ленинградской областях и Республике Карелия.

В Республике Карелия было зарегистрировано 25 больных туляремией в 2016 г. Высокая вероятность заболевания людей туляремией в Карелии прогнозировалась в прошлом году в связи с очень низким уровнем иммунопрофилактики, высокой численностью мелких млекопитающих и широкой циркуляцией возбудителя в природных биотопах [4]. Основными местами распространения инфекции стали Прионежский и Пряжинский районы. Несколько случаев зарегистрировано в Олонецком, Сортавальском и Кондопожском районах. Клиническая форма заболевания – язвенно-бубонная, в одном случае – легочная; механизм заражения во всех случаях трансмиссивный. В Республике Карелия с 2000 по 2015 год было вакцинировано 30 человек, за 10 месяцев 2016 г. – 26, ревакцинация не проводилась. В 2016 г. в Карелии активные очаги туляремии зарегистрированы в Прионежском (Заозерье, Шуя, Ладва-Ветка, Деревянка, Руднаволок, Верховье, Таржеполь) и Пряжинском (Падозеро) районах, а также в различных районах Петрозаводска. Вероятность возникновения новых спорадических случаев заболевания людей в 2017 г. остается высокой.

В Ненецком АО в 2016 г. зарегистрировано 10 заболевших туляремией, 6 из них – дети. Шесть человек заболели в Нарьян-Маре, два ребенка в с. Великовисочное, ребенок и взрослый в п. Искателей. Сложившаяся неблагоприятная эпидемическая обстановка в трех достаточно отдаленных населенных пунктах свидетельствует об активности природных очагов туляремии на огромной территории округа. Для правильной оценки эпидемической обстановки необходимо проведение эпизоотологического мониторинга носителей и переносчиков возбудителя туляремии, выявление инфицированности среди них, анализа воды открытых водоемов, колодцев и других объектов окружающей среды и проведение профилактических мероприятий в местах проживания населения.

При проведении иммунологических исследований материала от мелких млекопитающих на территории Южного федерального округа (ЮФО) положительные находки были отмечены в Республике Адыгея, Волгоградской области и Республике Крым. При исследовании клещей антигены возбудителя обнаружены в Республике Крым, Волгоградской и Ростовской областях. При исследовании погадок антигены возбудителя обнаружены в Республике Калмыкия и Краснодарском крае. Таким образом, циркуляция возбудителя туляремии отмечена в шести субъектах ЮФО.

На территории Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) в Ставропольском крае и Карачаево-Черкесской Республике выявлены инфицированные клещи. По сравнению с аналогичным

периодом прошлого года отмечено значительное увеличение численности мелких млекопитающих в закрытых лугово-полевых, околоводных стациях и населенных пунктах. Большую долю отловленных инфицированных мелких млекопитающих в Ставропольском крае и Республике Северная Осетия составляли домовые мыши. Это повышает вероятность заражения людей в осенне-зимний период в связи с возможной зимней миграцией мышевидных грызунов в жилища людей и инфицированием воды и продуктов питания.

На территории ПФО в 2016 г. зарегистрировано 8 больных туляремией в Нижегородской, Кировской и Ульяновской областях (21 – за аналогичный период прошлого года). Исследования зоолого-энтомологического материала проводились на территории всех субъектов ПФО, в восьми из них отмечена циркуляция возбудителя туляремии. Инфицированные мелкие млекопитающие выявлены в Кировской, Нижегородской, Пензенской, Оренбургской областях и Республике Татарстан. При исследовании клещей антигены возбудителя обнаружены в Удмуртской Республике и Саратовской области. При исследовании комаров циркуляция возбудителя выявлена в Республике Татарстан, что указывает на активность очагов. При исследовании погадок хищных птиц положительные результаты получены в Республиках Мордовия и Удмуртия, Кировской области. При исследовании воды открытых водоемов инфицированные пробы не обнаружены. Антигены возбудителя обнаружены при исследовании гнезд грызунов в Удмуртской Республике. Прогнозируются локальные эпизоотии в Кировской, Нижегородской, Пензенской, Саратовской и Оренбургской областях, в Республике Мордовия и Удмуртской Республике.

На территории УФО в 2016 г. зарегистрирован один больной туляремией. Эпизоотическая активность очагов туляремии зарегистрирована в Курганской, Челябинской и Тюменской областях, а также в Ханты-Мансийском и Ямало-Ненецком АО. Осенью 2016 г. по сравнению с аналогичным периодом прошлого года отмечено значительное увеличение численности мелких млекопитающих во всех обследованных природных биотопах Тюменской области. Учитывая повышение показателя прокормления нимф иксодовых клещей, в 2017 г. следует ожидать некоторого увеличения численности переносчиков в природных очагах клещевых инфекций.

Эпизоотическая активность очагов туляремии продолжает сохраняться в Ханты-Мансийском АО. Уровень серопозитивных проб от мелких млекопитающих составил 10,7 %, а от кровососущих двукрылых – 50 %. Выявлены следы эпизоотической активности в Ямало-Ненецком АО, где от мелких млекопитающих, отловленных в окрестностях г. Лабытнанги, получены серопозитивные пробы (16,7 %). Возможно продолжение эпизоотий в Челябинской и Курганской областях, Ханты-Мансийском АО.

На территории СФО зарегистрировано 33 больных туляремией в Кемеровской, Омской и Новосибирской областях. При исследовании иммунологическими и молекулярно-генетическими методами инфицированные млекопитающие зарегистрированы в Республике Бурятия, Алтайском крае, Кемеровской, Омской и Томской областях. Инфицированные клещи выявлены в Алтайском крае и Томской области. При исследовании комаров циркуляция возбудителя выявлена в Алтайском крае, слепней – в Томской области. Антигены возбудителя обнаружены при исследовании гнезд грызунов в Красноярском крае и Новосибирской области, погадок хищных птиц и помета хищных млекопитающих – Республике Бурятия, Красноярском крае, Новосибирской области, воды открытых водоемов – Республике Алтай и Омской области.

В Омской области в 2016 г. прогнозировалось обострение эпизоотической ситуации, так как серопозитивные результаты были получены в 2015 г. из полевого материала в 9 из 33 районов области. Сложившиеся климатические условия весны и середины лета в регионе позволили прогнозу осуществиться. В апреле был мощный паводок на р. Иртыш с подтоплением населенных пунктов. Большое количество талых и паводковых вод спровоцировало резкое увеличение численности кровососущих членистоногих, что отмечено увеличением обращений жителей по поводу укусов. А в июле прошел мощный циклон: за несколько часов выпало три месячных нормы осадков. Подтопление жилья и участков способствовало распространению инфекции. На территории области в 2016 г. зарегистрировано 24 больных туляремией, половина заболевших – дети. При анализе карт эпизоотолого-эпидемиологического обследования очагов туляремии установлено, что заболевания носят спорадический характер, групповая и вспышечная заболеваемость не выявлена. Большая часть случаев заболевания приходится на жителей Омска, выезжающих в сельские районы на отдых, рыбалку и садовые участки. Заболевания регистрировались как в энзоотичных (Большеуковский, Крутинский, Знаменский, Полтавский), так и в неэнзоотичных (Калачинский, Горьковский, Омский, Одесский, Нововаршавский, Павлоградский, Октябрьский округ г. Омска) районах области. Ведущий тип передачи – трансмиссивный. Преобладали ульцерогландулярная (язвенно-бубонная), гландулярная (бубонная) и ангинозно-бубонная клинические формы. Регистрировались как свежие случаи заболеваний в острой форме (нарастание титра антител в два и более раз в динамике, показатели титра антител выше 1:1280 в сыворотках больных), так и клинические проявления у пациентов, имеющих в анамнезе вакцинацию (титры антител в сыворотках 1:80–1:640, и не имеют нарастания при исследовании парных сывороток). В трех случаях при обследовании территории очага обнаружены положительные находки среди проб окружающей

среды с подтверждением серологическим методом. В 2016 г. в Омской области активные очаги выявлены в 14 районах, охватывающих все природные зоны региона. Уровень серопозитивных находок составил от 4,7 до 20 %. Вероятность возникновения новых спорадических случаев заболевания людей в 2017 г. остается высокой.

Выделено 19 культур возбудителя на территории Республики Алтай. В 2016 г. при оперативной идентификации в Референс-Центре по мониторингу за природно-очаговыми инфекциями на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института из 19 штаммов *Francisella tularensis* (из воды – в Алтайском, Красногорском и Чойском районах; из клещей – в Чойском районе, с. Паспаул, Майминском районе, Ак-Кол, Алтайском районе, Верх-Ая, выше Верх-Ая, Красногорском районе, с. Луговое Республики Алтай) по комплексу молекулярно-генетических и биохимических свойств десять изолятов отнесены к подвиду *holarctica*, а девять – к *mediasiatica.* В Республике Алтай, несмотря на интенсивное обсеменение объектов окружающей среды и выделение вирулентных штаммов двух подвидов возбудителя от иксодовых клещей и из воды открытых водоемов, эпидемические осложнения не выявлены, от мелких млекопитающих культура возбудителя не выделена, и отсутствовали серологические находки в объектах окружающей среды. Тем не менее выделение высоковирулентных штаммов туляремийного микроба и инфицирование объектов окружающей среды (кровососущие членистоногие, вода открытых водоемов, мелкие млекопитающие) указывают на неблагоприятную эпидемиологическую ситуацию в отношении этой опасной природно-очаговой инфекции и на существование риска возникновения эпидемических осложнений у местного населения, а также посещающих с различными целями рекреационные зоны природных биотопов. Изоляты туляремийного микроба среднеазиатского подвида впервые выделены на территории Российской Федерации в 2011 г. в Алтайском крае из объектов окружающей среды [5]. В последующие годы они выделялись в Республике Алтай и Красноярском крае. В настоящее время существует необходимость изучения вопросов эпидемиологии, экологии и эпизоотологии возбудителя туляремии среднеазиатского подвида, а также тщательного эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природных очагов для определения границ их распространения. Сохраняется вероятность спорадических случаев заболеваемости в местах циркуляции возбудителя.

В Новосибирской области в северной части района Барабинской зоны на фоне эпидемических осложнений впервые за восемь лет эпизоотологических исследований не обнаружено серопозитивных проб от мелких млекопитающих, отловленных на территориях природных очагов туляремии. Из других объектов окружающей среды выявлены положительные пробы в 2,7–6 % случаев. В 2017 г. сохранится вероятность инфицирования населения, посещающего природные околоводные биотопы Барабинской и Присалаирской ландшафтных зон.

Активизация эпизоотических процессов в 2017 г. ожидается в природных очагах туляремии с высокой численностью мелких млекопитающих – в равнинной части Алтайского края. Локальные эпизоотии туляремии возможны на территории Алтайского и Красноярского краев, Республики Алтай, Новосибирской и Омской областей. Исследования зоолого-энтомологического материала в 2016 г. проводились на территории всех субъектов Дальневосточного федерального округа (ДФО), кроме Чукотского автономного округа. Активность очагов туляремии отмечена в Республике Саха (Якутия), Сахалинской области, Камчатском, Хабаровском и Приморском краях, Амурской области и Еврейской автономной области. На территории ДФО зарегистрирован один больной туляремией. Маркеры возбудителя обнаружены при исследовании клещей из природных биотопов в Сахалинской области и клеща, укусившего человека в Камчатском крае, гнезд грызунов – в Хабаровском крае, погадок хищных птиц – в Республике Саха (Якутия), воды открытых водоемов – в Хабаровском крае.

В Хабаровском крае после эпидемических осложнений и усиления эпизоотической активности в очагах в 2015 г. наступило относительное затишье. Возбудитель из объектов окружающей среды не выделялся, но уровень серопозитивных проб, доставленных из Хабаровского и Шимановского районов, колебался от 7,7 до 19,6 %, ДНК возбудителя обнаружена в воде открытых водоемов, в пробах из органов мелких млекопитающих от 2,3 до 14,7 %. Результаты генодиагностического и серологического исследований полевого материала позволяют предполагать, что весной 2016 г. в Хабаровском районе продолжалась эпизоотия, а в Шимановском районе имела место локальная эпизоотия туляремии без эпидемических последствий. В 2017 г. не исключается вероятность спорадических случаев заболевания туляремией на территориях природных очагов края.

В Приморском крае на фоне вялотекущей эпизоотии среди грызунов второй группы чувствительности и восприимчивости к возбудителю получено 10,9 % серопозитивных проб от мелких млекопитающих, 3,0 % – из других объектов окружающей среды. На фоне роста численности мелких млекопитающих во всех ландшафтных зонах региона в 2016 г. сохраняется вероятность эпизоотических проявлений и возникновения спорадических случаев заболевания в 2017 г.

Из материалов за 2016 г. об эпизоотическом состоянии природных очагов и численности основных носителей и переносчиков возбудителя туляремии, данных по заболеваемости людей туляремией, выделению культур *F. tularensis* следует, что природные очаги активны в 56 регионах. Наиболее вероятны эпидемические осложнения (случаи заболе-

вания людей туляремией) в связи с недостаточным или очень низким уровнем иммунопрофилактики (подчеркнутые регионы), высокой численностью мелких млекопитающих и широкой циркуляцией возбудителя в природных биотопах в 2017 г. на территориях: ЦФО – Москва, Московская, Рязанская и Воронежская области; СЗФО – Республика Карелия, Архангельская, Ленинградская области и Санкт-Петербург; СКФО – Ставропольский край; ПФО – Кировская, Нижегородская области и Удмуртская Республика; УФО – Челябинская область; СФО – Новосибирская, Омская, Кемеровская и Томская области, Алтайский край, Республика Алтай, ДФО – Хабаровский край.

Представление населению подробной информации о туляремии, основных симптомах заболевания и мерах лечения и профилактики с использованием средств индивидуальной защиты (акарициды, репелленты) и вакцинации, а также проведение в полном объеме дератизационных, акарицидных и дезинфекционных мероприятий на территориях проживания, деятельности и отдыха населения сразу же после получения результатов эпизоотического исследования позволит избежать эпидемических осложнений не только с приходом тепла весной и летом следующего года, но и в наступившую позднюю осень и зиму.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова Т.Н., Попов В.П., Полухина А.Н., Орлов Д.С., Мещерякова И.С., Михайлова Т.В. Эпизоотическое и эпидемическое проявление природных очагов туляремии на территории Московской области (1965–2013 гг.). *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2015; 2:24–31.

2. Демидова Т.Н., Попов В.П., Орлов Д.С., Михайлова Т.В., Мещерякова И.С. Современная эпидемиологическая ситуация по туляремии в Северо-Западном Федеральном округе России. *Эпидемиол. и вакцинопрофилакт.* 2016; 5(90):14–23.

3. Демидова Т.Н., Семихин А.С. Природные очаги в Челябинской области в настоящее время. В кн.: Сборник трудов по туляремии, посв. 100-летию д.м.н., проф. М.А.Айкимбаева. Алматы; 2016. С. 130–5.

4. Кудрявцева Т.Ю., Транквилевский Д.В., Мокриевич А.Н., Попов В.П., Морозова Н.С., Зароченцев М.В., Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Косилко С.А., Федоров Ю.М., Храмов М.В., Дятлов И.А. Эпизоотическая и эпидемическая ситуация по туляремии в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 год. *Пробл. особо опасных инф*. 2016; 1:28–32. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-28-32.

5. Мокриевич А.Н., Тимофеев В.С., Кудрявцева Т.Ю., Уланова Г.И., Карбышева С.Б., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Губарева Т.И., Павлов В.М., Дятлов И.А. Выделение среднеазиатского подвида туляремийного микроба на территории Алтайского края. *Пробл. особо опасных инф*. 2013; 1:66–9.

6. Титова Л.В., Самодова О.В., Кригер Е.А., Гордиенко Т.А., Круглова Н.В., Щепина И.В., Гонтова Ю.В. Туляремия в Архангельской области: клинико-эпидемиологическая характеристика. *Журн. инфектологии.* 2016; 2:78–84.

References

1. Demidova T.N., Popov V.P., Polukhina A.N., Orlov D.S., Meshcheryakova I.S., Mikhailova T.V. [Epizootic and epidemic manifestation of natural tularemia foci in the territory of the Moscow Region (1956–2013)]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*. 2015; 2:24–31.

2. Demidova T.N., Popov V.P., Orlov D.S., Mikhailova T.V., Meshcheryakova I.S. [Current epidemiological situation on tularemia in the North-Western Federal District of Russia]. *Epidemiol. Vaktsinopropfilakt.* 2016; 5(90):14–23.

3. Demidova T.N., Semikhin A.S. [Natural foci in the Chelyabinsk Region to date]. In: [Collection of Research Papers on Tularemia, Devoted to the 100th Anniversary of M.A.Aikimbaev, Doctor of Medical Sciences, Professor]. Almaty; 2016. P. 130–5.

4. Kudryavtseva T.Yu., Trankvilevsky D.V., Mokrievich A.N., Popov V.P., Morozova N.S., Zarochentsev M.V., Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kosilko S.A., Fedorov Yu.M., Khramov M.V., Dyatlov I.A. [Epizootic and epidemic situation on tularemia in the Russian Federation in 2015 and prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:28–32.DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-28-32.

5. Mokrievich A.N., Timofeev V.S., Kudryavtseva T.Yu., Ulanova G.I., Karbysheva S.B., Mironova R.I., Vakhrameeva G.M., Gubareva T.I., Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Isolation of central-asian subspecies of tularemia agent in the Altai Territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:66–9.

6. Titova L.V., Samodova O.V., Kriger E.A., Gordienko T.A., Kruglova N.V., Shchepina I.V., Gontova Yu.V. [Tularemia in the Arkhangelsk Region: clinical-epidemiological characteristics]. *Zh. Infektologii*. 2016; 2:78–84.

Authors:

Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N., Khramov M.V., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: anisimov@obolensk.org.

Popov V.P. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nln.ru.

Mazepa A.V., Okunev L.P., Kholin A.V., Kulikalova E.S. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Trankvilevsky D.V. Federal Center of Hygiene and Epidemiology. 19 a, Varshavskoe Highway, Moscow, 117105, Russian Federation. E-mail: gsen@fcgie.ru.

Об авторах:

Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н., Храмов М.В., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: anisimov@obolensk.org.

Попов В.П. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nln.ru.

Мазепа А.В., Окунев Л.П., Холин А.В., Куликалова Е.С. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Транквилевский Д.В. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии. Российская Федерация, 117105, Москва, Варшавское шоссе д.19 а. E-mail: gsen@fcgie.ru.

Поступила 20.02.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:19–22. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-19-22**

УДК 616.98:579.842.23

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

ИЗМЕНЕНИЕ ГРАНИЦ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ ВОЛГО-УРАЛЬСКОГО МЕЖДУРЕЧЬЯ

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

Цель. Определение современных дислокации и размеров природных очагов чумы в Волго-Уральском междуречье. **Материалы и методы.** По результатам проведенного в 2015 г. полевого и камерального картографирования Волго-Уральских степного и песчаного очагов чумы изготовлены электронные карты секторов, расположенных на их периферии. **Результаты и выводы.** В последние 3–4 десятилетия произошло заметное сокращение энзоотичной по чуме территории в Волго-Уральском междуречье за счет распашки и мелиорации пастбищ. Установлено, что южные и юго-западные рубежи энзоотичных территорий имеют естественные границы и представлены линейными элементами гидрографии, восточные – государственной границей Российской Федерации с Республикой Казахстан. Там, где подходящие линейные элементы ландшафта отсутствуют (на севере и западе), в качестве формализованных внешних границ приняты рамки секторов, на территории которых признаки энзоотии сохранились. Распашка обширных площадей полупустыни сделала многие ее территории в восточной части Волгоградской области непригодными для обитания малого суслика, что является свидетельством утраты ими признаков энзоотичности по чуме. Это привело к сокращению площади степного очага чумы на 30 %, которая составляет теперь 20873 кв. км. Конфигурация песчаного очага практически не изменилась и в результате уточненного подсчета его площадь оказалась равной 8625 кв. км. Учет реального расположения и размеров природных очагов чумы в строго установленных границах, зафиксированных на топографических картах, обеспечивает обоснованное планирование и проведение всего комплекса профилактических противочумных мероприятий. Новые пространственные параметры природных очагов внесены в официальные нормативно-методические документы, регламентирующие проведение эпидемиологического надзора за чумой.

Ключевые слова: природный очаг чумы, картографирование, Волго-Уральское междуречье.

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

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

Modifications to the Boundaries of the Natural Plague Foci in the Volga-Ural Interfluve

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

Objective of the study is to locate the present-day sites and sizes of the natural plague foci in the Volga-Ural Interfluve. **Materials and methods**. According to the results of the field and office mapping, 2015 in the Volga-Ural steppe and sandy plague foci, designed have been electronic maps of the sectors situated in the periphery. **Results and conclusions**. During the past 3–4 decades significant decrease in plague enzooties in the territory of the Volga-Ural Interfluve has been observed. It occurs due to the plowing and melioration of the grazing lands. It is established that the southern and south-western outskirts of enzootic territories have natural boundaries represented with the linear elements of hydrography, and the eastern ones are the state border of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan. At sites where suitable linear elements of the landscape are absent (up north and west) the frames of the sectors, where evidence of enzooty is retained, are used as the formal external boundaries. Widespread plowing of semi-desert area made the territories in the eastern part of the Volgograd Region inadequate for small souslik habitation, which marks the loss of plague enzooty features. This fact in its turn led to the reduction of steppe focus acreage by 30 %, the coverage being currently 20873 km^2. Configuration of the sandy focus changed little, if at all, and amounts to 8625 km^2. Registering of the actual position and sizes of natural plague foci within the strictly set boundaries put on topographic maps provides for targeted planning and complex prophylactic anti-plague measures. New spatial indicators of natural plague foci are formalized in official normative-methodological documents regulating epidemiological surveillance over plague.

Key words: natural plague focus, mapping, Volga-Ural Interfluve.

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

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

Citation: Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Chekashov V.N., Shilov M.M. Modifications to the Boundaries of the Natural Plague Foci in the Volga-Ural Interfluve. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:19–22. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-19-22

Освоение целинных и залежных земель в южных регионах нашей страны послужило причиной перевода значительных площадей степных и полупустынных пастбищ в разряд обрабатываемых сельскохозяйственных угодий богарного или поливного типа. Рост посевных площадей во второй половине XX века и одновременное опустынивание Прикаспийской низменности, связанное с падением уровня грунтовых вод и общей аридизацией климата [1], привели к сокращению и существенной деградации пастбищных земель. Последовавший за этим процесс восстановления естественных растительных сообществ, обусловленный спадом сельскохозяйственного производства в последние десятилетия прошлого века и подъемом уровня Каспийского моря, ознаменовал прекращение процесса опустынивания [5, 8]. В начале третьего тысячелетия в результате внедрения современной агротехники и четкой

организации севооборота происходило закрепление сформировавшейся к этому моменту конфигурации посевных площадей и, соответственно, границ сохранившихся естественных пастбищ, на которых продолжают обитать грызуны – основные носители возбудителя чумы.

Большая часть Волго-Уральского междуречья южнее 51° с.ш. входит в состав двух смежных природных очагов чумы. Их типичные сухостепные, полупустынные и пустынные ландшафты продолжают служить оптимальными местообитаниями для грызунов, в популяциях которых с различной периодичностью регистрируются эпизоотии чумы. Проведенная в 70–80 годы XX столетия паспортизация природных очагов чумы СССР определила пространственные характеристики каждого из них на уточненной картографической основе [7]. Задокументированные в то время границы очагов соответствовали историческим ареалам основных носителей чумного микроба и охватывали все известные места регистрации эпизоотических и эпидемических проявлений в прошлом. В течение последующих четырех десятилетий очертания очагов не подвергались пересмотру. Однако в связи с продолжившимся увеличением посевных площадей за счет распашки целинных участков, рекультивации залежей и закладки новых орошаемых земель стало очевидным существенное сокращение энзоотичных по чуме территорий в Нижнем Поволжье. Для определения эпизоотологического статуса окраин очагов чумы Волго-Уральского междуречья проведено их картографирование 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 проводили путем обработки имеющихся картографических источников (растровые копии цифровых топографических карт, космоснимки из доступных веб-ресурсов) и анализа результатов полевого картографирования на территории Волго-Уральского междуречья с использованием ГИС-технологий [4]. Итоговые картографические материалы, полученные в ходе исследований, использованы при обновлении электронных паспортов изученных природных очагов по установленным ранее правилам [3, 6].

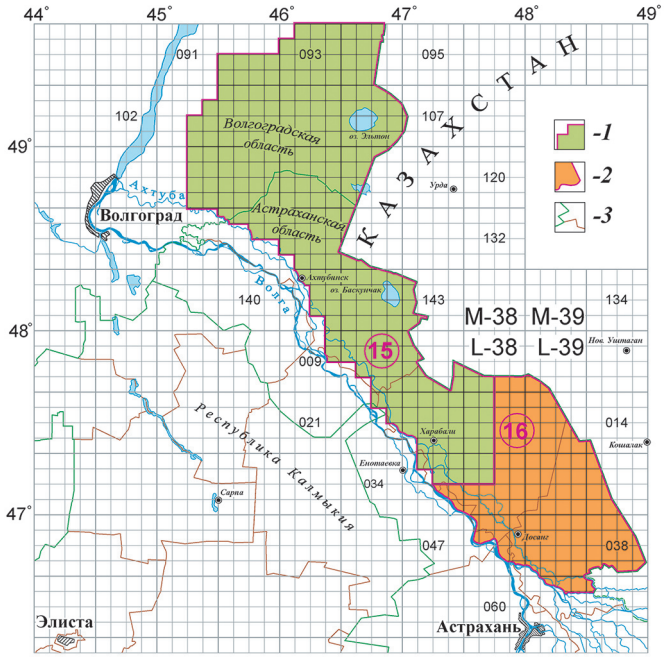
В мае–июне 2015 г. для уточнения границ природных очагов чумы Волго-Уральского междуречья проведено полевое картографирование территории, расположенной в восточных районах Волгоградской области и северо-восточных районах Астраханской области. Во время этой экспедиции использовали в полевых условиях планшетный компьютер, совмещенный с модулем GPS/ГЛОНАСС позиционирования. Основной метод работы – объезд периферийных территорий очагов, закладка пеших маршрутов, учет численности грызунов, идентификация ландшафтов с помощью космических снимков. Для работы использовали открытые крупномасштабные топографические карты последних лет съемки (с 2001 по 2010 год) масштабов 1:25000, 1:50000, 1:100000 и космические снимки из сети Интернет.

Для пространственного анализа явлений и событий, происходящих на территории природных очагов чумы, в противочумной практике используется их формально-территориальная дифференциация на стандартные участки, именуемые «секторами». В качестве секторов приняты листы государственных топографических карт масштаба 1:25000. Поскольку рамками секторов (топографических карт) являются определенные параллели и меридианы, то общие карты очагов изображаются с нанесенной на них градусной сеткой с соответствующими параметрами.

Результаты и обсуждение

Осмотр территории Волго-Уральского песчаного очага чумы проведен лишь в области межевания со степным очагом, основное же внимание уделено камеральному изучению современных карт и космических снимков. Установлено, что общий ландшафтный облик всей территории очага остался прежним, что не потребовало вносить какие-либо изменения в его очертания. Тем не менее, требовалось однозначно определить линейные элементы ландшафта, пригодные для использования в качестве границ, и обозначить их на крупномасштабной топографической карте. На юге и юго-западе очага использованы береговые линии речных русел, на востоке – линия государственной границы Российской Федерации с Республикой Казахстан (рисунок). На севере и северо-западе провели формализованную границу между смежными песчаным и степным очагами по рамкам секторов, исходя из тех же принципов, что и при межевании Прикаспийского Северо-Западного степного и Прикаспийского песчаного очагов чумы [2]. Учитывая достаточную условность такой границы, мы выполнили ее выравнивание, что оправдывается сложной и малоразличимой биоценотической структурой поселений грызунов на тех и других приграничных территориях.

Для измерения площадей фрагментов Волго-Уральского песчаного очага чумы и неэнзоотичных участков, дислоцированных на территориях тех секторов, по которым проходит его естественная (ландшафтная) граница, использованы растровые копии цифровых топографических карт масштаба 1:25000. Площадь центральной проекции земной поверхности, изображенной на одном листе карты (секторе), была вычислена заранее с помощью геодезических расчетов, учитывающих реальные длины дуг параллелей и меридианов без отнесения к стандартной проекции топографических карт. Отметим, что площади всех секторов, расположенных в одном широтном ряду, идентичны. Физические площади фраг-



Новые границы и территории природных очагов чумы: *1* – Волго-Уральского степного (15); *2* – Волго-Уральского песчаного (16); *3* – границы субъектов Российской Федерации и административных районов

ментов были определены тем же картометрическим способом, что и для очагов чумы Северо-Западного Прикаспия – по суммарному количеству пикселов, образующих эти фрагменты [2]. Каждый пиксель при имеющемся разрешении карт равен приблизительно 5 кв. м (0,0005 га). Площади сектора и его фрагментов округлялись до 1 га (0,01 кв. км), а всего очага – до 1 кв. км. В результате картографирования установлено, что Волго-Уральский песчаный очаг расположен на территории 120 секторов, занимая их полностью или частично, а его общая площадь равна 8625 кв. км, что мало отличается от известного ранее приближенного значения (8700 кв. км).

Отмечено, что в настоящее время на территории Волго-Уральского песчаного очага чумы в пределах Астраханской области существенно сократились площади незакрепленных, разбитых песков (барханов) и, соответственно, увеличились площади, занятые типичной для этих мест травянистой полынно-злаковой растительностью. Это произошло в результате значительного сокращения поголовья мелкого рогатого скота (отсутствие скотобоя), повышения уровня грунтовых вод и общего снижения аридности климата. В результате произошла смена доминирующего вида пустынных грызунов – при добыче зверьков орудиями лова вместо полуденной песчанки стала устойчиво преобладать гребенщиковая. Учитывая ее высокую инфекционную чувствительность к чуме и более высокие индексы обилия специфических блох на ней, можно прогнозировать возрастание частоты возникновения и уровня активности эпизоотических проявлений в очаге.

Изучение территории Волго-Уральского степного очага чумы проведено в основном вдоль его западных и северных границ, протяженность которых превышает 400 км. В качестве границы, идущей вдоль р. Ахтубы, использованы отрезки как береговых линий некоторых пойменных рек, проток и ериков, так и рамок секторов, чередующиеся между собой. При выборе границы и определения ее характера (ландшафтная или формальная) учитывали наличие поселений грызунов, способных играть роль основных носителей возбудителя чумы, и подходящих линейных элементов ландшафта. На песчаных участках Волго-Ахтубинской поймы и левобережья р. Ахтубы эпизоотический процесс могут поддерживать гребенщиковые песчанки со своими специфическими блохами. Эти территории, а также полупустынные участки с поселениями малого суслика включены в состав очага путем оконтуривания естественными или формализованными границами. Севернее Ахтубинска граница на некоторых участках отодвинулась от русла реки в связи с появлением в левобережье обширных массивов поливных сельхозугодий, за пределами которых простирается полупустынный ландшафт, служащий типичным местообитанием малого суслика.

Конфигурацию северо-западной и северной границ Волго-Уральского степного очага чумы определяли на местности с использованием различных картографических источников. Предварительное изучение источников позволило установить секторы, целиком занятые сельскохозяйственными угодьями. Выборочному контролю были подвергнуты некоторые из них, примыкающие к секторам с пастбищными землями. Пастбища проверялись на изолированность от основного массива целинных земель и наличие поселений сусликов. Секторы, содержащие лишь мелкие изолированные целинные участки, не имеющие поселений сусликов, исключались из состава очага. Весьма большая территория на севере очага (37 секторов) оказалась переведенной в разряд сельскохозяйственных земель и полностью лишенной условий для существования малого суслика. Здесь сказалась губительная роль распашек на распространение этого грызуна [5]. Южнее параллели 49° 40’ поселения сусликов уже встречаются, средняя плотность зверьков в них, как правило, низка и лишь на отдельных небольших участках достигает 10–15 особей на 1 га. Отмечено некоторое увеличение численности малого суслика при движении на восток к границе с Казахстаном.

На северо-западе очага, начиная от р. Ахтубы до северной его кромки (рисунок), произошли ощутимые изменения ландшафта, вызванные антропогенными и погодно-климатическими воздействиями. Большие массивы земель вдоль Волгоградского водохранилища заняты теперь под посевы различных сельскохозяйственных культур. Отдельные изолированные поля, находившиеся в момент картографирования в состоянии залежей и использующиеся в качестве пастбищ для крупного рогатого скота, приобрели облик лугов или высокотравных степей, не-

пригодных для обитания малого суслика. В окрестностях г. Волжский значительные площади отданы под промышленное освоение и для размещения там очистных сооружений с обширными испарителями. Непригодными для реализации энзоотии чумы признаны также верховья Волго-Ахтубинской поймы и некоторые секторы остальной ее части. В результате отмеченных преобразований из состава природного очага чумы на этих участках исключено 60 секторов.

Площади фрагментов энзоотичной территории в пределах секторов, по которым проходит естественная (ландшафтная) или государственная граница, измерены по специально изготовленным для этого растровым топографическим картам масштаба 1:25000. Установлено, что Волго-Уральский степной природный очаг чумы в границах Российской Федерации расположен на территории 269 секторов, занимая их полностью или частично. Площадь очага равна 20873 кв. км, что на 30 % меньше прежнего значения (30 тыс. кв. км).

Необходимо отметить, что уменьшение размеров природных очагов чумы за счет не энзоотичных и поэтому не обследуемых территорий осуществляется как мера документального оформления их фактического состояния. Контролируемая противочумными станциями энзоотичная площадь в результате этих действий не изменяется. Количество участков, реально представляющих эпидемиологическую угрозу, не сокращается, следовательно, отсутствует необходимость уменьшения затрат на проведение комплекса профилактических мероприятий, обеспечивающих эпидемиологическое благополучие населения по чуме.

Новые пространственные параметры природных очагов внесены в официальные нормативно-методические документы, регламентирующие организацию и проведение эпидемиологического надзора за чумой, что обеспечивает обоснованное планирование и проведение комплекса профилактических противочумных мероприятий.

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. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Шилов М.М. Изменение границ природных очагов чумы Северо-Западного Прикаспия. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 3:38–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-38-43.

3. 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.

4. Кулик К.Н., Рулев А.С., Юферев В.Г., Бакурова К.Б. Применение информационных технологий в геоэкологическом картографировании. *Вестник Калмыцкого института социально-экономических и правовых исследований.* 2004; 2:57–64.

5. Опарин М.Л., Опарина О.С. Трансформация комплекса птиц и млекопитающих степных экосистем под воздействием распашки (на примере саратовских степей). *Поволжский экологический журн.* 2010; 4:361–73.

6. Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Булычев В.П., Ларин В.В. Дифференциация Волго-Уральского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений методом круговой экстраполяции. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:33–6.

7. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Паспортизация природных очагов чумы на территории стран СНГ (картографические материалы). Деп. в ВИНИТИ. № 129–В 00. 24.01.2000. Саратов; 2000. 65 с.

8. 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.

References

1. Bakurova K.B. [Desertization: the causes and methods of the control, ecological-economical approaches]. In: [Adaptive Systems and Nature Preserving Technologies in Agricultural Manufacturing in arid regions of Volga-Don Province]. M.; 2001. P. 91–4.

2. 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 region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 3:38–43. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-38-43.

3. 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 foci on the basis of the frequency of epizootic manifestations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek*. 2012; 3(113):15–9.

4. Kulik K.N., Rulev A.S., Yuferev V.G., Bakurova K.B. [Application of information technologies in geo-ecological mapping]. *Bulletin of Kalmyk Institute of Social-Economic and Legal Research*. 2004; 2:57–64.

5. Oparin M.L., Oparina O.S. [Transformation of bird and mammal complex of steppe ecosystems under the influence of plowing (by the example of Saratov steppe)]. *Povolzhsky Ekologich. Zh*. 2010; 4:361–73.

6. Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Bulychev V.P., Larin V.V. [Volga-Ural sandy plague focus differentiation against epizootic manifestations by means of circular extrapolation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:33–6.

7. Soldatkin I.S., Rudenchik Yu.V., Popov N.V., Kuklev E.V., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N. [Passportization of the natural plague foci in the territory of the Commonwealth of Independent States (mapping data)]. Deposited into All-Union Institute of Scientific and Technical Information, Jan 24, 2000. No 129-B 00. Saratov; 2000. 65 p.

8. Trofimov I.A., Trofimova L.S., Oparin M.L., Oparina O.S. [Peculiarities of steppe vegetation restoration on fallow lands and grazing lands in the Saratov Trans-Volga Region]. In: [Current Dynamics of Ecosystem Elements in Desert-Steppe Regions of Russia]. M.: RAAS; 2001. P. 15–38.

Authors:

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

Поступила 30.11.15.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:23–27. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-23-27**

УДК 616.98:579.841.93(470)

Д.Г.Пономаренко, Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко

ОБ ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016 г. И ПРОГНОЗ НА 2017 г.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Представлен анализ заболеваемости людей и животных бруцеллезом в Российской Федерации в 2016 г. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу характеризуется как неустойчивая. Отмечено снижение количества впервые выявленного бруцеллеза у людей (на 15,8 %) на фоне возрастающих трендов по неблагополучию и ухудшение эпизоотологической ситуации по бруцеллезу КРС в регионах с развитым животноводством. Зарегистрированы случаи группового заболевания людей в трех субъектах (Ставропольском крае, Самарской и Ленинградской областях), имеющие вспышечный характер. По данным Россельхознадзора, прогноз развития эпизоотологической ситуации по бруцеллезу в России в среднесрочной перспективе неблагоприятный, что при сохранении существующей тенденции создает реальный риск широкого распространения бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных в субъектах Центрального и Приволжского федеральных округов. В 2017 г. можно прогнозировать сохранение нестабильной ситуации по бруцеллезу, уровень заболеваемости людей бруцеллезом может находиться в диапазоне 340–370 случаев.

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

Корреспондирующий автор: Пономаренко Дмитрий Григорьевич, e-mail: ponomarenko.dg@gmail.com.

D.G.Ponomarenko, D.V.Rusanova, A.N.Kulichenko

Epizootiological-Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2016 and Prognosis for 2017

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

The article presents analysis of human and animal incidence of brucellosis in the Russian Federation in 2016. Epidemiological situation on brucellosis is characterized as unstable. Outlined has been the decrease in the number of newly diagnosed brucellosis cases in humans (15.8 %) against the background of the increasing trend for distress and deterioration of the epizootiological situation on brucellosis among the cattle in the regions with well-developed animal husbandry. Cases of group infection among the population in three constituent entities (Stavropol Region, Samara and Leningrad Regions) have been registered, which are of sporadic nature. According to the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, mid-term forecast of epizootiological situation on brucellosis in Russia is unfavorable, which under the current trend constitutes a real risk of widespread brucellosis among the livestock in the regions of the Central and Volga Federal Districts. In 2017, we can predict maintaining of the unstable situation on the disease, morbidity rates among the population varying within the range of 340–370 cases.

Key words: brucellosis, incidence, epidemic manifestations, epizootic process.

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

Corresponding author: Dmitriy G. Ponomarenko, e-mail: ponomarenko.dg@gmail.com.

Citation: Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Epizootiological-Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2016 and Prognosis for 2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:23–27. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-23-27

Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации остается достаточно напряженной. В последние 20 лет в России ежегодно регистрировалось от 300 до 600 случаев впервые выявленного бруцеллеза среди людей, показатели заболеваемости составляли 0,2–0,7 на 100 тыс. населения. Наиболее неблагополучными по бруцеллезу людей являются регионы России с развитым животноводством – субъекты Северо-Кавказского (СКФО), Южного (ЮФО) и Сибирского (СФО) федеральных округов, на долю которых приходилось от 70 до 90 % заболеваний бруцеллезом [2].

Специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем бруцеллеза (ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт») проведен анализ заболеваемости бруцеллезом людей и сельскохозяйственных животных в Российской Федерации в 2016 г. Для оценки эпидемиологической и эпизоотологической обстановки по бруцеллезу использованы официальные статистические данные Роспотребнадзора и Россельхознадзора [1, 4], сведения о результатах эпидемиологических расследований случаев заболевания бруцеллезом, полученных из Управлений Роспотребнадзора в субъектах РФ и ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора.

В период с 2006 по 2015 год в России зарегистрировано 2879 неблагополучных пунктов (далее – н.п.) по бруцеллезу КРС, в которых выявлено 95759 голов (далее – гол.) животных и 409 н.п. по бруцеллезу МРС, в которых зарегистрировано 17936 больных бруцеллезом овец и коз. Анализ заболеваемости сельскохозяйственных животных свидетельствует об ухудшении эпизоотологической ситуации по бру-

Рис. 1. Динамика регистрации первичных неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС и МРС в Российской Федерации в 2006–2015 гг., 9 мес. 2016 г.

целлезу в России, тренды по неблагополучию – возрастающие (рис. 1, 2) [3].

В 2016 г. (за 9 месяцев) в Российской Федерации зарегистрировано 455 н.п. по бруцеллезу КРС (7418 гол. больных животных) и 33 н.п. по бруцеллезу МРС (926 гол. больных животных). В сравнении с аналогичным периодом 2015 г. (за 9 месяцев) наблюдается увеличение количества впервые выявленных н.п. по бруцеллезу КРС на 12,9 % (403 н.п.) и снижение числа заболевших животных на 6,67 % (7974 гол.). Необходимо отметить снижение количества н.п. по бруцеллезу МРС на 13,2 % (в 2015 г. – 38 н.п.) и количества заболевших бруцеллезом овец и коз более чем в два раза (в 2015 г. – 2106 гол.).

В 2016 г. (за 9 месяцев) н.п. по бруцеллезу КРС регистрировали преимущественно в субъектах СКФО – 76,2 % (347 н.п., 3586 гол.), ЮФО – 10,8 % (49 н.п., 1500 гол.), на долю СФО (19 н.п., 361 гол.) и Приволжского федерального округа (ПФО) (19 н.п., 1811 гол.) пришлось по 4,2 % от общего количества впервые выявленных н.п. по бруцеллезу КРС. В СКФО наиболее неблагополучная ситуация по бруцеллезу КРС сложилась на территории Карачаево-Черкесской Республики (164 н.п., 995 гол.), Республики Северная Осетия-Алания (100 н.п., 366 гол.), Ставропольского края (34 н.п., 461 гол.), Чеченской Республики (33 н.п., 391 гол.), Республики Дагестан (13 н.п., 1065 гол.). В ЮФО основное количество н.п. и больного бруцеллезом КРС выявляли в Республике Калмыкия (27 н.п., 320 гол.), Астраханской (9 н.п., 283 гол.), Волгоградской (8 н.п., 506 гол.) и Ростовской (5 н.п., 391 гол.) областях.

Бруцеллез МРС преимущественно регистрировали в ЮФО – 30,3 % (10 н.п., 369 гол.), ПФО – 18,2 (6 н.п., 183 гол.), СФО – 18,2 (6 н.п., 170 гол.), СКФО – 15,2 (5 н.п., 155 гол.) и Центральном федеральном округе (ЦФО) – 18,2 (6 н.п., 89 гол.). В ЮФО больных бруцеллезом овец и коз в основном выявляли на территории Астраханской области (6 н.п., 288 гол.), Краснодарского края (4 н.п., 81 гол.). В ПФО первичные н.п. по бруцеллезу МРС зарегистрированы в Саратовской (4 н.п., 134 гол.) и Нижегородской (2 н.п., 18 гол.) областях, в СКФО – Республике Дагестан (2 н.п., 129 гол.), Ставропольском крае (1 н.п., 21 гол.) и Республике Ингушетия (2 н.п., 5 гол.).

В 2016 г. в Российской Федерации зарегистрирован 331 случай заболевания людей бруцеллезом, интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения (ИП) составил 0,23. В сравнении с 2015 г. (393 случая, ИП – 0,27) наблюдается снижение количества впервые выявленного бруцеллеза у людей на 15,8 % (рис. 3). Выявлен 31 случай бруцеллеза среди детей до 17 лет (ИП – 0,11), что на 14,8 % выше заболеваемости среди детей в 2015 г. (27 случаев).

Заболевание зарегистрировано преимуществен-

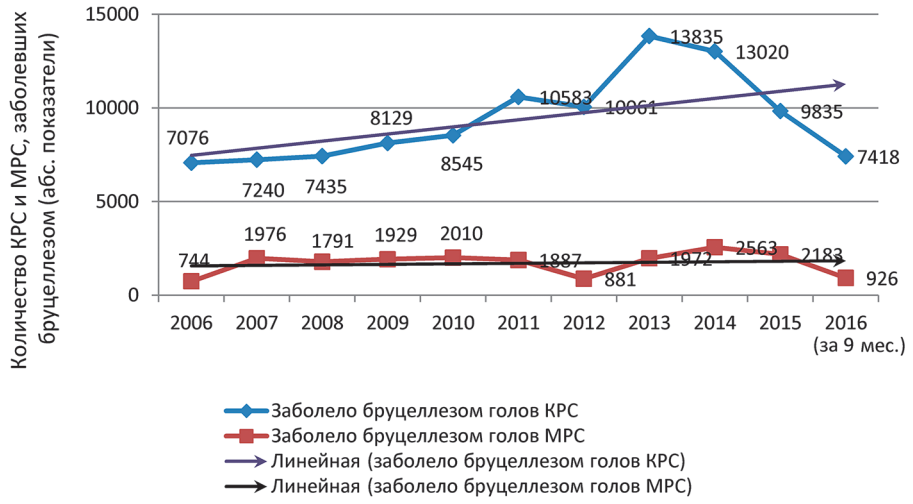


Рис. 2. Динамика заболеваемости бруцеллезом КРС и МРС в Российской Федерации в 2006–2015 гг., 9 мес. 2016 г.

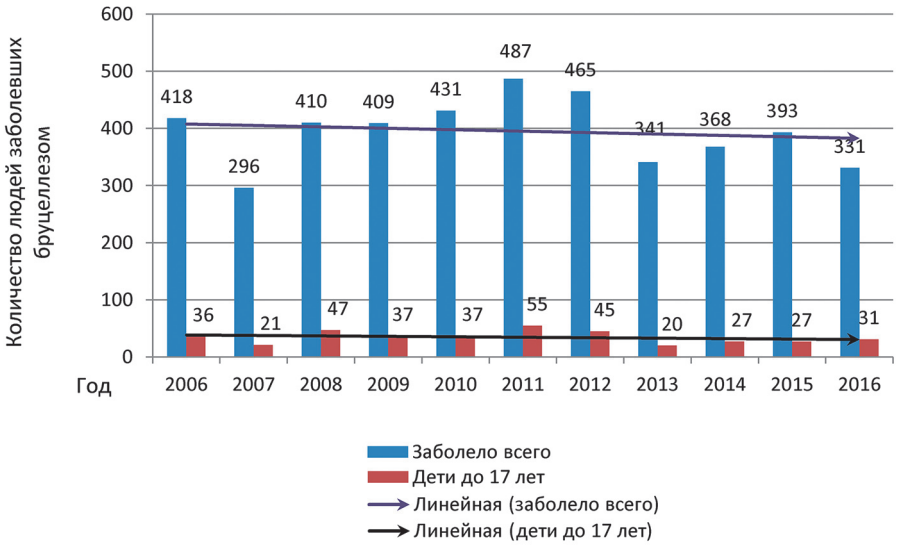


Рис. 3. Динамика количества заболевших бруцеллезом людей в Российской Федерации в 2006–2016 гг. (абсолютные цифры)

но у жителей сельской местности (74,3 %, 246 случаев, ИП – 0,65), что отражает эпизоотологическое неблагополучие по бруцеллезу сельскохозяйственных животных эпидемически значимых видов (КРС и МРС).

Основное количество (81,9 %, 271 случай) заболевших бруцеллезом людей зарегистрировано в двух федеральных округах – СКФО и ЮФО.

В СКФО выявлено 217 случаев бруцеллеза (ИП – 2,24), что составляет 65,6 % от общероссийской заболеваемости. В округе зарегистрировано 24 случая бруцеллеза у детей до 17 лет (ИП – 0,92), что составляет 77,4 % всех случаев в Российской Федерации. В сравнении с данными за 2015 г. (267 случаев, ИП – 2,77) за отчетный период отмечается снижение уровня заболеваемости бруцеллезом в округе на 18,7 %. Среди заболевших в СКФО 77,9 % (169 случаев, ИП – 3,43) – жители сельской местности.

В Республике Дагестан выявлено 110 случаев (33,2 % от общероссийской заболеваемости) заболевания людей бруцеллезом (ИП – 3,66), что на 21,4 % ниже показателей 2015 г. (140 случаев, ИП – 4,7). В 83,6 % случаев бруцеллез регистрировали среди жителей сельской местности (92 случая, ИП – 5,58). В Республике зарегистрировано 9 случаев (ИП – 1,02) заболевания бруцеллезом лиц до 17 лет, что составляет 29,0 % от общероссийских показателей заболеваемости среди детей. Заболевших людей регистрировали в течение всего календарного года, при этом наибольшее количество выявлено в феврале и апреле – по 13 случаев, в августе и октябре – по 12. По данным эпидемиологического расследования, в 46,4 % случаев источником инфекции был больной бруцеллезом КРС, в 40,9 – МРС, в 12,7 – источник инфекции не установлен. В 53,6 % случаев факторами передачи инфекции выступали продукты животного происхождения (молоко, кисломолочные продукты, мясо, мясные продукты), в 34,5 – больные бруцеллезом животные, в 11,8 – сырье от животных. Преобладал алиментарный путь передачи возбудителя бруцеллеза (53,6 %). Наиболее неблагополучные по бруцеллезу людей административные территории Республики – Махачкала (14 случаев), Бабаюртовский (11), Левашинский (7), Ногайский (7) и Тарумовский (7) районы.

За отчетный период в Ставропольском крае (СК) выявлен 101 случай (30,5 % от общероссийской заболеваемости) заболевания людей бруцеллезом (ИП – 3,61), что на 14,4 % ниже по сравнению с 2015 г. (118 случаев, ИП – 4,22). Среди заболевших 71,3 % (72 случая, ИП – 6,15) – сельское население. Зарегистрировано 14 случаев (ИП – 2,47) заболевания бруцеллезом детей до 17 лет (45,2 % от общероссийской заболеваемости бруцеллезом среди детей), в том числе 13 – в очаге бруцеллеза с групповой заболеваемостью (15 человек) в Ессентуках в июне–августе, где источником инфекции было больное бруцеллезом поголовье коз с частного подворья. При инфицировании людей возбудителем бруцеллеза в очаге инфекции имел место единый фактор передачи – термически необработанное козье молоко, механизм передачи возбудителя – фекально-оральный, путь – пищевой.

В СК больных бруцеллезом людей выявляли в течение всего года с максимумом в июле–сентябре – 54,5 % (55 случаев). По данным эпидемиологического расследования случаев заболевания людей бруцеллезом в СК установлено, что источником инфекции в равной степени был КРС и МРС, больной бруцеллезом. Из установленных факторов передачи инфекции в 58,4 % являлись продукты животноводства (молоко, кисломолочные продукты, мясо, мясные продукты), в 21,7 % – больной бруцеллезом скот. Наибольшая заболеваемость людей бруцеллезом зарегистрирована в Левокумском (16 случаев), Нефтекумском (10), Андроповском (8) районах края, имеющих общую административную границу с субъектами СКФО, неблагополучными по бруцеллезу эпидемически значимых видов сельскохозяйственных животных (Республика Дагестан, Республика Калмыкия и Карачаево-Черкесская Республика), а также в Ессентуках (15 случаев), где зарегистриро-

вана вспышка бруцеллеза козье-овечьего вида.

В остальных субъектах СКФО выявлены единичные случаи заболевания людей бруцеллезом: в Кабардино-Балкарской Республике – 2 случая (ИП – 0,23), Республике Северная Осетия-Алания – 2 (ИП – 0,28), Республике Ингушетия – 1 (ИП – 0,21), в Чеченской Республике – 1 (ИП – 0,07).

На территории ЮФО зарегистрировано 54 случая (ИП – 0,33) заболевания людей бруцеллезом (16,3 % от общероссийских показателей), в том числе два случая у детей до 17 лет (ИП – 0,06). Заболевшие бруцеллезом, в основном, являлись жителями сельской местности (45 случаев, 83,3 %). В сравнении с показателями за 2015 г. (33 случая, ИП – 0,24) наблюдается увеличение количества вновь выявленного бруцеллеза у людей на 63,6 %, в том числе среди жителей сельских поселений на 64,4 %.

В Республике Калмыкия, как и в предыдущие годы, зарегистрирован самый высокий в Российской Федерации показатель заболеваемости бруцеллезом на 100 тыс. населения – 12,52, выявлено 35 случаев впервые выявленного бруцеллеза (10,6 % от общероссийской заболеваемости), в том числе 33 (94,2 %) у жителей сельской местности (ИП – 21,51). Зарегистрировано 2 случая заболевания бруцеллезом детей до 17 лет (ИП – 3,0). Людей, заболевших бруцеллезом, выявляли преимущественно с января по сентябрь, наибольшая заболеваемость зарегистрирована в июле (9 случаев, 25,7 %). Основной источник бруцеллезной инфекции – больной бруцеллезом скот (КРС), механизм инфицирования – контактный. Бруцеллез в республике преимущественно регистрировался в Целинном (8 случаев), Черноземельском (6) и Лаганском (6) районах.

В Волгоградской области выявлено 14 случаев (4,2 % от общероссийских показателей) заболевания людей бруцеллезом (ИП – 0,55), из которых 8 (ИП – 1,34) – среди сельского населения. В Краснодарском крае и Астраханской области зарегистрировано по 2 случая заболевания бруцеллезом (ИП – 0,04 и 0,20 соответственно), в Ростовской области – 1 (ИП – 0,02).

В ПФО отмечено существенное увеличение заболеваемости людей бруцеллезом. Всего зарегистрировано 22 случая (ИП – 0,07), что в 2,4 раза больше показателей 2015 г. (9 случаев, ИП – 0,03).

Основное количество заболевших бруцеллезом в округе пришлось на Самарскую область – 15 больных (ИП – 0,47), где в неблагополучном по бруцеллезу КРС хозяйстве Кинельского района зарегистрировано два случая группового заболевания людей бруцеллезом в мае и ноябре с общим количеством заболевших 12 человек. Ухудшение эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в области связано с неблагополучием по бруцеллезу среди КРС, ослаблением контроля над проведением противоэпизоотических мероприятий в очаге инфекции и несвоевременной изоляцией больного поголовья. В Саратовской области выявлено 4 случая (ИП – 0,16), Оренбургской – 2 (ИП – 0,1), Республике Татарстан – 1 (ИП – 0,03). В остальных субъектах округа бруцеллез у людей не зарегистрирован. Основной источник инфекции – КРС. Механизмами передачи инфекции являются контактный и фекально-оральный, путь передачи – прямой контакт и пищевой.

В СФО установлено 15 случаев заболевания людей бруцеллезом (ИП – 0,08): 5 – в Забайкальском крае (ИП – 0,46), в том числе один ребенок (ИП – 0,38); по 3 – в Республике Тыва (ИП – 0,95) и Омской области (ИП – 0,15); 2 – в Кемеровской области; по 1 случаю – в Алтайском крае (ИП – 0,04) и Новосибирской области (ИП – 0,04).

В Центральном федеральном округе зарегистрировано 13 случаев впервые выявленного бруцеллеза (ИП – 0,03), из которых во Владимирской области – 5 (ИП – 0,36), Московской – 3 (ИП – 0,04), Тамбовской (ИП – 0,19) и Москве (ИП – 0,02) – по 2, в Калужской области – 1 (ИП – 0,10).

В Северо-Западном федеральном округе выявлено 7 случаев (ИП – 0,05) заболевания людей бруцеллезом. В августе–сентябре в пос. Шум Кировского района Ленинградской области зарегистрирован очаг бруцеллеза МРС с групповой заболеваемостью людей бруцеллезом (7 случаев). В результате эпизоотии заболело бруцеллезом трое жителей Ленинградской области (ИП – 0,17) и 4 человека из Санкт-Петербурга (ИП – 0,08), употреблявших в пищу продукцию от больного бруцеллезом поголовья.

В Уральском федеральном округе впервые выявленный бруцеллез зарегистрирован у 2 человек (ИП – 0,02). Все случаи выявлены в Челябинской области (ИП – 0,06). В Дальневосточном федеральном округе установлен один случай заболевания людей бруцеллезом (ИП – 0,02) – в Амурской области (ИП – 0,12). В Крымском федеральном округе бруцеллез не регистрировался.

Специфическая иммунопрофилактика бруцеллеза у людей остается в достаточной мере эффективной индивидуальной мерой защиты при опасности заражения людей возбудителем *Brucella melitensis*. Порядок проведения профилактической иммунизации людей против бруцеллеза регламентирован Национальным календарем прививок по эпидемическим показаниям и СП 3.1.7.2613-10 «Профилактика бруцеллеза».

В 2016 г. в РФ вакцинировано против бруцеллеза 2392 человека, ревакцинировано – 1856. В сравнении с аналогичными показателями за 2015 г. (вакцинировано 2449 человек, ревакцинировано – 1653) отмечается незначительное увеличение объема профилактической иммунизации.

За период с 2011 по 2016 год привито против бруцеллеза 22871 человек, в том числе 10689 ревакцинировано. Анализ динамики объемов вакцинации за последние два года указывает на тенденцию к увеличению объемов специфической профилактики бруцеллезной инфекции у людей.

С целью стабилизации и снижения напряженности эпизоотолого-эпидемиологической обстановки

по бруцеллезу в некоторых субъектах Российской Федерации в 2016 г. проводилась работа по реализации целевых программ и комплексных планов по профилактике бруцеллеза: «Комплексный план мероприятий по профилактике бруцеллеза на территории Ставропольского края на 2015–2019 годы», «Комплексный план мероприятий по профилактике бруцеллеза в Кабардино-Балкарской Республике на 2012–2016 годы», «Комплексный план мероприятий по профилактике бруцеллеза на территории Забайкальского края на 2013–2016 годы».

Таким образом, эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации в 2016 г. характеризуется как неустойчивая. Наблюдается снижение количества впервые выявленного бруцеллеза у людей (на 15,8 %) на фоне возрастающих трендов по неблагополучию и ухудшению эпизоотологической ситуации по бруцеллезу КРС в регионах с развитым животноводством. Зарегистрированы случаи группового заболевания людей в трех субъектах (Ставропольском крае, Самарской и Ленинградкой областях), имеющие вспышечный характер, которые объективно отражают (индикатор неблагополучия) напряженность эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в регионах и стране в целом.

Необходимо отметить положительную тенденцию к снижению заболеваемости людей бруцеллезом в Республике Дагестан за последние три года, что может отражать эффективность мер, принятых в рамках реализации «Программы мероприятий по профилактике бруцеллеза на территории Республики Дагестан на 2011–2015 годы».

Эпидемиологический прогноз по бруцеллезу в России на 2017 г. определяется рядом факторов, ключевым из которых является эпизоотологическая ситуация по бруцеллезу. По данным специалистов Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, к наиболее тревожному факту в условиях формирующейся в настоящее время неблагополучной эпизоотологической обстановки по хроническим инфекциям сельскохозяйственных животных в Российской Федерации относится ухудшение ситуации по бруцеллезу. Прогноз эпизоотологической ситуации по бруцеллезу в России в среднесрочной перспективе неблагоприятный, что при сохранении существующей тенденции создает реальный риск широкого распространения бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных в субъектах Центрального и Приволжского федеральных округов.

В условиях продолжения реализации региональных программ импортозамещения в животноводческой отрасли сельского хозяйства, усиления интереса к развитию племенного животноводства (КРС, овцеводство и козоводство) среди индивидуальных предпринимателей сохраняется высокая вероятность заноса возбудителя бруцеллеза с больными животными из неблагополучных административных территорий СКФО, ЮФО, СФО в благополучные по бруцеллезу регионы. Продолжает оставаться высокой вероятность заражения населения возбудителем бруцеллеза в регионах, где постоянно регистрируются случаи несанкционированной торговли продукцией животноводства без ветеринарно-сопроводительных документов.

Сохраняют актуальность внешние эпидемиологические риски, связанные с активизацией сотрудничества в области импорта животных и животноводческой продукции из республик Казахстан, Киргизия, Армения в рамках Евразийского экономического сотрудничества (таможенный союз), Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу КРС и МРС.

С учетом вышеизложенных факторов в 2017 г. в стране сохранится нестабильная ситуация по бруцеллезу, прогнозируемый уровень заболеваемости людей может находиться в диапазоне 340–370 случаев.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2016 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (официальный сайт). URL: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=7804. Дата обращения 08.02.17.

2. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах-участниках Содружества Независимых Государств. *Инф. бол.: новости, мнения, обучение.* 2016; 1:68–74.

3. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.В., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2: 11–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-11-13.

4. Эпизоотическая ситуация в РФ. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (официальный сайт). URL: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2016/report_3_quater.pdf. Дата обращения 27.02.17.

References

1. [Infectious morbidity in the Russian Federation in January-December 2016. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare] (cited 08 Feb 2017). Available from: http://rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statictic_details.php?ELEMENT_ID=7804.

2. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Vilinskaya S.V., Zaitsev A.A., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation and in the Commonwealth of Independent States]. *Infek. Bol.: Novosti, Mneniya, Obuch.* 2016; 1:68–74.

3. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Rusanova D.V., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. [Review of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2015 and prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:11–3.

4. [Epizootic situation in the Russian Federation. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance] (cited 27 Feb 2017) Available from: http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2016/report_3_quater.pdf.

Authors:

Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 13.03.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:28–31. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-28-31**

УДК 616.98:579.841.95(571.1/5)

В.П.Стариков[1], Н.П.Винарская[2], А.В.Бородин[1], К.А.Берников[1]

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ПРИРОДНОГО ОЧАГА ТУЛЯРЕМИИ В СЛИЯНИИ РЕК ОБИ И ИРТЫША

[1]БУ ВО «Сургутский государственный университет», Сургут; [2]ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций», Омск, Российская Федерация

Цель. Проведение комплекса исследований для выявления путей циркуляции возбудителя туляремии, установление основных носителей и переносчиков этой инфекции. **Материалы и методы.** Для отлова мелких млекопитающих использовали методы ловчих канавок, ловчих заборчиков из полиэтиленовой пленки и ловушко-линий. Для бактериологической оценки на туляремию у животных брали селезенку. Проведен также анализ проб воды. **Выводы и результаты.** В 2015 г. проведен комплекс зоолого-паразитологических и бактериологических исследований для выявления путей циркуляции возбудителя туляремии в природном очаге пойменно-речного типа на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в слиянии рек Оби и Иртыша. Общий объем исследованного материала составил 542 особи мелких млекопитающих 16 видов и 447 особей земноводных четырех видов. Установлено, что по сравнению с 2013 г. в пойменных биотопах произошла перестройка зооценоза. Из состава сообщества мелких млекопитающих выбыл основной носитель и массовый источник туляремийной инфекции – водяная полевка. Изменился и состав эктопаразитов, отсутствовали специфические эктопаразиты водяной полевки. В 2015 г. в слиянии рек Оби и Иртыша наблюдалась вялотекущая эпизоотия среди мелких млекопитающих. Необходимые предпосылки для протекания острой туляремийной эпизоотии отсутствовали.

Ключевые слова: Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, природный очаг туляремии, мониторинг носителей и переносчиков инфекции.

Корреспондирующий автор: Стариков Владимир Павлович, e-mail: vp_starikov@mail.ru.

V.P.Starikov[1], N.P.Vinarskaya[2], A.V.Borodin[1], K.A.Bernikov[1]

Comprehensive Evaluation of the Natural Tularemia Focus in the Confluence of Irtysh and Ob Rivers

[1]Surgut State University, Surgut, Russian Federation; [2]Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections, Omsk, Russian Federation

Objective of the study is to conduct the complex investigations aimed at identification of circulation pathways of tularemia agent, as well as to define the main carriers and vectors of the disease. **Materials and methods**. Trap trench method, trap fences and trap-lines were used to catch small mammals for examination. Bacteriological testing on tularemia infection in animals was carried out using spleen samples. In addition, water samples were studied. **Results and conclusions.** In 2015, performed were complex zoological-parasitological and bacteriological studies aimed at identification of circulation pathways of tularemia agent in the natural focus of floodplain-river type in the Khanty-Mansiysk Autonomous District – Yugra, in the confluence of Irtysh and Ob rivers. The total volume of the material tested was 542 specimens of small mammals of 16 species and 447 specimens of amphibians belonging to 4 species. It was established that, compared to 2013, zoocoenosis restructuring in the floodplain habitats occurred. The main carrier and a massive source of tularemia infection – the water vole – was excluded from the small mammals' community. Also, ectoparasites composition changed; no specific ectoparasites of the water vole were to be found. In 2015, in the confluence of Irtysh and Ob rivers, lukewarm epizooty among the small mammals was observed. Essential for the occurrence of acute tularemia epizooty prerequisites were absent.

Key words: Khanty-Mansiysk Autonomous District – Yugra, natural tularemia focus, monitoring over carriers and vectors of infection.

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

Funding: The study was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research (No 15-44-00012) and the Government of the Khanty-Mansiysk Autonomous District – Yugra (Decree No 751, dated June 01, 2015).

Corresponding author: Vladimir P. Starikov, e-mail: e-mail: vp_starikov@mail.ru.

Citation: Starikov V.P., Vinarskaya N.P., Borodin A.V., Bernikov K.A. Comprehensive Evaluation of the Natural Tularemia Focus in the Confluence of Irtysh and Ob Rivers. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:28–31. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-28-31

Территория Ханты-Мансийского автономного округа – Югры (ХМАО – Югра) расположена в лесной зоне Западной Сибири в природном очаге туляремии пойменно-речного типа [2]. Основным резервуаром и массовым источником инфекции в условиях Западной Сибири считается водяная полевка *Arvicola amphibius* L., 1758 [6]. В июле–октябре 2013 г. в ХМАО – Югре зарегистрирована эпидемическая вспышка туляремии, охватившая 1005 человек. Эпицентром вспышки стал город Ханты-Мансийск, где выявлено 955 больных [5]. В настоящее время механизм заражения чаще всего трансмиссивный – переносчиками служат в основном кровососущие двукрылые насекомые.

Нами поставлена цель – произвести комплекс исследований для выявления путей циркуляции возбудителя туляремии *Francisella tularensis,* установить основных носителей и переносчиков этой инфекции

как позвоночных, так и беспозвоночных животных, тесно взаимосвязанных друг с другом.

Материалы и методы

Целенаправленное изучение мелких млекопитающих и земноводных в качестве потенциальных носителей туляремийной инфекции проведено в Ханты-Мансийском районе (окрестности деревни Шапша, 22 и 37 км западнее Ханты-Мансийска) и Ханты-Мансийске в мае–сентябре 2015 г. Обследованы местообитания пойм Нижнего Иртыша, Средней Оби и прилегающие к ним участки.

Для отлова мелких млекопитающих использовали методы: ловчих канавок, ловчих заборчиков из полиэтиленовой пленки и ловушко-линий. Объем исследуемого материала составил 542 особи мелких млекопитающих 16 видов (обыкновенная кутора *Neomys fodiens* Pennant, 1771; обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L., 1758; средняя бурозубка *S. caecutiens* Laxmann, 1785; равнозубая бурозубка *S. isodon* Turov, 1924; малая бурозубка *S. minutus* L., 1766; азиатский бурундук *Tamias sibiricus* Laxmann, 1769; лесная мышовка *Sicista betulina* Pallas, 1779; ондатра *Ondatra zibethicus* L., 1766; красносерая полевка *Craseomys rufocanus* Sundevall, 1846; красная полевка *Myodes rutilus* Pallas, 1779; полевка-экономка *Alexandromys oeconomus* Pallas, 1776; темная полевка *Microtus agrestis* L., 1761; мышь-малютка *Micromys minutus* Pallas, 1771; домовая мышь *Mus musculus* L., 1758; ласка *Mustela nivalis* L., 1766; горностай *M. erminea* L., 1758). Учет земноводных проводили с помощью ловчих канавок (заборчиков). Всего учтено 447 особей амфибий четырех видов (сибирский углозуб *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870; обыкновенная жаба *Bufo bufo* L., 1758; сибирская лягушка *Rana amurensis* Boulenger, 1886; остромордая лягушка *R. arvalis* Nilsson, 1842). С мелких млекопитающих очесано более 2000 эктопаразитов (иксодовые и гамазовые клещи, блохи и вши). Часть паразитических членистоногих находится на определении (до вида). Блохи и вши – второстепенные переносчики туляремийной инфекции. Когда результаты по видовой диагностике будут получены, это позволит сделать более детальный зоолого-паразитологический анализ. Для бактериологической оценки на туляремию у животных (мелкие млекопитающие, земноводные) брали селезенку. Проведен также анализ проб воды. Эта работа выполнена сотрудниками лаборатории микробиологии туляремии (зав. лабораторией доктор биологических наук В.М.Павлов) Государственного научного Центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск). Всем коллегам за оказанную помощь мы выражаем глубокую признательность.

Результаты и обсуждение

Зоологическая характеристика очага. Прежде чем анализировать полученные материалы 2015 г. следует обратиться к сборам мелких млекопитающих в окрестностях д. Шапша Ханты-Мансийского района (наиболее полные учеты в годы исследования) 2013 г. [7]. В 2013 г. нами показано широкое присутствие и достаточно высокая численность водяной полевки (по результатам учетов она входила в состав доминирующих видов) практически во всех околоводных биотопах в окрестностях Ханты-Мансийска. В осенних учетах 2014 г. в пойменных биотопах (памятник природы «Луговские мамонты», 37 км западнее Ханты-Мансийска) она встречалась единично. В 2015 г. в бесснежный период (май–сентябрь) в окрестностях Ханты-Мансийска водяная полевка в наших сборах и учетах сотрудников Центра гигиены и эпидемиологии в ХМАО – Югре не регистрировалась (табл. 1).

Эти материалы свидетельствуют о глубокой депрессии численности водяной полевки и практически полном ее отсутствии на изученной территории. Основу сообщества пойменного комплекса мелких млекопитающих составили четыре фоновых вида: полевка-экономка, красная полевка, обыкновенная и малая бурозубки. На долю этих видов приходилось около 80 % обилия всех учтенных млекопитающих.

Паразитологические особенности очага. На территории туляремийного очага в слиянии рек Оби и Иртыша зарегистрировано 24 вида гамазовых клещей, из которых 12 – свободноживущие, связанные

Таблица 1

Динамика видового состава и обилия (особей на 100 конусо/суток) мелких млекопитающих в 2015 г. в окрестностях деревни Шапша Ханты-Мансийского района

Период исследования	Вид														
	S. araneus	*S. minutus*	*S. caecutiens*	*S. isodon*	*N. fodiens*	*T. sibiricus*	*S. betulina*	*M. rutilus*	*C. rufocanus*	*A. oeconomus*	*M. agrestis*	*O. zibethicus*	*M. minutus*	*M. erminea*	*Всего*
Май								0,6		0,7					1,3
Июнь–июль	4,2	0,9	0,9			0,5	0,9	0,9		6,7	0,1				15,1
Сентябрь	4,2	2,0	0,7	0,7	0,2			4,5	2,0	2,7	0,5	0,2	0,2	0,2	18,1
В среднем по стационару	**2,8**	**1,0**	0,5	0,2	0,07	0,2	0,3	**2,0**	0,7	**3,4**	0,2	0,07	0,07	0,07	11,5

Таблица 2

Паразитические гамазовые клещи окрестностей Ханты-Мансийска

Виды	2013 г.		2015 г.		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Eulaelaps stabularis C.l. Koch, 1836	5	1,6	21	9,4	26	4,1
Laelaps muris Ljungh, 1799	254	79,1	-	-	254	46,7
Laelaps clethrionomydis Lange, 1955	-	-	3	1,4	3	0,6
Laelaps hilaris C.l. Koch, 1836	-	-	132	59,5	132	24,3
Hyperlaelaps arvalis Zachvatkin, 1948	-	-	12	5,4	12	2,2
Hyperlaelaps amphibius Zachvatkin, 1948	34	10,6	-	-	34	6,3
Haemagamasus nidiformes Bregetova, 1955	1	0,3	2	0,9	3	0,6
Haemagamasus nidi Michael, 1892	-	-	1	0,5	1	0,2
Haemagamasus ambulans Thorell, 1872	8	2,5	33	14,8	41	7,5
Hirstionyssus isabellinus Oudmemans, 1913	17	5,3	11	4,9	28	5,2
Hirstionyssus eusoricus Bregetova, 1956	1	0,3	7	3,2	8	1,5
Myonyssus ingricus Bregetova, 1956	1	0,3	-	-	1	0,2
Всего	**321**	100	**222**	100	**543**	100

со зверьками в основном топически или форически. Большее значение имеют паразитические гамазовые клещи (табл. 2).

В 2013 г. основу паразитокомплекса составляли узкоспецифические паразиты водяной полевки *Laelaps muris* и *Hyperlaelaps amphibius*. Индекс обилия гамазовых клещей (основу составляли узкоспецифические виды) для водяной полевки был очень высок – 41,6. Более ранними исследованиями установлено, что *L. muris* может передавать возбудителя туляремии *Francisella tularensis* не только внутри популяций водяных полевок, но и другим видам [1]. В 2015 г. на протяжении всего бесснежного периода водяная полевка в учетах не встречалась. На других мелких млекопитающих указанные гамазовые клещи не регистрировались. В 2015 г. на численно преобладающих видах мелких млекопитающих – обыкновенной бурозубке и красной полевке (в учетах с использованием конусов) – зарегистрировано по четыре вида паразитических гамазовых клещей; на полевке-экономке – в два раза больше; почти 73 % от всех учтенных гамазид приходилось на долю *L. hilaris* (приурочен к серым полевкам). В учетах давилками на полевке-экономке отмечено пять видов паразитических гамазовых клещей, также доминировал *L. hilaris* (80 %). В целом среди обнаруженных гамазовых клещей многие виды (*Laelaps muris*, *L. hilaris*, *Hyperlaelaps amphibius*, *Eulaelaps stabularis*, *Haemagamasus ambulans*, *Hirstionyssus eusoricus* и др.) являются доказанными резервуарами и переносчиками туляремийной инфекции.

На севере Западной Сибири (в том числе в районе наших работ) можно встретить до трех видов иксодовых клещей: *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794, *Ixodes apronophorus* Schulze, 1924 и *I. persulcatus* Schulze, 1930 [8]. В 2013 и 2015 гг. с мелких млекопитающих нами собрано 145 экз. *I. persulcatus*. В 2013 г. паразитирование иксодовых клещей отмечено на четырех видах – красной и водяной полевках, полевке-экономке и обыкновенной бурозубке. Индексы встречаемости и обилия низкие, варьировали от 2,1 до 14,3 % и от 0,02 до 0,2 соответственно. В 2015 г. *I. persulcatus* зарегистрирован на шести видах мелких млекопитающих. Наиболее высокие показатели встречаемости и обилия отмечены для красной полевки и азиатского бурундука (41,7 % и 1,0; 66,7 % и 6,7). Подавляющая часть иксодовых клещей паразитировала на мелких млекопитающих в биотопах надпойменной террасы. Роль *I. persulcatus* в эпизоотии туляремии доказана. Он может хранить в своем организме и передавать при укусе здоровым животным и человеку возбудителя туляремии.

Бактериологический анализ. На наличие ДНК возбудителя туляремии было исследовано 10 образцов воды и 573 селезенки. В воде возбудитель туляремии не обнаружен. Из всех образцов (мелкие млекопитающие и земноводные) ДНК возбудителя туляремии установлены лишь в селезенках трех особей красных полевок (*Myodes rutilus*). У всех животных селезенки не содержали живых бактерий туляремийного микроба, т.е. количество бактерий *Francisella tularensis* в проверенных образцах не превышало 100 живых микробных клеток. Полевки, у которых выявлен возбудитель туляремии, отловлены в окрестностях д. Шапша Ханты-Мансийского района. Все животные учтены в елово-пихтовом кустарничково-зеленомошном лесу (надпойменная терраса). Эти полевки возраста adultus (все самцы) пойманы в мае и июне. В общей сложности с них очесано 27 блох, 7 гамазовых и 4 иксодовых клеща. Мы не исключаем контакта этих животных (красных полевок) с амфибионтными обитателями (водяная полевка и др.) в предыдущие неблагоприятные по туляремии годы (2013 и 2014 гг.).

Итак, в 2015 г. в слиянии рек Оби и Иртыша (контроль – наши исследования в 2013 г.) произошла перестройка зооценоза (мелкие млекопитающие) в

пойменных биотопах. Из состава сообщества выбыл основной носитель и массовый источник туляремийной инфекции в Западной Сибири – водяная полевка. Ядро сообщества пойменного комплекса мелких млекопитающих, при низкой их численности, составили четыре фоновых вида: полевка-экономка, красная полевка, обыкновенная и малая бурозубки. В результате бактериологического анализа проб воды и селезенок гидробионтов (земноводные) в 2015 г. в слиянии рек Оби и Иртыша возбудитель туляремии не обнаружен. 2015 г. для этой территории характеризовался глубокой депрессией численности водяной полевки. В пойменных и граничащих с поймой биотопах в слиянии рек Оби и Иртыша в 2015 г. наблюдалась вялотекущая эпизоотия туляремии среди мелких млекопитающих, которая реально не могла привести к эпидемии. Из всех обследованных мелких позвоночных животных ДНК возбудителя туляремии установлена лишь в селезенках трех особей красной полевки. Это составило 0,5 % выделенных культур от числа всех биопроб. Для этих полевок установлен высокий индекс обилия паразитических членистоногих. Несомненно, что у них наблюдался контакт с амфибионтными обитателями поймы в предыдущие неблагоприятные по туляремии годы. Наши исследования подтвердили, что основным источником возбудителя туляремии в пойменно-речном типе очага в слиянии рек Оби и Иртыша в ХМАО – Югре является водяная полевка. При расширении эпизоотии вовлекаются ряд амфибионтных видов – полевка-экономка, ондатра, а также лесные полевки, землеройки, другие мелкие млекопитающие и их эктопаразиты (иксодовые клещи, гамазовые клещи, блохи, вши, комары, слепни и др.). Этими факторами можно объяснить протекание бурных эпизоотий в условиях пойменных биотопов в слиянии рек Оби и Иртыша. В 2015 г. для этой территории отсутствовали необходимые предпосылки для протекания острой туляремийной эпизоотии. Временным репером в поймах Средней Оби и Нижнего Иртыша для биологического прогнозирования численности водяной полевки служат годы высоких разливов [4]. Таковым в Югре был 2015 г. С интервалом 1–3 года после особенно высокого разлива создаются оптимальные условия для восстановления численности этого грызуна и роста ее до состояния пика. В лесной зоне Западной Сибири в предыдущие годы интервалы между началом вспышек туляремии в нижнем течении Иртыша равнялись 6–8 годам, в среднем течении Оби – 9–10 [3]. Каждая вспышка продолжалась 2–4 года. Однако в связи с разбалансировкой природных биоценозов не исключено, что в настоящее время эти сроки могут быть смещены.

Таким образом, особое внимание следует обращать на динамику популяций водяной полевки. Это позволит вовремя оценить ситуацию и предотвратить возможную эпидемию туляремии в округе.

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ (№ 15-44-00012) и Правительством ХМАО – Югры (приказ № 751 от 01.06.2015 г.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давыдова М.С. Гамазовые клещи водяных крыс в лесостепной зоне Западной Сибири В кн.: Фауна, систематика и экология насекомых и клещей. Новосибирск: Наука; 1963. С. 109–22.

2. Максимов А.А. Основные типы туляремийных очагов, их характеристика и географическое распространение в РСФСР. *Доклады АН СССР*. 1947; 5(57):501–3.

3. Максимов А.А. К методике прогнозов массовых размножений водяной крысы в Западной Сибири. *Известия СО АН СССР.* 1958; 6:137–42.

4. Максимов А.А. Структура и динамика биоценозов речных долин. Новосибирск: Наука; 1974. 260 с.

5. Остапенко Н.А., Соловьева М.Г., Казачихин А.А., Козлова И.И., Файзуллина Н.М., Ежлова Е.Б. О вспышке туляремии среди населения Ханты-Мансийска и Ханты-Мансийского района в 2013 г. *Пробл. особо опасных инф*. 2015; 2:28–32.

6. Пантелеев П.А., редактор. Водяная полевка: образ вида. М.: Наука; 2001. 527 с.

7. Стариков В.П., Берников К.А., Старикова Т.М., Бородин А.В., Морозкина А.В. Мелкие млекопитающие природного парка «Самаровский чугас». *Мир науки, культуры, образования*. 2014; 4(47):413–7.

8. Якименко В.В., Малькова М.Г., Шпынов С.Н. Иксодовые клещи Западной Сибири: фауна, экология, основные методы исследования. Омск: ООО ИЦ «Омский научный вестник»; 2013. 240 с.

References

1. Davydova M.S. [Gamaside ticks of the water vole in the forest-steppe zone of West Siberia]. In: [Fauna, Taxonomy, and Ecology of Insects ant Ticks]. Novosibirsk: “Nauka”; 1963. P. 109–22.

2. Maksimov A.A. [Major types of tularemia foci, their characteristics and geographical distribution in the Russian Soviet Federative Socialistic Republics]. *Reports of USSR Academy of Sciences*. 1947; 5(57):501–3.

3. Maksimov A.A. [Forecasting approach for mass reproduction of the water vole in West Siberia]. *Bulletin of the Siberian Branch of USSR Academy of Sciences.* 1958; 6:137–42.

4. Maksimov A.A. [Structure and Dynamics of Biocenoses in River Valleys]. Novosibirsk: “Nauka”; 1974. 260 p.

5. Ostapenko N.A., Solov’eva M.G., Kazachikhin A.A., Kozlova I.I., Faizullina N.M., Ezhlova E.B. [Tularemia outbreak among the population of Khanty-Mansiisk and the Khanty-Mansiisk Region, occurred in 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek*. 2015; 2:28–32.

6. Panteleev P.A., editor. [The Water Vole: Species Image]. M.: “Nauka”; 2001. 527 p.

7. Starikov V.P., Bernikov K.A., Starikova T.M., Borodin A.V., Morozkina A.V. [Small mammals of the natural park “Samarovsky Chugas”]. *Mir Nauki, Kul’tury. Obraz.* 2014; 4(47):413–7.

8. Yakimenko V.V., Mal’kova M.G., Shpynov S.N. [Ixodidae Ticks of West Siberia: Fauna, Ecology, Basic Methods of Investigation]. Omck: “Omsk Research Bulletin” Ltd.; 2013. 240 p.

Authors:

Starikov V.P., Borodin A.V., Bernikov K.A. Surgut State University. 22, Ehnergetikov St., Surgut, 628408, Russian Federation. E-mail: vp_starikov@mail.ru.

Vinarskaya N.P. Omsk Research Institute of Natural-Focal Infections. 7, Mira Prospekt, Omsk, 644080, Russian Federation.

Об авторах:

Стариков В.П., Бородин А.В., Берников К.А. Сургутский государственный университет. Российская Федерация, 628408, Сургут, ул. Энергетиков, д. 22. E-mail: vp_starikov@mail.ru.

Винарская Н.П. Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций. Российская Федерация, 644080, Омск, Мира проспект, д. 7.

Поступила 30.03.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:32–35. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-32-35**

УДК 616.98:579.842.23

К.А.Никифоров, Д.В.Уткин, Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК-ЧИПА ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И БИОВАРОВ ОСНОВНОГО ПОДВИДА *YERSINIA PESTIS*

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

Цель исследования: разработка ДНК-чипа для дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида. **Материалы и методы.** Анализ эффективности разработанного способа проведен на 62 штаммах *Y. pestis* разных подвидов и биоваров, выделенных в природных очагах России, ближнем и дальнем зарубежье. **Результаты и выводы.** Выбраны ДНК-мишени, рассчитаны праймеры и зонды, оптимизирована методика подвидовой и биоварной дифференциации штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа. Использование ДНК-чипа с мишенями «Med24», «glpD(-93)» и «45» позволяет проводить быструю дифференциацию штаммов основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида по наличию и отсутствию сигнала флуоресценции по специфическим для основного подвида и его биоваров ДНК-мишеням.

Ключевые слова: ДНК-чип, ДНК-мишень, биовар, *Y. pestis.*

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

K.A.Nikiforov, D.V.Utkin, L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko

Construction of a DNA-Microarray for Differentiation between the Main and Non-Main Subspecies and Biovars of the Main Subspecies of *Yersinia pestis*

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

Objective of the study is to design the DNA-microarray for differentiation of *Y. pestis* strains of the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies. **Materials and methods**. Efficiency analysis for the devised means was conducted using 62 *Y. pestis* strains of various subspecies and biovars, isolated in the natural foci of Russia and neighboring countries. **Results and conclusions**. Selected have been the DNA-targets, probes and primers – calculated. Enhanced is the method of sub-specific and biovar differentiation of *Y. pestis* strains by means of DNA-microarray. DNA-chip with "Med24", "glpD(-93)", and "45" targets allows for prompt differentiation of the strains of the main and non-main subspecies and biovars of the main subspecies based on the presence and absence of fluorescent signal by the specific for the main subspecies and its biovars DNA-targets.

Key words: DNA-microarray, DNA-target, biovar, *Y. pestis*.

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

Corresponding author: Konstantin A .Nikiforov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Nikiforov K.A., Utkin D.V., Kukleva L.M., Eroshenko G.A. Construction of a DNA-Microarray for Differentiation between the Main and Non-Main Subspecies and Biovars of the Main Subspecies of *Yersinia pestis*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:32–35. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-32-35

Чума – одна из наиболее опасных бактериальных инфекций, летальность при которой может достигать 30–50 %. По данным ВОЗ, за период 2010–2015 гг. в мире зарегистрировано 3248 случаев чумы человека [10].

Штаммы *Yersinia pestis* имеют различную вирулентность, эпидемическую значимость и регионы распространения. Особенностями штаммов основного подвида являются их высокая и универсальная вирулентность в отношении различных видов носителей и человека и высокая эпидемическая значимость. Именно они явились этиологическими агентами трех пандемий чумы в античные и средние века и современную эпоху [4, 9]. Штаммы основного подвида широко распространены в природных очагах различных ландшафтно-географических зон. Они включают три биовара: античный, средневековый и восточный. Установление принадлежности штаммов к основному подвиду и определенному биовару позволяет оценить эпидемический потенциал, происхождение штамма и возможный путь его заноса при проведении эпидемиологического расследования.

В настоящее время решение задачи по определению внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* и географическому региону происхождения можно проводить с использованием высокоразрешающей технологии ДНК-чипов. Эта технология позволяет выполнять мультилокусный анализ генома исследуемого штамма по большому числу ДНК-маркеров за счет использования специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на твердом носителе.

Целью нашего исследования было конструирование ДНК-чипа для разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также биоваров основного подвида; оптимизация методики гибридизации на ДНК-чипе для штаммов *Y. pestis*.

Ранее нами найдены ДНК-мишени для внутри-

видовой дифференциации возбудителя чумы, одна из которых – «45» – обеспечивает разделение штаммов основного подвида от штаммов неосновных подвидов по наличию у первых в этом хромосомном локусе маркерной делеции в 45 п.н. [2]. Другая найденная ДНК-мишень – «Med24» – позволяет отделять штаммы средневекового биовара от двух других биоваров основного подвида – античного и восточного ввиду делеции в 24 п.н. у средневековых штаммов [1]. По данным литературы, для выявления штаммов восточного биовара может быть использована вариабельность последовательности гена *glpD,* в котором у штаммов восточного биовара выявлена делеция в 93 п.н. [7]. С использованием этих ДНК-мишеней («Med24» и «glpD(-93)», а также «45») нами сконструирован образец ДНК-чипа для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis*. В литературных источниках отсутствуют данные по разработке ДНК-чипов для дифференциации штаммов *Y. pestis* по подвидам и биоварам.

Материалы и методы

В работе использовано 42 штамма *Y. pestis* основного подвида и 20 – неосновных подвидов, выделенных в природных очагах России, ближнем и дальнем зарубежье. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли стандартным методом в соответствии с МУ 1.3.2569-09 [3].

Расчет олигонуклеотидных праймеров и зондов на мишенях «Med24», «glpD(-93)», «45» для ДНК-чипов осуществляли с использованием программы Vector NTI 10 (Invitrogen Corporation, США) и алгоритма BLAST. Зонды содержали аминогруппу на 5'-конце для их иммобилизации на стекле (слайде). Обратный праймер включал флуоресцентный краситель Cy5. Последовательности используемых в работе праймеров и зондов приведены в табл. 1.

Нанесение зондов на слайд проводили с применением буфера для печати. Для приготовления 100 мкл этого буфера использовали 75 мкл 5М раствора бетаина, 25 мкл PBS буфера, 0,2 мкл 10 % раствора твина-20.

Таблица 1

ДНК-мишени, последовательности праймеров и зондов для дифференциации штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, биоваров основного подвида методом ДНК-чипа

Праймеры, зонды	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
Chip-Med(-24)-S	GCCAGTGTGTGTCTAAAG
Chip-Med(-24)-As	(Cy5)-CGCAACATTCGTCGCAAA
Chip-Med(-24)-Zond2	(NH2)-ACATTGTGCTGGACTCACAGCCCC
Chip-glpD(-93)-S	CAAGGCTTCACTTACCAAG
Chip-glpD(-93)-As	(Cy5)-CAGAGGAAGGTAACATGGA
Chip-glpD(-93)-Zond	(NH2)-TACCGACAGGCCACGCCCAG
Chip-45-S	GTGGATGAGAAAGTTTACCC
Chip-45-As	(Cy5)-ATCACACCTGGATGGTTAC
Chip-45-Zond	(NH2)-ACTCAGCAAGCATCTGCTCAACATG

Олигонуклеотидные зонды разводили буфером для печати в соотношении 1:1 до концентрации 50 пкмоль/мкл, затем с помощью миниплоттера «Xact Microarrayer» (LabNEXT, США) наносили на поверхность аминослайдов GAPS II Coated Slides (Corning, США) методом контактной печати в виде отдельных спотов по вертикали в четырех повторах. Группа спотов формировала эрреи, предназначенные для анализа конкретных образцов. Для иммобилизации нанесенных зондов слайды инкубировали 20 мин при температуре 60 °С и при комнатной температуре в течение 18 ч.

Получение образцов штаммов *Y. pestis* для анализа в ДНК-чипах проводили методом амплификации в ПЦР выбранных ДНК-мишеней.

Амплификацию образцов по трем ДНК-мишеням проводили в одной реакции. Использовали следующую программу амплификации: 1 цикл 94 °С в течение 5 мин; затем 35 циклов при 94 °С, 30 с; 57 °С, 50 с; 72 °С 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °С.

Основные этапы анализа образцов штаммов *Y. pestis* в ДНК-чипах проводили согласно методикам, описанным ранее зарубежными коллегами [5, 6, 8]. В качестве трафаретов использовали 16-луночные гибридизационные камеры «16-well incubation chamber» (Whatman, Германия). Слайды с нанесенными трафаретами помещали в рамки-держатели «FAST-Frame» (Whatman, Германия).

Перед гибридизацией осуществляли предварительную блокировку ДНК-чипов. Во избежание неспецифического связывания в гибридизационные камеры вносили по 100 мкл блокирующего буфера, содержащего 97 мкл 20х SSPE-буфера, 2 мкл 1х раствора Дейнхардта, 1 мкл ДНК спермы лосося в конечной концентрации 0,2 мг/мл. Блокирование проводили при температуре 42 °С в течение 30 мин с использованием термошейкера при скорости вращения платформы 250 об./мин. Затем слайды отмывали при температуре 42 °С в течение 5 мин 0,1х раствором SSPE-буфера с 0,2 % SDS при скорости вращения платформы 250 об./мин.

На этапе гибридизации в ячейки гибридизационной камеры вносили 80 мкл прогретой при 95 °С в течение 5 мин гибридизационной смеси, включающей 10 мкл амплификата и 70 мкл буфера для гибридизации (63 мкл 20х SSPE-буфер, 7 мкл формамида). Ячейки камер заклеивали самоклеящейся пленкой для предотвращения испарения. Гибридизацию осуществляли при 42 °С в течение 5 ч на термошейкере со скоростью вращения платформы 250 об./мин. Потом содержимое ячеек с помощью вакуумного медицинского отсасывателя отбирали, а слайды отмывали 2х раствором SSPE-буфера при температуре 42 °С в течение 2 мин при скорости 250 об./мин, затем 0,1х раствором SSPE-буфера с добавлением 0,2 % SDS. После этого слайды ополаскивали дистиллированной водой и высушивали центрифугированием при 1000 об./мин в течение 1 мин, хранили при 4 °С.

Учет результатов проводили с использованием сканера слайдов GenePix 4100A (США) с помощью программного обеспечения GenePix Pro 6.0.

Критический уровень сигнала флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$C_{кр}=2,2\cdot K^{-},$$

где K^{-} – значение флуоресценции отрицательного контроля при 635 нм.

Результат считали положительным, если среднее значение флуоресценции при длине волны 635 нм для четырех спотов одного зонда было больше или равно критическому уровню флуоресценции, и отрицательным, если среднее значение флуоресценции было меньше критического уровня. Реакцию учитывали при отрицательном результате в лунке с отрицательным контролем (гибридизационный буфер).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты по разработке ДНК-чипа для проведения внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* с использованием ДНК-мишеней «Med24», «glpD(-93)», «45» представлены в табл. 2 и на рисунке. Конструирование зондов на эти ДНК-мишени проводили таким образом, чтобы их нуклеотидные последовательности были комплементарны участкам специфических делеций.

У всех использованных в данной работе 12 штаммов *Y. pestis* античного биовара основного подвида отсутствовал сигнал флуоресценции по мишени «45», но выявлялся по мишеням «Med24» и «glpD(-93)».

15 использованных в данной работе штаммов *Y. pestis* восточного биовара основного подвида характеризовались отсутствием сигнала флуоресценции по мишени «45» и «glpD(-93)», однако выявлялся по мишени «Med24».

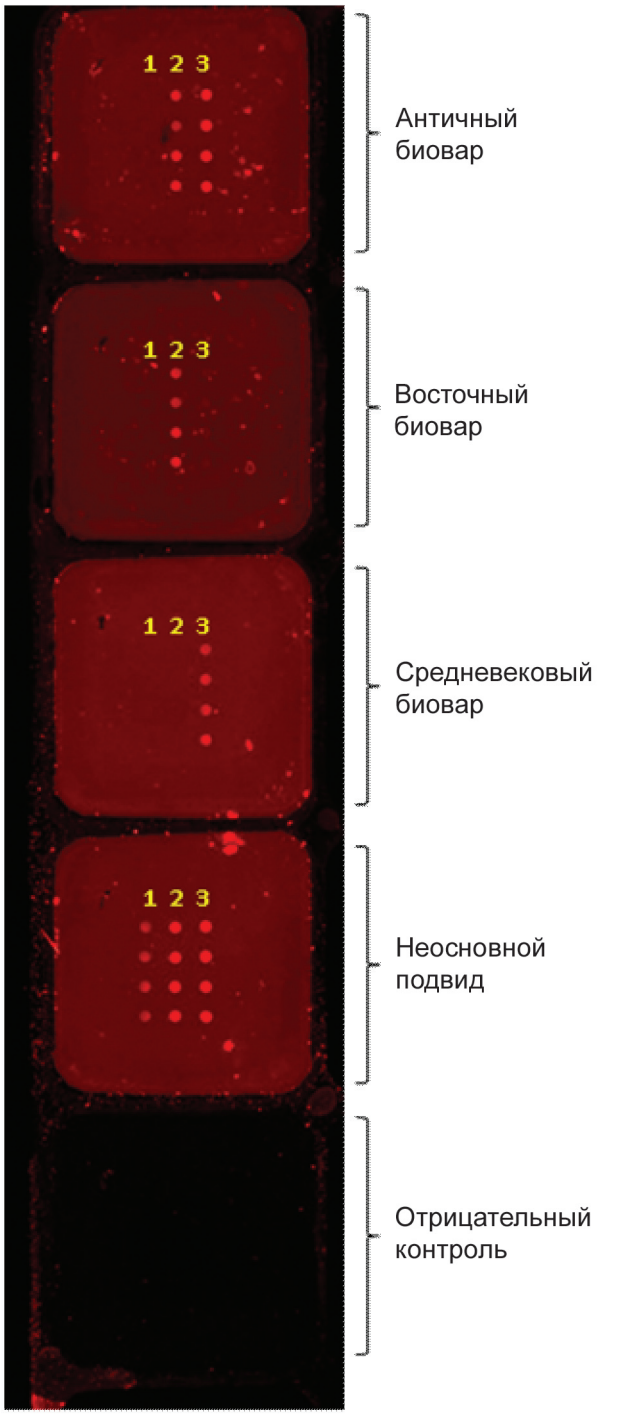
Штаммам *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида было специфично отсутствие сигнала флуоресценции по мишени «45» и «Med24», однако он выявлялся по мишени «glpD(-93)».

У всех использованных в данной работе штаммов *Y. pestis* неосновного подвида сигнал флуоресценции выявлялся по всем трем мишеням.

Таблица 2

Определение внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа

Штаммы *Y. pestis*, их принадлежность	ДНК-мишени, наличие сигнала флуоресценции на ДНК-чипе		
	«45»	«Med24»	«GlpD(-93)»
Основной подвид античный биовар (проверено 12 штаммов)	-	+	+
Основной подвид средневековый биовар (15 штаммов)	-	-	+
Основной подвид восточный биовар (15 штаммов)	-	+	-
Неосновные подвиды (20 штаммов)	+	+	+



Определение внутривидовой принадлежности штаммов *Y. pestis* с помощью ДНК-чипа:

1-й ряд – мишень 45, 2-й ряд – Med24, 3-й ряд – glpD(-93)

Таким образом, нами сконструирован ДНК-чип для одновременного разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов и биоваров основного подвида, оптимизирована методика проведения анализа на ДНК-чипе. Специфичность и эффективность данного ДНК-чипа подтверждена на 62 штаммах *Y. pestis* разных подвидов и биоваров, из которых 12 штаммов античного биовара основного подвида, 15 – средневекового биовара основного подвида, 15 – восточного биовара основного подвида, 20 штаммов неосновного подвида.

В дальнейшем предстоит включить в ДНК-чип другие мишени для разделения по отдельным подвидам (основной, кавказский, алтайский, гиссарский, улегейский) и отдельным популяциям штаммов *Y. pestis* из различных географических регионов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Одиноков Г.Н., Павлова А.И., Анисимова Л.В., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение RUS 2425891. Опубл. 10.08.2010.

2. Одиноков Г.Н., Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Способ дифференциации штаммов возбудителя чумы основного подвида средневекового и античного биоваров методом полимеразной цепной реакции. Патент на изобретение № 2496882. Опубл. 27.10.2013 г., бюл. № 30.

3. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569–09. М.; 2009. 31 с.

4. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.

5. Jin D.Z., Xu X.J., Chen S.H., Wen S.Y., Ma X.E., Zhang Z., Lin F., Wang S.Q. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infect. Agent Cancer*. 2007; 2:23. DOI: 10.1186/1750-9378-2-23.

6. Marcy Y., Cousin P.Y., Rattier M., Cerovic G., Escalier G., Béna G., Guéron M., McDonagh L., le Boulaire F., Bénisty H., Weisbuch C., Avarre J.C. Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. *Biotechniques*. 2008; 44(7):913–20. DOI: 10.2144/000112758.

7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR–based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol–3–phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J. Bacteriol.* 2002; 184 (4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.

8. Tomioka K., Peredelchuk M., Zhu X., Arena R., Volokhov D., Selvapandiyan A., Stabler K., Mellquist-Riemenschneider J., Chizhikov V., Kaplan G., Nakhasi H., Duncan R. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7(4):486–94. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60579-X.

9. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14:319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

10. World Health Organization. Plague. Fact sheets № 267. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/. Дата обращения: 22.06.2016.

References

1. Odinokov G.N., Pavlova A.I., Anisimova L.V., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Method for differentiation of plague agent strains of the main and non-main subspecies and pseudotuberculosis agent, using polymerase chain reaction]. RF Patent 2425891, 10.08. 2010.

2. Odinokov G.N., Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Method for differentiation between plague agent strains of the main subspecies of medieval and antique biovars, using polymerase chain reaction]. RF Patent 2496882. 27.10.2013.

3. [Management of laboratories applying methods of nucleic acid amplification while working with samples containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. MR 1.3.2569-09. M.; 2009. 31 p.

4. Bos K.I., Herbig A., Sahl J., Waglechner N., Fourment M., Forrest S.A., Klunk J., Schuenemann V.J., Poinar D., Kuch M., Golding G.B., Dutour O., Keim P., Wagner D.M., Holmes E.C., Krause J., Poinar H.N. Eighteenth century *Yersinia pestis* genomes reveal the long-term persistence of an historical plague focus. *Elife*. 2016; 5:e12994. DOI: 10.7554/eLife.12994.

5. Jin D.Z., Xu X.J., Chen S.H., Wen S.Y., Ma X.E., Zhang Z., Lin F., Wang S.Q. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *Infect. Agent Cancer*. 2007; 2:23. DOI: 10.1186/1750-9378-2-23.

6. Marcy Y., Cousin P.Y., Rattier M., Cerovic G., Escalier G., Béna G., Guéron M., McDonagh L., le Boulaire F., Bénisty H., Weisbuch C., Avarre J.C. Innovative integrated system for real-time measurement of hybridization and melting on standard format microarrays. *Biotechniques*. 2008; 44(7):913–20. DOI: 10.2144/000112758.

7. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J.M., Hu P., Worsham P.L., Ott L.L., Slezak T.R., Sokhansanj B.A., Regala W.M., Brubaker R.R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR–based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol–3–phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J. Bacteriol.* 2002; 184 (4):1019–27. DOI: 10.1128/jb.184.4.1019-1027.2002.

8. Tomioka K., Peredelchuk M., Zhu X., Arena R., Volokhov D., Selvapandiyan A., Stabler K., Mellquist-Riemenschneider J., Chizhikov V., Kaplan G., Nakhasi H., Duncan R. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J. Mol. Diagn.* 2005; 7(4):486–94. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60579-X.

9. Wagner D.M., Klunk J., Harbeck M., Devault A., Waglechner N., Sahl J.W., Enk J., Birdsell D.N., Kuch M., Lumibao C., Poinar D., Pearson T., Fourment M., Golding B., Riehm J.M., Earn D.J., Dewitte S., Rouillard J.M., Grupe G., Wiechmann I., Bliska J.B., Keim P.S., Scholz H.C., Holmes E.C., Poinar H. *Yersinia pestis* and the Plague of Justinian 541–543 AD: a genomic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14:319–26. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70323-2.

10. World Health Organization. Plague. Fact sheets № 267 (cited 22 Jun 2016). Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 21.07.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:36–39. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39**

УДК 616.932:579.25

Р.В.Писанов, А.С.Водопьянов, Д.И.Симакова

РОЛЬ МАЛЫХ РНК В КОНТРОЛЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕАЛИЗАЦИЮ ПАТОГЕННОСТИ *VIBRIO CHOLERAE*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В настоящее время малые РНК бактерий с регуляторными функциями характеризуют как гетерогенную совокупность высокоструктурированных одноцепочечных РНК, обычно не транслирующихся в белки. Большую группу малых РНК составляют малые регуляторные РНК, функционирующие по механизму комплементарного взаимодействия оснований малой регуляторной РНК с матричными РНК бактерий. В обзоре приведено описание механизмов непосредственного участия малых РНК в реализации патогенных свойств, формировании биопленки и регуляции вирулентности штаммов *V. cholerae.* В частности, описаны Hfq-зависимые малые РНК, управляющие экспрессией генов, ответственных за вирулентность и формирование биопленки *V. cholerae*; представлено влияние малых РНК на систему секреции шестого типа; показано формирование везикул холерного вибриона, управляемого малой РНК, имеющих важное значение для колонизирующей способности холерных вибрионов. Приводится описание такого способа регуляции на уровне РНК, как «рибосвитчи» (РНК-переключатели).

Ключевые слова: малые РНК, регуляция генов, *Vibrio cholerae,* рибосвитч.

Корреспондирующий автор: Писанов Руслан Вячеславович, e-mail: pisanov_rv@antiplague.ru.

R.V.Pisanov, A.S.Vodop'yanov, D.I.Simakova

The Role of Small RNAs in Controlling Expression of Genes Involved in the Implementation of *Vibrio cholerae* Pathogenicity

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Currently, bacterial small RNAs with regulatory functions are characterized as a heterogeneous claster of highly structured single-stranded RNAs which usually would not be translated into proteins. A large group of small RNAs consists of small regulatory RNAs functioning through the mechanism of complementary interaction between small regulatory RNA bases and bacterial messenger RNAs (mRNA). The review provides the description of direct participation of small RNA mechanisms in realization of pathogenic properties, biofilm formation and virulence regulation in *V. cholerae* strains. In particular, the Hfq-dependent small RNAs that control the expression of genes responsible for virulence and biofilm formation of *V. cholerae*, and the impact of small RNA on the secretion system of VI type are presented. We also characterized the small RNAs–controlled process of *V. cholerae* vesicles formation, which have a great significance for colonization ability of cholera vibrios. In addition, such method of regulation at RNA level as "riboswitches", (RNA switches) is described.

Key words: small RNAs, gene regulation, *Vibrio cholerae,* riboswitch.

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

Corresponding author: Ruslan V. Pisanov, e-mail: pisanov_rv@antiplague.ru.

Citation: Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Simakova D.I. The Role of Small RNAs in Controlling Expression of Genes Involved in the Implementation of *Vibrio cholerae* Pathogenicity. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:36–39. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-36-39

В качестве ключевых регуляторов генов в бактериальных клетках традиционно рассматривают белки, но не так давно были обнаружены системы контроля экспрессии генов с помощью малых РНК. Первые гены не кодирующих малых РНК (smallRNAs (sRNAs), non-codingRNAs (ncRNA)) с неизвестными на тот момент функциями были обнаружены в бактериальных плазмидах более 30 лет назад [18, 19, 24]. В последние годы в зарубежной литературе наблюдается лавинообразный рост числа публикаций по малым РНК. Как закономерный итог, на сегодняшний день известны сотни бактериальных малых РНК, различающихся по структуре, механизмам действия и функциям. Общее количество известных малых РНК у наиболее изученной по этим молекулам бактерии – *Salmonella* около 100, у *E. coli* приближается к этому количеству. Заявлено об обнаружении более 600 малых РНК у *V. cholerae* при использовании метода секвенирования последнего поколения (NGS) [7], что является рекордом среди всех бактерий с охарактеризованным малым РНКомом.

Разнообразие малых РНК породило необходимость выделения этой группы молекул в отдельный класс регуляторов. В настоящее время все малые РНК бактерий с регуляторными функциями характеризуют как гетерогенную совокупность высокоструктурированных РНК, которые обычно не транслируются в белки (некоторые, редко – в короткие пептиды), варьируют по длине от 50 до 400 (иногда несколько больше) нуклеотидов [1, 15, 16, 19].

Большую группу малых РНК составляют малые регуляторные РНК, функционирующие по механизму комплементарного спаривания (гибридизации, т.е. образования водородных связей по типу «цепь нуклеиновых кислот (НК) – комплементарная ей НК цепь») оснований малой регуляторной РНК с ма-

тричными РНК (мРНК) бактерий. В отношении малых РНК гибридизация бывает двух типов:

- антисмысловая гибридизация РНК-нуклеотидов, происходящая с участием цис-малых РНК (cis-encodedsmall RNA), кодируются в том же генном локусе, но на цепи ДНК, противолежащей от кодирующей матричную РНК;

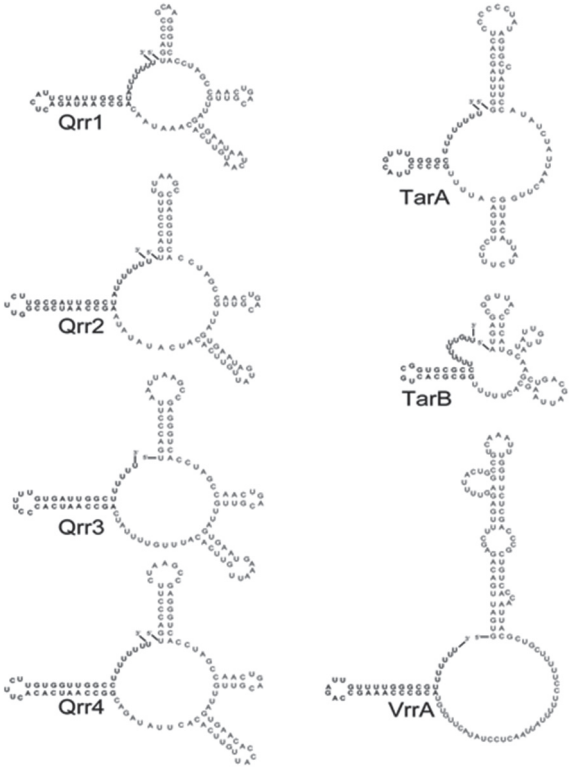
- несовершенная (неполная) гибридизация с участием транс-малых РНК (trans-encodedsmall RNA, tesRNA), выступающих в роли полифункциональных регуляторов, т.к. их последовательности могут иметь сродство к нескольким мРНК-мишеням [20].

Образованные при участии малой РНК дуплексы совместно с белком-регулятором Hfq впоследствии гидролизуются такими рибонуклеазами, как РНКаза Е [20]. Так осуществляется деградация матричной РНК и, как следствие, репрессируется синтез соответствующего белка.

Для посттрансляционной регуляции генов, управляемых малыми РНК, необходим РНК-связывающий белок, обозначаемый как Hfq. У холерных вибрионов Hfq-зависимые малые РНК управляют экспрессией генов, ответственных за вирулентность и формирование биопленки. Показано, что с Hfq связываются все известные на настоящий момент tesRNA, активирующие синтез σ^s-фактора РНК-полимеразы, так же, как и OMP-регулирующие sRNA MicA и RyhB, которые контролируют активность другого σ^e-фактора по механизму обратной связи. Данные σ-факторы, как показано, управляют системами вирулентности бактерий и, помимо этого, контролируют экспрессию до 60 % генного пула бактерий. Также на сальмонелле и кишечной палочке было показано, что Hfq связывается с транскодируемыми малыми РНК, регулирующими синтез ЛПС, системы контроля потребления железа, системы секреции 3-го типа, системы чувства кворума и прочими факторами, прямо или косвенно регулирующими вирулентность [7].

Есть свидетельства того, что некоторые из Hfq-ассоциированных tesRNA прямо или косвенно участвуют в регуляции вирулентности холерного вибриона [5, 9]. У холерных вибрионов известно два основных фактора патогенности: холерный токсин (CT) и токсин ко-регулируемые пили (TCP), способствующие межклеточной агрегации, колонизации кишечника макроорганизма и служащие рецептором для CTXϕ фага. Известна и система генной регуляции основных факторов патогенности, в которой основным регуляторным белком, контролирующим транскрипцию *ctxAB* и *tcpA-F*, является ToxT. Транскрипция ToxT активируется белками TcpH и TcpP, а также ToxR-трансмембранным белком, для работы которого необходим протеин ToxS, ассоциированный с внутренней мембраной. Под воздействием различных факторов внешней среды происходит изменение экспрессии факторов патогенности посредством TcpH-P или ToxR-S регуляции, которая, в свою очередь, находится под контролем комплекса AphA-B белков активаторов (рисунок) [11, 12]. Вышеописанная регуляция находится в непосредственной зависимости от состояния «quorum sensing» бактериальной культуры *V. cholerae* и управляется четырьмя малыми РНК, получившими название Qrr1-4. Экспериментально установлено, что штаммы, делетированные по этим РНК, не способны осуществлять продукцию холерогена, пилей адгезии и формировать биопленку. «Quorum sensing» (QS) – это процесс, при котором клетки взаимодействуют между собой для коррекции коллективного поведения в ответ на воздействия факторов внешней среды посредством автоиндукторов [3].

Холерный вибрион производит и реагирует на два QS автоиндуктора, ХАИ-1 (холера аутоиндуктор-1) и АИ-2 (аутоиндуктор-2), которые производятся белками CqsA и LuxS соответственно. ХАИ-1 – это (S)-3-гидрокситридекан-4-пентадионон – синтезируется и используется большинством представителей рода *Vibrio*. АИ-2 – это 4,5-дигидрокси-2,3-пентандион (ДПД), который производится многими видами бактерий и является универсальной сигнальной молекулой для межвидовых взаимодействий. Автоиндукторы холерных вибрионов производятся с постоянной скоростью и, таким образом, могут служить в качестве показателя бактериального числа: при низком уровне концентрации АИ наблюдается низкая плотность клеток, при высоком уровне АИ – высокая. Для каждого автоиндуктора на внутренней мембране имеется свой мембранный рецептор: CqsS для ХАИ-1 и гетеродимер LuxP/Q для АИ-2. Каждый рецептор передает сигнал регуляторному белку LuxO. При низкой плотности клеток происходит фосфорилирование



Вторичная структура малых РНК, отвечающих за вирулентность *V. cholerae* ctx^+ tcp^+ штаммов [2]

LuxO и активация четырех малых РНК Qrr1-4. Они функционируют совместно с Hfq, ингибируя трансляцию сразу нескольких матричных РНК генов, вовлеченных в регуляцию вирулентности *V. cholerae*: hapR – глобального регулятора/репрессора генов патогенности, aphA – индуктора экспрессии генов патогенности и гена vca0939, стимулирующего формирование биопленки [2].

Система секреции шестого T6SS типа была ранее открыта как система доставки факторов патогенности у холерогенных штаммов *V. cholerae*. Также у холерных вибрионов она используется для уничтожения простейших и других бактериальных конкурентов в окружающей среде. В геноме холерного вибриона T6SS представлена одним большим VCA0107-VCA0124 и двумя малыми кластерами геновVC1415-VC1421, VCA0017-VCA0021. Достоверно установлено, что малые РНК Qrr1-4 управляют этой системой посредством репрессии. Открыто два механизма контроля. В первом случае при высокой плотности клеток культуры малые РНК Qrr1-4 блокируют трансляцию белка регулятора HapR посредством прямого «паринга» с мРНК как активатора генов T6SS малого кластера. Во втором случае при низкой плотности клеток культуры происходит прямая репрессия малыми РНК Qrr1-4 трансляции белка регулятора VasH (активатора генов малых кластеров), ген которого располагается в большом кластереT6SS [21].

В окружающей среде холерный вибрион может существовать как в свободной форме, так и в виде биопленки, ассоциированной с различными поверхностями (хитин, пластик, природные алюмосиликаты). Биопленочная форма холерного вибриона максимально устойчива к воздействию различных факторов окружающей среды и обладает повышенными вирулентными свойствами по сравнению со свободной формой. Рост биопленки на хитине стимулирует естественную восприимчивость вибрионов к чужеродной ДНК в качестве источника генетического разнообразия и пополнения арсенала факторов вирулентности. Так, активация компетенции холерных вибрионов контролируется двумя основными регуляторными белками: TfoX и HapR. TfoX регулирует гены, важные для связывания и перемещения экзогенной ДНК в периплазму клетки. При участии шаперона Hfq трансляция TfoX индуцируется малой РНК TfoR, концентрация которой возрастает при утилизации хитина клетками *V. cholerae* [8, 25]. Кроме того, TfoX в сочетании с HapR косвенно регулирует гены, ответственные за стабилизацию ДНК в периплазме и поглощение через внутреннюю мембрану с помощью ко-активации регулятора транскрипции QstR (VC0396) [8]. Прекращение синтеза малых РНК Qrr1-4 под воздействием автоиндукционных сигналов в биопленке приводит к возрастанию концентрации белка HapR, что также индуцирует экспрессию каскада генов естественной компетентности клеток *V. cholerae* и, как следствие, восприимчивость к горизонтальному переносу генетической информации, распространяемой как в виде свободной ДНК, так и в виде везикул. Мозаичная структура генома холерных вибрионов, по мнению некоторых исследователей, является результатом многочисленных горизонтальных событий переноса генов.

Везикулы наружной мембраны продуцируются большинством грамотрицательных бактерий в процессе их жизнедеятельности, в том числе и представителями рода *Vibrio*. В состав везикул входят ДНК, РНК, белки наружной мембраны и периплазмы, липополисахариды, фосфолипиды. У разных исследователей существуют различные теории о функциях бактериальных везикул. Одна из них – это перенос и доставка факторов патогенности к бактериальным или эукариотическим клеткам и способ выживаемости бактериальной биопленки, где везикулы выступают транспортерами протеолитических ферментов к удаленному субстрату и мишенью для фагов.

Процесс формирования везикул у холерного вибриона управляется посредством малой РНК, получившей название VrrA (Vibrio regulatory RNA of ompA) [23]. В геноме *V. cholerae* ее ген (140 п.н.) располагается в межгенной области vc1741-vc1743. Протеин OmpA (outer membrane porin) имеет важное значение для колонизирующей способности холерных вибрионов. Экспериментальным путем на модели мышей-сосунков установлено, что штаммы, делетированные по OmpA, обладают пониженной колонизирующей способностью (в 10 раз от исходного) и в то же время штаммы с инактивированным геном малой РНК vrrA, напротив, показывают пятикратное увеличение колонизирующей активности, что говорит о VrrA как о модуляторе вирулентности холерных вибрионов. Установлено, что малая РНК VrrA продуцируется и накапливается в постлогарифмическую фазу роста и посредством «паринга» связывается с матричной РНК ompA, препятствуя ее трансляции и блокируя синтез OmpA. Продукция везикул холерными вибрионами зависит от концентрации OmpA в клетке. Подавление синтеза OmpA через VrrA приводит к повышению продукции везикул культурой и, как следствие, повышению выживаемости биопленки [23]. VrrA снижает вирулентность *V. cholerae* путем подавления экспрессии гена *tcpA* посредством связывания с мРНК. Таким образом, VrrA, как репрессор колонизирующей активности вибрионов, может рассматриваться в качестве одной из мишеней при создании вакцинных штаммов.

Одним из способов регуляции на уровне РНК являются так называемые «рибосвитчи» или же РНК-переключатели. При этом способе регуляции «малая РНК» фактически располагается в составе матричной РНК перед началом кодирующей части гена. Принципиальной особенностью работы рибосвитча является изменение пространственной структуры РНК при связывании с определенным лигандом [4].

Например, именно по такому пути происходит регуляция синтеза глицина у сенной палочки: избыток глицина приводит к формированию шпильки в области посадки рибосомы на матричную РНК, что

блокирует процесс трансляции [17]. Позже было показано, что регуляция синтеза глицина происходит аналогичным путем и у холерного вибриона [14].

Известно, что циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (цГМФ) является одним из универсальных регуляторов биохимических процессов, происходящих в микробной клетке. У *V. cholerae* цГМФ регулирует такие процессы, как подвижность и образование биопленки.

Группой авторов при изучении кристаллической структуры показано, что цГМФ является специфическим лигандом для гена *tfoX* у *V. cholerae* и регулирует его трансляцию по принципу рибосвитча [22]. Вместе с тем ранее было показано, что указанный ген ответственен за образование биопленок у холерного вибриона. Это позволило сделать вывод о том, что регуляция образования пленкообразования у *V. cholerae* происходит с помощью рибосвитча [13]. При этом замена одного нуклеотида способна изменять связывание матричной РНК гена *vpvC* с цГМФ, приводя к образованию ругозных вариантов *V. cholerae* [6]. Последующие исследования показали, что у возбудителя холеры цГМФ-рибосвитч регулирует трансляцию гена *gbpA*, ответственного за колонизацию и способствующего присоединению холерных вибрионов к хитину [10].

Исходя из различных литературных данных зарубежных исследователей, можно сделать вывод о непосредственном участии малых РНК в реализации патогенных свойств и регуляции вирулентности холерогенных штаммов *V. cholerae.* Но даже сегодня изучение малых РНК сопряжено с различного рода трудностями. Практически не разработана унифицированная система для выделения малых РНК и Hfq-ассоциированных tesRNA, а методическая база по работе с малыми РНК с учетом СП 1.3.1285-03 (Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности) полностью отсутствует. Тем не менее, в нашей стране работы по использованию малых РНК как маркеров вирулентности у разных штаммов *V. cholerae* еще не осуществлялись, но, несомненно, выглядят многообещающими в свете последних научных изысканий.

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

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arraiano C.M., Fialho A.M. O Mundo do RNA: Novos Desafios e Perspectivas Futuras. Lidel: Lisboa-Porto; 2007.
2. Bardill J.P., Hammer B.K. Non-coding sRNAs regulate virulence in the bacterial pathogen *Vibrio cholerae*. *RNA biol.* 2012; 9(4):392–401. DOI: 10.4161/rna.19975.
3. Bardill J.P., Zhao X., Hammer B.K. The *Vibrio cholerae* quorum sensing response is mediated by Hfq-dependent sRNA/mRNA base pairing interactions. *Mol. Microbiol.* 2011; 80(5):1381–94. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07655.x.
4. Bastet L., Dube A., Masse E., Lafontaine D.A. New insights into riboswitch regulation mechanisms. *Mol. microbiol.* 2011; 80:1148–54. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07654.x.
5. Bejerano-Sagie M., Xavier K.B. The role of small RNAs in quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(2):189–98. DOI: 10.1016/j.mib.2007.03.009.
6. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Mol. microbiol.* 2007; 63(4):995–1007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x.
7. Chao Y., Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(1):24–33. DOI: 10.1016/j.mib.2010.01.001.
8. Dalia A.B., Lazinski D.W., Camilli A. Identification of a membrane-bound transcriptional regulator that links chitin and natural competence in *Vibrio cholerae. MBio*. 2014; 5(1):1028–33. DOI: 10.1128/mBio.01028-13.
9. Hammer B.K., Bassler B.L. Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(27):1145–9. DOI: 10.1073/pnas.0703860104.
10. Kariisa A.T., Weeks K., Tamayo R. The RNA Domain Vc1 Regulates Downstream Gene Expression in Response to Cyclic Diguanylate in *Vibrio cholerae. PLoS One.* 2016; 11(2):1484–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0148478.
11. Kovacikova G., Lin W., Skorupski K. *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the tcpPH promoter. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):129–42. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04121.x.
12. Kovacikova G., Skorupski K. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* tcpPH promoter. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(2):393–407. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02518.x.
13. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 60(2):331–48. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05106.x.
14. Lipfert J., Das R., Chu V.B., Kudaravalli M., Boyd N., Herschlag D., Doniach S. Structural transitions and thermodynamics of a glycine-dependent riboswitch from *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2007; 365(5):1393–406. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.10.022.
15. Liu J.M., Camilli A. A broadening world of bacterial small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010; 13(1):18–23. DOI: 10.1016/j.mib.2009.11.004.
16. Liu J.M., Camilli A. Discovery of bacterial sRNAs by high-throughput sequencing. *Methods Mol. Biol.* 2011; 733:63–79. DOI: 10.1007/978-1-61779-089-8_5.
17. Mandal M., Lee M., Barrick J.E., Weinberg Z., Emilsson G.M., Ruzzo W.L., Breaker R.R. A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*. 2004; 306(5694):275–9. DOI: 10.1126/science.1100829.
18. Massé E., Majdalani N., Gottesman S. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6(2):120–4. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00027.
19. Narberhaus F., Vogel J. Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere. *Mol. Microbiol.* 2009; 74(2):261–9. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06869.x.
20. Repoila F., Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol. Cell.* 2009; 101(2):117–31. DOI: 10.1042/BC20070137.
21. Shao Y., Bassler B. L. Quorum regulatory small RNAs repress type VI secretion in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol*. 2014; 92(5):921–30. DOI: 10.1111/mmi.12599.
22. Smith K.D., Lipchock S.V., Ames T.D., Wang J., Breaker R.R., Strobel S.A. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009; 16(12):1218–23. DOI: 10.1038/nsmb.1702.
23. Song T., Mika F, Lindmark B., Liu Z., Schild S., Bishop A., Zhu J., Camilli A., Johansson J., Vogel J., Wai S.N. A new *Vibrio cholerae* RNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol. Microbiol*. 2008; 70(1):100–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06392.x.
24. Waters L.S., Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*. 2009; 136(4):615–28. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.043.
25. Yamamoto S., Izumiya H., Mitobe J., Morita M., Arakawa E., Ohnishi M., Watanabe H. Identification of a chitin-induced small RNA that regulates translation of the tfoX gene, encoding a positive regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol*. 2011; 193(8):1953–65. DOI: 10.1128/JB.01340-10.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 17.08.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:40–44. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-40-44**

УДК 616.98:579.842.23+616.932

Т.А.Полунина, С.П.Заднова, Я.М.Краснов

ПРИМЕНЕНИЕ 2D-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ФРАКЦИЙ ЭКЗОПРОТЕИНОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ХОЛЕРЫ

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

Цель работы. Применение 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов, а также идентификации и сравнения активности экспрессии биомаркеров основных факторов патогенности возбудителей чумы и холеры. **Материалы и методы**. 2D-гели фракций экзопротеинов получали на модели штаммов *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^–$, а также *Y. pestis* EV НИИЭГ. В качестве биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры использовали капсульный антиген F1 и холерный токсин. **Результаты и выводы**. При исследовании холерного токсина 2D-электрофорезом на IPG стрипах с градиентом pH 3–10 антиген разделялся на ряд белковых пятен, два из которых близки к параметрам домена A1 (MW 20,309 кДа и pI 6,51) и мономера субъединицы B (MW 11,091 кДа и pI 7,68). При сравнении белкового спектра фракций экзопротеинов штаммов *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^–$ обнаружены пятна с аналогичными параметрами, за исключением штамма *V. cholerae* M888 Ctx$^–$. При анализе 2D-гелей образцов капсульного антигена и фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV было отмечено, что белковые пятна, соответствующие параметрам субъединичной формы и димеру антигена, присутствуют в образце 37 °C культуры. В образце 28 °C культуры присутствует субъединица F1 в значительно меньшей концентрации. На модели токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^–$, штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ показана высокая эффективность 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов этих культур, а также идентификации и сравнения экспрессии биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры.

Ключевые слова: 2D-электрофорез, экзопротеины, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Полунина Татьяна Алексеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

T.A.Polunina, S.P.Zadnova, Ya.M.Krasnov

2D-Electrophoresis in Protein Spectrum Construction for Exoprotein Fractions of Plague and Cholera Agents

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

Objective of the study is to apply 2D-electrophoresis for imaging protein spectrum of exoprotein fractions, as well as identification and comparison of biomarker expression of the key pathogenicity factors in plague and cholera agents. **Materials and methods**. 2D gels of exoprotein fractions were obtained on the model of *Vibrio cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888Ctx$^+$ and Ctx$^–$ strains, and also *Y. pestis* EV NIIEG strain. Capsular antigen F1 and cholera toxin were used as biomarkers of major exoproteins of plague and cholera agents. **Results and conclusions**. While studying cholera toxin through 2D-electrophoresis on IPG strips with pH 3–10 gradient, the antigen fell into a number of protein spots, two of which were close to A1 domain parameters (MW 20.309 kDa and pI 6.51) and B-subunit monomer (MW 11.091 kDa and pI 7.68). Comparative protein spectrum analysis of the exoprotein fractions of *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ and Ctx$^–$ has revealed the spots with similar parameters, excluding the strain *V. cholerae* M888 Ctx$^–$. Investigation of 2D gels of capsular antigen and exoprotein fractions of *Y. pestis* EV strain has demonstrated that protein spots corresponding to the parameters of the subunit form and diameter of the antigen are present in 37 °C culture patterns. 28 °C culture sample contains F1 subunit in a far lesser concentrations. On the model of toxigenic *V. cholerae* Inaba 569B strain, isogenic system of *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ and Ctx$^–$ strains, and *Y. pestis* EV NIIEG strain, high efficiency of 2D-electrophoresis in protein spectrum construction for exoprotein fractions of the cultures, as well as identification and comparison of biomarker expression of major exoproteins of plague and cholera agents is established.

Key words: 2D-electrophoresis, exoproteins, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*.

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

Corresponding author: Tatiana A. Polunina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Polunina T.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. 2D-Electrophoresis in Protein Spectrum Construction for Exoprotein Fractions of Plague and Cholera Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:40–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-40-44

Экзопротеины бактериальных культур, секретируемые во внешнюю среду, играют важную роль в жизнедеятельности таких патогенов как *Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis*, т.к. участвуют в построении капсулы, выполняют защитную функцию, а также взаимодействуют с макроорганизмами.

Эпидемические штаммы *V. cholerae* продуцируют во внешнюю среду значительное количество экзопротеинов, относящихся к факторам патогенности, которые способствуют колонизации возбудителя в тонком кишечнике, развитию острого воспалительного процесса и диареи. Способность заселять тонкий кишечник обусловлена продукцией холерным вибрионом адгезивных молекул,

включающих токсинкорегулируемые пили, а также маннозофукорезистентные и маннозочувствительные гемагглютинины-адгезины. После адгезии начинается интенсивная продукция холерного токсина (CT) – одного из ключевых факторов патогенности. CT состоит из субъединицы A, отвечающей за токсическую активность всей молекулы, и B субъединиц, которые обеспечивают связывание токсина с клеточными рецепторами энтероцитов (ганглиозидами Gm1), а также несут антигенные детерминанты. Цитопатогенный эффект CT усиливается продукцией эндотоксина и действием различных ферментов [3].

Циркуляция *Y. pestis* в природных очагах обеспечивается целым рядом факторов патогенности, одним из которых является способность возбудителя при температуре 37 °C формировать капсулу, образованную капсульным антигеном F1. На продукцию F1 влияет не только температура, но также pH и состав питательной среды. При температуре 37 °C толщина капсульной оболочки может в несколько раз превосходить толщину самой бактериальной клетки, однако использование высокочувствительных методов позволило также обнаружить капсулу на поверхности клеток чумного микроба, выращенных при 28 °C [1]. Использование сканирующей электронной микроскопии [17] показало, что капсула представляет собой аморфное вещество ячеистой структуры или внеклеточный фибриллярный матрикс, непрочно связанный с микробной клеткой. Отмечено, что 30–50 % синтезируемого антигена легко переходит в среду культивирования [8]. Это позволило выделять капсульный антиген также из культуральной жидкости, увеличив выход и качество конечного продукта по сравнению с классической методикой получения F1 из ацетонвысушенных клеток по E.E.Baker *et al.* [9], и получать препарат, лишенный компонентов клеточной стенки и протоплазмы, с молекулярным весом (MW) до 2,0 МДа и субъединицей 13,5–17,7 кДа и изоточкой pI 4,3–4,8 [2, 6, 8, 12].

Высокая вариабельность геномов возбудителей чумы и холеры, возможность существования в различных экосистемах определяет необходимость поиска и совершенствования методов выявления изменений компонентного состава белков в результате фенотипической адаптации патогенов к условиям окружающей среды.

2D-электрофорез, обеспечивая одновременно первичный анализ и максимальное разделение денатурированных белков образца по заряду и молекулярной массе, является одним из базовых методов пробоподготовки в интенсивно развивающихся направлениях протеомного анализа, позволяющего выявлять, идентифицировать и регистрировать уровень экспрессии белков. В связи с этим, актуальным является использование метода для изучения белкового спектра фракций экзопротеинов бактериальных культур, в том числе штаммов возбудителей особо опасных инфекций.

Целью работы является применение 2D-электрофореза для получения белкового спектра фракций экзопротеинов, а также идентификации и сравнения активности экспрессии биомаркеров основных факторов патогенности возбудителей чумы и холеры.

Материалы и методы

2D-гели фракций экзопротеинов получали на модели токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx^+ и Ctx^-, а также штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов).

Культуру клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали в бульоне LB (pH 7,2–7,4) при 28 и 37 °C в течение 48 ч. Культуру клеток штамма *V. cholerae* Inaba 569B выращивали в бульоне LB (pH 7,2–7,4) при 30 °C с аэрацией в течение 18 ч. Культуры клеток штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx^+ и Ctx^- выращивали согласно описанной методике [13].

Из бульонной культуры бактериальные клетки удаляли центрифугированием при 8000 об./мин в течение 20 мин при 4 °C (центрифуга Awel MF 20-R). Фракцию экзопротеинов осаждали из культуральной жидкости добавлением 50 % трихлоруксусной кислоты до конечной концентрации 10 % и инкубацией на льду в течение 30 мин. Осадок дважды промывали холодным ацетоном и подсушивали на воздухе. Осадок растворяли в 10 мл холодного 10 mM Трис-HCl буфера (pH 8–5), затем процедуру осаждения повторяли. Агрегированные белки подсушивали на воздухе и растворяли в буфере для SDS или 2D-электрофореза.

В качестве биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры использовали лиофилизированные препараты капсульного антигена F1 (любезно предоставленного д.б.н. Т.М.Тараненко) [6] и холерного токсина (MW ~85,000 кДа, pI 6,6, «Sigma»).

Концентрацию белка в пробах измеряли по методу М.М.Бредфорда на сканирующем спектрофотометре Biowave II (Biochrom, UK) при длине волны 595 нм [11].

SDS-PAGE электрофорез проводили классическим методом W.K.Laemmli [15], 2D-электрофорез по методике, описанной ранее [5].

2D-гели анализировали с помощью программного обеспечения (ПО) Dymension мультифункциональной системы гель-документирования Syngene (G:BOX Chemi XT4, UK). При сравнении 2D-гелей путем наложения их изображений контуры совпадающих пятен обозначены синим цветом, а несовпадающих – голубым. Результаты компьютерного анализа содержат информацию об общем количестве выявленных и совпадающих пятен образцов, их порядковый номер, а также характеристику каждого пятна по интенсивности, MW и pI.

Результаты и обсуждение

В настоящее время известно, что СТ представляет собою олигомерный белок (MW 82,000–85,620 кДа и pI 6,6–7,0), состоящий из двух субъединиц. Субъединица А, обладающая токсичностью и каталитической активностью (MW 27,215–30,000 кДа; pI 6,1), имеет два домена А1 (MW 21,817–24,000 кДа) и А2 (MW 5,398–5,700 кДа), соединенных дисульфидной связью. В-субъединица, несущая рецепторную функцию (MW 53,000–58,387 кДа; pI 7,8), представляет собой нековалентно ассоциированный комплекс из пяти мономеров с MW 10,500–14,000 кДа каждая [10, 14, 16, 18].

Под действием таких денатурирующих агентов, как мочевина, 2-меркаптоэтанол, детергенты SDS и CHAPS, холерный токсин подвергался различной степени диссоциации в зависимости от времени инкубации и температуры. Так, предварительная экспозиция в регидратационном буфере (8 M Urea, 2 % CHAPS, 50 mM DTT, 0,2 % Ampholytes pH 3–10, 0,001 % Bromphenol blue) в течение 2 ч и анализ SDS-PAGE электрофорезом без кипячения позволили обнаружить полосы с MW 28,000 и 55,000 кДа, соответствующие субъединицам А и В. Только после кипячения в течение 3 мин в нативном буфере без SDS, а также в буфере для образцов с SDS (31,5 mM Tris-HCI, pH 6,8, 10 % glycerol, 1 % SDS, 0,005 % Bromophenol Blue) антиген максимально диссоциировал до домена А1 и мономера В1, образуя две полосы с MW 21,000 и 11,000 кДа соответственно.

Капсульный антиген F1, выделенный из центрифугата бульонной культуры штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ методом одноэтапной гель-хроматографии на биогеле А-50m, представляет собой монокомпонентную белковую систему без полисахаридных примесей [2, 6].

В отличие от СТ, применение только денатурирующих агентов (мочевины, 2-меркаптоэтанола, детергентов SDS и CHAPS) не приводило к изменению нативной конформации белковой макромолекулы капсульного антигена. Прогревание образца F1 при 100 °С в течение 3 мин вызывало диссоциацию антигена до отдельных белковых субъединиц с MW ~17,000 кДа, его охлаждение до комнатной температуры уже через 1 ч позволило зарегистрировать процесс реассоциации субъединиц с образованием олигомеров с различной MW. Процедура термообработки в течение 3 мин в буфере для образцов с SDS приводила к необратимой диссоциации до субъединиц. Эффекта торможения реассоциации на стадии субъединицы удалось также достигнуть при добавлении к образцам F1 сразу после кипячения раствора SDS до конечной концентрации 0,5 %. Это объясняется способностью SDS связываться с солюбилизированными белками, что приводит к увеличению их отрицательного заряда и вызывает отталкивание друг от друга, блокируя процесс агрегации [4, 7].

Таким образом, наибольшей силой денатурирующего воздействия на нативную структуру белковых макромолекул СТ и F1 обладает процедура термообработки при 100 °С не менее 3 мин, приводящая к полному распаду антигенов до составляющих субъединиц. Структурной особенностью капсульного антигена является способность субъединиц спонтанно агрегировать при восстановлении физиологических условий с образованием набора олигомеров. Ранее замечено, что при тепловом разворачивании белковой полимерной структуры F1 происходит формирование термодинамически устойчивых тетрамеров, которые при охлаждении распадаются до субъединиц, способных к последующей реассоциации с сохранением серологической активности. Это позволило предположить, что полимерная структура F1 имеет специфический механизм приспособления к изменениям окружающей среды. Возможно, здесь имеет место эволюционно обусловленный способ сохранения функционально активных структурных единиц, несущих информацию о макромолекуле антигена [19].

При исследовании СТ 2D-электрофорезом на IPG-стрипах с градиентом pH 3–10 антиген разделялся на ряд белковых пятен, два из которых близки, по литературным данным, к параметрам домена А1 (MW 20,309 кДа и pI 6,51) и мономера субъединицы В (MW 11,091 кДа и pI 7,68). При сравнении белкового спектра фракций экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B и изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^-$ обнаружены пятна с аналогичными параметрами, за исключением штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^-$ (рис. 1, 2).

При анализе 2D-гелей фракций экзопротеинов штаммов *V. cholerae* Inaba 569B, *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^-$ было выявлено в среднем 334, 597

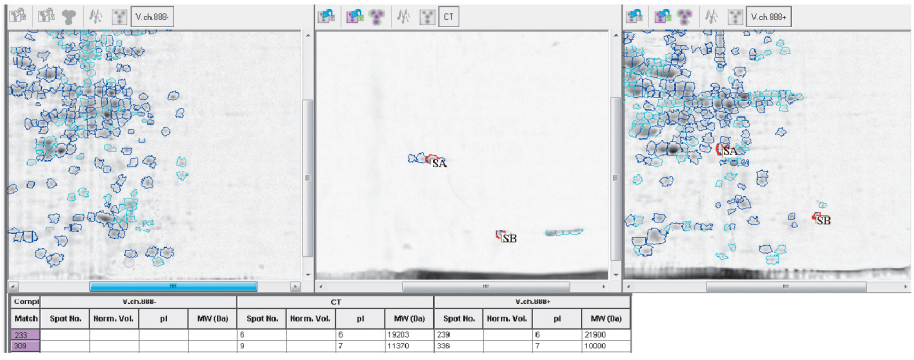


Рис. 1. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^-$ на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 3–10

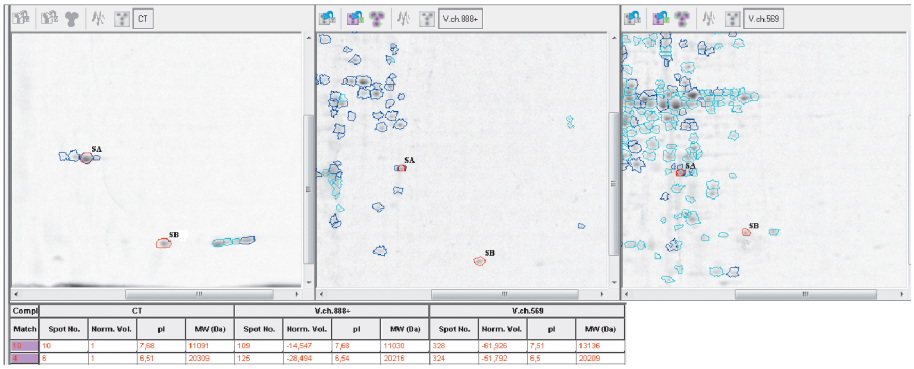


Рис. 2. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B и штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 3–10

и 466 белковых пятен соответственно. Сравнение электрофореграмм штамма *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^-$ показало 260 совпадающих пятен, среди которых повышение интенсивности окрашивания в 2 и более раза отмечалось у 52 белковых пятен токсигенного и 64 атоксигенного штамма.

Исследование капсульного антигена чумного микроба 2D-электрофорезом в диапазоне pH 3–10 показало, что под влиянием денатурирующих условий происходит диссоциация агрегированной формы F1 с образованием субъединичной формы антигена и набора олигомеров с различными молекулярными массами. Отмечено, что при фракционировании капсульного антигена имеется ряд белковых пятен с pI 4,06–4,45 и MW 16,500–17,200 и 34,100–34,400 кДа, что соответствует, по литературным данным, субъединице и димеру антигена. Для достижения наибольшего разрешения белковых пятен в зоне фракционирования F1 мы провели исследование также на стрипах с диапазоном pH 4–7. При анализе электрофореграмм образцов капсульного антигена и фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ отмечено, что белковые пятна, соответствующие параметрам субъединичной формы и димеру антигена, присутствуют в образце 37 °C культуры. Во фракции экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 °C, присутствует субъединица F1 в значительно меньшей концентрации (рис. 3).

При анализе 2D-гелей фракций экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C, на стрипах с градиентом pH 4–7 было детектировано соответственно 323 и 578 белковых пятен. Среди 254 совпадающих пятен повышение интенсивности окрашивания в 2 и более раза отмечалось у 116 в образце 28 °C культуры и 16 в образце штамма, выращенного при 37 °C. Кроме того, в образце 37 °C культуры отмечено повышение интенсивности окрашивания в 3,8 раз белкового пятна с параметрами субъединичной формы F1, что коррелирует с увеличением биосинтеза капсульного антигена при данной температуре.

Таким образом, компьютерный анализ с помощью ПО Dymension системы гель-документирования Syngene полученных 2D-гелей образцов антигенов ХТ и капсульного антигена F1, фракций экзопротеинов токсигенного штамма *V. cholerae* Inaba 569B, изогенной системы штаммов *V. cholerae* El Tor M888 Ctx$^+$ и Ctx$^-$, а также штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного в различных условиях, дает возможность получения белкового спектра этих культур, идентификацию и сравнение экспрессии биомаркеров основных экзопротеинов возбудителей чумы и холеры.

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

Авторы выражают благодарность лаборанту-исследователю Котовой Н.В. за практическую помощь при выполнении работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5(3):201–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2015-3-201-218.

2. Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А., Кравцов А.Л., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Подборонова Н.А., Клюева С.И., Шмелькова Т.П. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения. *Биотехнология*. 2005; 5:41–3.

3. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология холеры. Саратов; 1995. 69 с.

4. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеи-

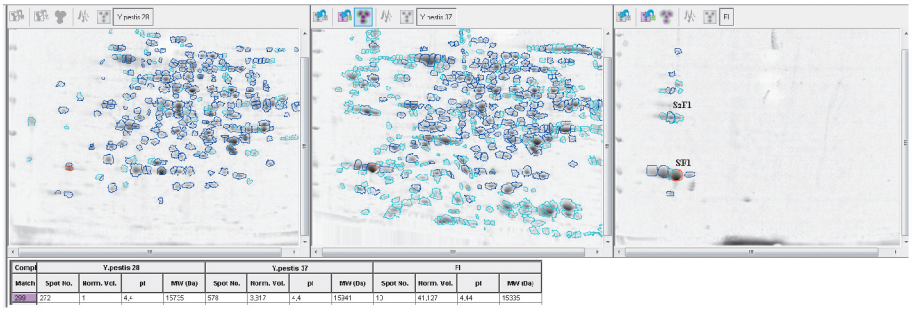


Рис. 3. «Белковые портреты» фракции экзопротеинов штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенного при 28 и 37 °C, на стрипах длиной 17 см с градиентом pH 4–7

новых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.

5. Полунина Т.А., Варшавская Ю.С., Заднова С.П., Краснов Я.М. Применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф*. 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

6. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одноэтапной гелевой фильтрации. В кн.: Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. Саратов; 1983. С. 37–41.

7. Шуколюков С.А. Нативный электрофорез в протеомике клетки: BN- и CN-PAGE. *Цитология*. 2011; 53(2):159–65.

8. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L., Friedlander A.M. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun*. 1996; 64(6):2180–7.

9. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

10. Bharati K., Ganguly N.K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:179–87.

11. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72:248–54.

12. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A., Gonzales A.D., Corzett C.H., Chang B.C., Fitch J.P., McCutchen-Maloney S.L. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol*. 2005; 187(23):8172–80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.

13. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* 1986; 30:1075–83.

14. Gill D.M. The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry*. 1976; 15:1242–8.

15. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:80–5.

16. Mekalanos J.J. Production and purification of cholera toxin. *Methods Enzymol*. 1988; 165:169–75.

17. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the F1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(9):3381–5. DOI: 10.1128/JB.01840-07.

18. Spanglert B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(4):622–47.

19. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed. Sci.* 1990; 1(4):391–6.

References

1. Kadnikova L.A., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Capsular antigen of plague microbe]. *Infektsiya i Immunitet.* 2015; 5(3):201–18. DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2015-3-201-218.

2. Kireev M.N., Taranenko T.M., Khramchenkova T.A., Kravtsov A.L., Guseva N.P., Polunina T.A., Podboronova N.A., Klyueva S.I., Shmel'kova T.P. [Structural-functional properties of capsular antigen F1 preparations during the storage process]. *Biotekhnologiya*. 2005; 5:41–3.

3. Naumov A.V., Ledvanov M.Yu., Drozdov I.G. [Cholera Immunology]. Saratov; 1995. 69 p.

4. Osterman L.A. [Methods of Investigation of Proteins and Nucleic Acids: Electrophoresis and Ultracentrifugation (Practice Guidelines)]. M.: "Nauka"; 1981. 288 p.

5. Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. [Application of 2D- electrophoresis for the construction of "protein profiles" of bacterial cultures lysates of particularly dangerous infections agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

6. Serdobintsev L.N., Taranenko, T.M., Verenkov M.S., Naumov A.V. [Production of capsular antigen using single-stage gel filtration]. In: [Problems of Prophylaxis of Natural-Focal Infections]. Saratov; 1983. P. 37–41.

7. Shukolyukov S.A. [Native electrophoresis in cell proteomics: BN- and SN-PAGE]. *Tsitologiya*. 2011; 53(2):159–65.

8. Andrews G.P., Heath D.G., Anderson G.W., Welkos S.L., Friedlander A.M. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect. Immun*. 1996; 64(6):2180–7.

9. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E., Meyer E., Meyer K.F. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of the *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.* 1952; 68(2):131–45.

10. Bharati K., Ganguly N.K. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:179–87.

11. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72:248–54.

12. Chromy B.A., Choi M.W., Murphy G.A., Gonzales A.D., Corzett C.H., Chang B.C., Fitch J.P., McCutchen-Maloney S.L. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J. Bacteriol*. 2005; 187(23):8172–80. DOI: 10.1128/JB.187.23.8172-8180.2005.

13. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiol. Immunol.* 1986; 30:1075–83.

14. Gill D.M. The arrangement of subunits in cholera toxin. *Biochemistry*. 1976; 15:1242–8.

15. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:80–5.

16. Mekalanos J.J. Production and purification of cholera toxin. *Methods Enzymol*. 1988; 165:169–75.

17. Runco L.M., Myrczek S., Bliska J.B., Thanassi D.G. Biogenesis of the F1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 2008; 190(9):3381–5. DOI: 10.1128/JB.01840-07.

18. Spanglert B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 1992; 56(4):622–47.

19. Vorontsov E.D., Dubichev A.G., Serdobintsev L.N., Naumov A.V. Association-dissociation processes and supermolecular organization of the capsule antigen (protein F1) of *Yersinia pestis*. *Biomed. Sci.* 1990; 1(4):391–6.

Authors:

Polunina T.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Полунина Т.А., Заднова С.П., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 20.06.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:45–49. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49**

УДК 616.98:579.842.23

Е.В.Сазанова, А.Н.Малахаева, Т.А.Малюкова, А.В.Бойко, Е.Г.Булгакова, Ю.А.Попов

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЧУМНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ АВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS*

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

Биологический метод исследования регламентирован при лабораторной диагностике чумы. Освоение данного метода специалистами в рамках дополнительного профессионального образования связано с использованием на практических занятиях вирулентных штаммов *Yersinia pestis* и вакцинного штамма *Y. pestis* линии EV, который, обеспечивая биобезопасность, не позволяет изучить типичную патоморфологическую картину на биомоделях, а также выделить микроорганизмы из внутренних органов. **Цель.** Подбор авирулентных штаммов *Y. pestis* и сравнительный анализ способов моделирования с их помощью чумы на биомоделях. **Материалы и методы**. В работе использованы штаммы *Y. pestis*. Вирулентность оценивали *in vitro* (полимеразная цепная реакция) и *in vivo* (показатель LD_{50} на белых мышах). **Результаты и выводы.** Предложены авирулентные штаммы *Y. pestis,* перспективные в качестве учебных для освоения биологического метода лабораторной диагностики чумы, и способ их применения для моделирования чумы у биомоделей. Предложенный подход позволяет слушателям курсов дополнительного профессионального образования освоить в полном объеме биологический метод исследования чумы, повышая обеспечение биобезопасности практических занятий и сокращая сроки выделения и накопления чистой культуры бактерий.

Ключевые слова: биологическая безопасность, подготовка специалистов, биологический метод исследования, возбудитель чумы, учебные штаммы, лабораторная диагностика чумы.

Корреспондирующий автор: Сазанова Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Sazanova, A.N.Malakhaeva, T.A.Malyukova, A.V.Boiko, E.G.Bulgakova, Yu.A.Popov

Plague Infection Simulating in Case of Inoculation with Avirulent *Yersinia pestis* Strains

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

Biological method of investigation is specified for the laboratory diagnostics of plague. Mastering of this method by the trainees within the frames of further vocational education is associated with the use of avirulent *Yersinia pestis* strains and vaccine *Y. pestis* strain EV line, which while providing safety does not allow for typical pathomorphological pattern on biomodels, as well as for isolation of microorganisms from internal organs. **Objective** of the study is to select avirulent *Yersinia pestis* strains and to conduct comparative analysis of the simulation techniques for plague on biomodels. **Materials and methods**. Utilized were *Y. pestis* strains. Virulence was evaluated both, *in vitro* (polymerase chain reaction) and *in vivo* (LD_{50} for white mice). **Results and conclusions.** Set forward have been avirulent *Y. pestis* strains, prospective in terms of mastering biological method of laboratory diagnostics of plague, and means of their application for simulating plague in biomodels. The designed approach allows for exercising biological methods of plague investigation to the fullest extent, enhancing biological safety of practical studies and reducing the time line for isolation and accumulation of pure bacterial culture.

Key words: biological safety, specialists training, biological method of investigation, plague agent, training strains, laboratory diagnostics of plague.

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

Corresponding author: Elena V. Sazanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Sazanova E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., Popov Yu.A. Plague Infection Simulating in Case of Inoculation with Avirulent *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:45–49. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-45-49

В схеме лабораторной диагностики чумы биологический метод является обязательным на этапах индикации, выделения и накопления бактериальной культуры [6, 8]. Традиционно освоение биологического метода исследования на практических занятиях по подготовке специалистов в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» проводят с использованием вирулентных штаммов *Y. pestis* (I группа патогенности). Это позволяет наблюдать клинические проявления чумы у зараженных животных, типичные патоморфологические изменения в подкожной клетчатке и внутренних органах, выделять бактериальную культуру путем посева на питательные среды проб паренхиматозных органов.

Однако слушатели курсов дополнительного профессионального образования зачастую не имеют должного опыта выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с правилами биологической безопасности, что повышает риск аварий и/или лабораторных заражений. Это обусловливает необходимость исключения или максимально возможного сокращения использования в технологических процессах вирулентных штаммов микроорганизмов в том числе в процессе обучения, согласно концепции «Основы государственной политики в области

обеспечения химической и биологической безопасности РФ на период до 2025 года и дальнейшую перспективу». Снижения риска инфицирования добивались путем использования на практических занятиях авирулентных штаммов *Y. pestis,* LD_{50} которых для белых мышей составляет более $1 \cdot 10^6$ м.к. [6]. Вместе с тем, многолетний опыт применения вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (III группа патогенности, LD_{50} $>10^9$ м.к.) свидетельствует об отсутствии типичной клинической и патоморфологической картины чумы у лабораторных животных, а также о нестабильности выделения чумного микроба из паренхиматозных органов [7]. Таким образом, применение вакцинного штамма целесообразно с позиции обеспечения биобезопасности практических занятий, но недостаточно эффективно для моделирования чумы у лабораторных животных и реализации учебного плана.

Цель работы – подобрать авирулентные штаммы *Y. pestis* и провести сравнительный анализ способов моделирования с их помощью чумы на лабораторных животных.

Материалы и методы

В работе использованы 19 штаммов *Y. pestis,* отобранных по данным паспортов из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» как перспективные для учебных целей. Основными критериями [10] отбора для штаммов *Y. pestis*, планируемых к применению с целью освоения биологического метода лабораторной диагностики чумы, являлись ослабленная вирулентность или авирулентность, способность формировать типичные для чумы патоморфологические изменения в организме биопробного животного и стабильность выделения бактериальной культуры при посеве методом отпечатков проб внутренних органов на плотные питательные среды.

Вирулентность штаммов *in vitro* оценивали по наличию генетических детерминант патогенности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием коммерческой тест-системы «Ген *Yersinia pestis* идентификация – РГФ», вирулентность *in vivo* – по показателю LD_{50} для морских свинок и беспородных белых мышей [2, 6]. Белых мышей заражали подкожно в объеме 0,2 мл дозами от $1 \cdot 10^9$ до 20 м.к. На каждую дозу брали по шесть белых мышей. Заданным требованиям отвечали четыре штамма *Y. pestis,* вирулентность которых не превышала $1 \cdot 10^8$ м.к. В дальнейшем эти штаммы исследовали на морских свинках, заражая по 0,5 мл подкожно дозами от $1 \cdot 10^9$ до $1 \cdot 10^4$ м.к. На каждую дозу брали по две морских свинки. За животными наблюдали в течение 14 дней от момента заражения. Всех павших и умерщвленных лабораторных животных вскрывали, регистрировали патоморфологическую картину и проводили посев паренхиматозных органов (легких, печени, селезенки) на агар Хоттингера, pH 7,2, с целью выделения, накопления чистой бактериальной культуры и подтверждения ее тождества с использованной для заражения.

Моделирование инфекционного процесса проводили путем заражения лабораторных животных авирулентными штаммами *Y. pestis* в сочетании с: 1 % раствором $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; дефибринированной кровью барана. Животных заражали внутрибрюшинно 1 % раствором препарата железа со взвесью испытуемого штамма *Y. pestis* в объемах 1:1, вводя 0,5 мл. Взвесь использовали в дозах $1 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^6$ м.к., заражая по четыре белых мыши. Аналогично проводили заражение в сочетании с дефибринированной кровью барана. За животными наблюдали в течение 10 дней. Павших животных вскрывали, изучали патоморфологическую картину и проводили посев паренхиматозных органов на агар Хоттингера, pH 7,2. Посевы инкубировали в течение 5 дней при температуре (28±1) °С с ежедневным их просмотром. Выживших животных умерщвляли гуманным способом с помощью паров хлороформа, вскрывали и изучали, как описано выше. При работе с животными следовали Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123, г. Страсбург, 18.03.1986).

Результаты и обсуждение

Проявлению вирулентных свойств возбудителя чумы способствуют наличие в геноме трех неконъюгативных плазмид (pCad, pFra и pPst) и хромосомного острова высокой патогенности, включающего область пигментации *pgm*. Гены, расположенные на плазмиде pCad и хромосомном острове высокой патогенности, являются основными генетическими факторами вирулентности возбудителя чумы.

ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis* позволил дифференцировать их на 5 геновариантов (табл. 1) и сделать предположение о сниженной вирулентности для 6 штаммов (отсутствие либо pCad, либо Pgm), а также об авирулентности для 11 штаммов (отсутствие pCad и Pgm). В результате было отобрано 17 штаммов для оценки вирулентности *in vivo* по показателю LD_{50} с применением следующих критериев: вирулентные штаммы имеют показатель LD_{50}>5–10 м.к., слабовирулентные – LD_{50}>$1 \cdot 10^5$ м.к., авирулентные – LD_{50}>$1 \cdot 10^6$ м.к. при подкожном заражении белых мышей [5]. В результате 4 штамма были охарактеризованы как вирулентные, 13 – как авирулентные (табл. 1).

Нами установлено, что при заражении штаммами *Y. pestis* М-1813, 100Р6(36М5), 780 (К-1) и 707 «Касуга» животные погибали только при дозах 10^9 и 10^8 м.к. При этом у павших животных отмечали типичные для чумы патоморфологические изменения. Из всех внутренних органов на питательных средах была выделена культура *Y. pestis*.

В итоге эти штаммы определены как перспек-

Таблица 1

Показатель вирулентности штаммов *Y. pestis*

Наименование штамма	Геноварианты	Величина LD_{50}, м.к.	
		белые мыши	морские свинки
Y. pestis 835 «РВС»	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$2{,}15 \cdot 10^3$	-
Y. pestis 400 (290)	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$1 \cdot 10^4$	-
Y. pestis 6483 АМО	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$4{,}64 \cdot 10^5$	-
Y. pestis 471 Овсептика	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$4{,}64 \cdot 10^5$	-
Y. pestis 652 «Гризель»	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$2{,}15 \cdot 10^6$	-
Y. pestis 7896	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^+$	$3{,}16 \cdot 10^7$	-
Y. pestis М-1815	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$6{,}81 \cdot 10^7$	-
Y. pestis М-1814	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$1{,}47 \cdot 10^8$	-
Y. pestis 100Р6(36М5)	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$1{,}47 \cdot 10^8$	$>10^9$
Y. pestis 780 (К-1)	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$2{,}15 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
Y. pestis М-1813	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$1 \cdot 10^8$	$>10^9$
Y. pestis 22 (22)	$pPst^- pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$>10^9$	-
Y. pestis 14/44	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$>10^9$	-
Y. pestis 707 Касуга	$pPst^+ pFra^+ pCad^- Pgm^-$	$1 \cdot 10^9$	$>10^9$
Y. pestis 521 (2101)	$pPst^+ pFra^+ pCad^+ Pgm^-$	$>10^9$	-
Y. pestis КМ 260 (5)	$pPst^+ pFra^+ pCad^- Pgm^+$	$>10^9$	-
Y. pestis КМ-130 (3)	$pPst^- pFra^+ pCad^- Pgm^-$	$>10^9$	-

Примечание: «-» животных в эксперимент не брали.

тивные для моделирования инфекционного процесса у белых мышей. Учитывая вероятность избирательной чувствительности лабораторных животных к *Y. pestis* был определен показатель LD_{50} для отобранных штаммов на высоковосприимчивых биомоделях – морских свинках. Установлено, что штаммы для них авирулентны.

Моделирование чумы с помощью авирулентных штаммов сопровождалось развитием клинических симптомов и гибелью животных не ранее 72 ч от момента заражения. Соответственно появление видимых невооруженным глазом колоний *Y. pestis* на плотных питательных средах при посеве паренхиматозных органов регистрировали не ранее 5 сут с момента заражения животных.

Вторым этапом исследования был подбор оптимального способа искусственного повышения чувствительности лабораторных животных (белых мышей) к авирулентным штаммам возбудителя чумы, позволяющего сократить сроки и повысить эффективность выделения *Y. pestis* из организма биопробных животных.

Анализ литературы показал, что известны методы заражения лабораторных животных штаммами *Y. pestis* в сочетании с веществами, понижающими резистентность макроорганизма к чуме (морбиторами): кортизоном, гистамином, новоэмбихином, желтком куриного яйца, холерным экзотоксином и др. [1, 4, 5]. Известны методики внутримозгового заражения белых мышей [9], пассажа *Y. pestis* EV и штаммов со сниженной вирулентностью в организме высоковосприимчивых монгольских пищух [3] с целью повышения чувствительности к возбудителю чумы. Однако указанные методы имеют ограниченное практическое применение. Также известны исследования влияния солей железа на вирулентность штаммов возбудителя чумы [13]. Данный подход является наиболее органичным, связанным с естественным процессом жизнедеятельности возбудителя чумы [11, 12].

Для моделирования чумы нами использованы 4 отобранных авирулентных штамма и *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. При заражении лабораторных животных смесью сульфата железа с микробной взвесью в дозах $1 \cdot 10^9$–$1 \cdot 10^6$ м.к. отмечали: а) 100 % гибель на третьи сутки после заражения штаммами *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, М-1813, 100Р6(36М5); б) штамм 780 (К-1) вызвал гибель всех животных в течение 3 и 4 сут; в) заражение животных штаммом *Y. pestis* 707 «Касуга» дозами $1 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^7$ м.к. сопровождалось медленным развитием инфекционного процесса и отсутствием гибели животных (табл. 2).

При заражении лабораторных животных смесью дефибринированной крови барана со взвесями клеток *Y. pestis* М-1813 во всех концентрациях отмечена гибель биопробных животных уже на вторые и третьи сутки. Заражение смесью дефибринированной крови со взвесями *Y. pestis* 780 (К-1), *Y. pestis* EV лини НИИЭГ и *Y. pestis* 100Р6(36М5) вызывало гибель в течение 10 сут; со взвесью *Y. pestis* 707 «Касуга» – не вызвала гибели животных. Всех павших белых мышей вскрывали, регистрировали типичные для чумы патоморфологические изменения подкожной клетчатки и внутренних органов [6].

Установлено, что заражение штаммами *Y. pestis* 100Р6(36М5), М-1813 и 780 (К-1) в дозах $1 \cdot 10^9$ и $1 \cdot 10^8$ м.к. в комбинации с сульфатом железа обу-

Таблица 2

Оценка влияния морбиторов на чувствительность белых мышей к заражению штаммами *Y. pestis*

Срок гибели после заражения, сут	EV линии НИИЭГ				М-1813				100Р6(36М5)				780 (К-1)				707 «Касуга»			
	заражающая доза, м.к.				концентрация взвеси, м.к./мл				концентрация взвеси, м.к./мл				концентрация взвеси, м.к./мл				концентрация взвеси, м.к./мл			
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^9	10^8	10^7	10^6	10^9	10^8	10^7	10^6	10^9	10^8	10^7	10^6	10^9	10^8	10^7	10^6
Результаты заражения в смеси с 1 % раствором $FeSO_4 \cdot 7H_2O$																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	4/4*	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/3	4/1	4/2	4/3	4/1	4/0	4/0
4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/3	2/1	1/0	3/1	4/0	4/0
5–10	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	2/0	4/0	4/0
Результаты заражения в смеси с дефибринированной кровью барана																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/2	4/0	4/0	4/0	4/4	4/1	4/0	4/0	4/2	4/1	4/0	4/0	4/2	4/1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	2/2	4/1	4/1	4/0	0/0	3/3	4/4	4/4	2/2	3/2	4/1	4/0	2/2	3/2	4/1	4/2	4/0	4/0	4/0	4/0
4	0/0	4/0	3/2	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/1	4/0	0/0	1/0	3/1	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
5	0/0	3/2	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	2/1	4/0	0/0	1/0	2/0	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
6	0/0	1/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	4/1	0/0	1/0	2/0	2/0	4/0	4/0	4/0	4/0
7	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	1/1	2/0	2/1	4/0	4/0	4/0	4/0
8	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
9	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	3/0	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
10	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	3/3	0/0	0/0	2/0	1/0	4/0	4/0	4/0	4/0
Результаты заражения взвесями исследуемых штаммов																				
1	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
3	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
4	4/0	4/0	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/1	4/1	4/0	4/0
5	4/0	4/0	4/0	4/0	2/0	4/0	4/0	4/0	1/3	4/1	4/0	4/0	4/2	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
6	4/0	4/0	4/0	4/0	2/2	4/2	4/0	4/0	1/0	3/1	4/0	4/0	2/1	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
7	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	2/1	4/0	4/0	1/1	2/0	4/0	4/0	1/0	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
8	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	1/1	4/0	4/0	4/0	3/0	3/0	4/0	4/0
9	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	0/0	4/1	4/0	4/0	3/1	3/0	4/0	4/0
10	4/0	4/0	4/0	4/0	0/0	1/0	4/0	4/0	0/0	2/0	4/0	4/0	0/0	3/0	4/0	4/0	2/0	3/0	4/0	4/0

Примечание. Числитель – количество животных в опыте; знаменатель – количество павших животных в указанный срок.

словливало более яркую патоморфологическую картину в отличие от доз $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^6$ м.к. У павших животных, зараженных *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и 100Р6(36М5), отмечались признаки носового кровотечения. На вскрытии у животных, зараженных взвесью *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в дозе $1 \cdot 10^8$ м.к. в комбинации с дефибринированной кровью барана, отмечено образование очагов некроза в селезенке, а с взвесью *Y. pestis* 100Р6(36М5) в дозе $1 \cdot 10^8$ м.к. – очагов некроза в легких.

При посеве паренхиматозных органов лабораторных животных, зараженных штаммами *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, М-1813, 100Р6(36М5), 780 (К-1) в комбинации как с сульфатом железа, так и с дефибринированной кровью барана через 24 ч инкубации при температуре (28±1) °С отмечали обильный рост видимых невооруженным глазом типичных колоний возбудителя чумы. При посеве паренхиматозных органов лабораторных животных, зараженных смесью дефибринированной крови барана со взвесями штаммов *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, 100Р6(36М5) и 780 (К-1) в дозе $1 \cdot 10^6$ м.к., рост колоний из лимфатических узлов отсутствовал.

В результате заражения смесями взвесей *Y. pestis* 707 «Касуга» как с сульфатом железа, так и с дефибринированной кровью в организме лабораторных животных не формировались типичные для чумы патоморфологические изменения. Единичные колонии *Y. pestis* выделяли только при посеве проб печени, селезенки и крови при заражающей дозе $1 \cdot 10^9$ м.к.

Заражение лабораторных животных смесью 1 % раствора $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ с суспензиями клеток штаммов возбудителя чумы сокращало сроки развития инфекционного процесса в среднем в два раза, вызывал появление типичных, ярко выраженных патоморфологических изменений в органах павших живот-

ных, способствовало формированию в течение 24 ч (вместо 48 ч) инкубации при температуре (28±1) °С на плотной питательной среде видимых невооруженным глазом колоний при посеве органов павших биопробных животных, что ускорило выделение и накопление бактериальной культуры и проведение ее идентификации.

В результате проведенных исследований нами отобраны два штамма – *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) и *Y. pestis* EV линии НИИГЭ – перспективные в качестве учебных при освоении биологического метода лабораторной диагностики чумы.

Несмотря на утрату штаммом *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) области *pgm* (включая *hms* и *ybt* регионы), введение сульфата железа обеспечило развитие сепсиса, что ускорило течение инфекционного процесса и гибель животного. Вероятно, это связано с наличием у возбудителя чумы нескольких систем потребления железа. В случае утраты области *pgm* с генами иерсиниабактин-зависимой системы утилизации ионов трехвалентного железа происходит включение дублирующих систем связывания и транспорта железа в микробную клетку [14]. При введении дефибринированной крови барана, содержащей ионы железа в свободном и доступном виде вследствие механического повреждения эритроцитов, регистрировали более продолжительное течение инфекционного процесса до (10 сут) и гибель только части зараженных животных.

Таким образом, отобранные авирулентные штаммы *Y. pestis* М-1813 (770 Аст) и *Y. pestis* EV линии НИИЭГ позволяют в полном объеме овладеть биологическим методом лабораторной диагностики чумы, обеспечить биологическую безопасность учебного процесса, минимизируя вероятность лабораторного инфицирования обучающихся в процессе самостоятельной работы.

Оптимальным способом повышения чувствительности лабораторных животных к заражению авирулентными штаммами *Y. pestis* при моделировании типичной патоморфологической картины чумы и сокращения сроков выделения, накопления и идентификации выделенной бактериальной культуры является введение микробной взвеси в сочетании с сульфатом железа.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Брандзишевский Ю.В., Пономарев Н.Г., Тихомирова Л.А. Способ экспресс-диагностики авирулентных штаммов возбудителя чумы. Лабораторная диагностика, биохимия и специфическая профилактика чумы и холеры. Саратов; 1986. С. 14–8.

2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.

3. Дробышева Т.М. Повышение вирулентности у штамма чумного микроба ЕВ-5n7/443 в организме крольчонка и изучение его свойств. *Пробл. особо опасных инф*. 1971; 1(17):71–4.

4. Зильфян В.Н., Норамирян А.В. Влияние некоторых препаратов на чувствительность лабораторных животных к чумному микробу. *Известия АН Армянской ССР. Мед. науки.* 1961; 4:129–303.

5. Овасапян О.В., Галоян В.О. Применение кортизона и новоэмбихина при выделении возбудителя эризипелоида от белых мышей в эксперименте. *Тр. Армянской противочумной станции.* 1963; 2:295–301.

6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

7. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. МУ 3.3.1.1113-02. М.; 2002.

8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.2940-11. М.; 2011.

9. Руднев М.М. К вопросу о внутримозговом методе заражения белых мышей для ускоренной диагностики чумы. *Тр. Армянской противочумной станции.* 1963; 2:209–16.

10. Сазанова Е.В., Малюкова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения. *Пробл. особо опасных инф*. 2014; 3:38–41.

11. Bullen J.J. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis*. 1981; 3:1127–38.

12. Bullen J.J., Rogers H.J., Griffiths E. Role of iron in bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1978; 80:1–35.

13. Jackson S., Burrows T.W. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.

14. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.

References

1. Adamov A.K., Brandzishevsky Yu.V., Ponomarev N.G., Tikhomirova L.A. [Methods of express-diagnostics of avirulent plague agent strains]. In: [Laboratory Diagnostics, Biochemistry and Specific Prophylaxis of Plague and Cholera]. Saratov; 1986. P. 14–8.

2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: "Medgiz"; 1962. 180 p.

3. Drobysheva T.M. [Enhancement of the virulence in plague agent strain, EB-5n7/443, in the organism of a baby rabbit and investigation of its properties]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1971; 1(17):71–4.

4. Zil'fyan V.N., Noramiryan A.V. [Effect of certain preparations on sensitivity of laboratory animals to plague microbe]. *Izvestiya Akademii Nauk Armyanskoy SSR. Med. nauki.* 1961; 4:129–303.

5. Ovasapyan O.V., Galoyan V.O. [Use of cortisone and novembichinum in isolation of erysipeloid agent from white mice *in vitro*]. *Trudy Armyanskoy Protivochumnoy Stantsii.* 1963; 2:295–301.

6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.

7. [Basic requirements to vaccine strains of plague microbe]. MR 3.3.1.1113-02. M.; 2002.

8. [Organization and management of laboratory diagnostics of plague in territorial, regional and federal facilities]. MR 4.2.2940-11. M.; 2011.

9. Rudnev M.M. [On intracerebral inoculation of white mice for express diagnostics of plague]. *Trudy Armyanskoy Protivochumnoy Stantsii.* 1963; 2:209–16.

10. Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. [Dummy *Yersinia pestis* strains: selection criteria, usage guidelines]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:38–41.

11. Bullen J.J. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis*. 1981; 3:1127–38.

12. Bullen J.J., Rogers H.J., Griffiths E. Role of iron in bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1978; 80:1–35.

13. Jackson S., Burrows T.W. The virulence-enhancing effect of iron on non-pigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1956; 37(6):577–83.

14. Rakin A., Schneider L., Podladchikova O. Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:151. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00151.

Authors:

Sazanova E.V., Malakhaeva A.N., Malyukova T.A., Boiko A.V., Bulgakova E.G., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сазанова Е.В., Малахаева А.Н., Малюкова Т.А., Бойко А.В., Булгакова Е.Г., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.02.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:50–53. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-50-53**

УДК 616.928.8

Т.Е.Сизикова, В.Н.Лебедев, В.Б.Пантюхов, А.Ф.Андрус, С.В.Борисевич

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКЦИИ АРЕНАВИРУСОВ В ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

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

Семейство *Arenaviridae* представляет собой большую группу РНК-содержащих вирусов, геномная РНК которых состоит из двух сегментов и обладает амбисенсной стратегией кодирования. В ходе изучения молекулярно-биологических особенностей репродукции установлено, что при проникновении аренавирусов в клетку задействованы многочисленные молекулярные механизмы белкового взаимодействия. Проникновение аренавирусов в клетки инициируется взаимодействием вирусного гликопротеина с одним или несколькими рецепторами на поверхности клетки-хозяина. Главные клеточные факторы, задействованные в процессе проникновения филовирусов в клетки, это факторы прикрепления (α-дистрогликан для аренавирусов Старого Света и трансферриновый рецептор 1 человека для аренавирусов Нового Света), эндолизосомальные факторы клетки-хозяина (белок Неймана-Пика С1). В обзоре обобщены современные знания относительно роли структурных компонентов аренавирусов и некоторых клеточных факторов на патогенез заболеваний, вызываемых аренавирусами.

Ключевые слова: аренавирусы, геморрагическая лихорадка, проникновение вируса, механизмы вирулентности, эндоцитоз, факторы присоединения, сигнальные факторы, факторы клетки-хозяина.

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

T.E.Sizikova, V.N.Lebedev, V.B.Pantyukhov, A.F.Andrus, S.V.Borisevich

Molecular-Biological Peculiarities of Arenavirus Reproduction in Sensitive Cells

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

The *Arenaviridae* family consists of a large group of single strand ambisense RNA viruses that are separated phylogenetically, serologically and geographically into Old World and New World viruses. Recent studies indicate that cellular entry of arenaviruses requires a series of cellular protein interaction and molecular mechanisms. The arenaviruses entry into cells is initiated by the interaction of viral glycoprotein with one or more receptors on the surface of host cells. The main host cell factors that are involved in filovirus entry are attachment factors (α-dystroglycan for Old World and human transferrin receptor 1 for New World viruses), endolisosomal host cell factors (cathepsins B and L and Niemann-Pick C1 protein). The review presents the modern knowledge about the role of structural proteins of arenaviruses and some cell factors in pathogenesis of the diseases, caused by arenaviruses.

Key words: Arenaviruses, hemorrhagic fever, virus entry, virulence mechanisms, endocytosis, attachment factors, signaling factors, host cell factors.

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

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

Citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Pantyukhov V.B., Andrus A.F., Borisevich S.V. Molecular-Biological Peculiarities of Arenavirus Reproduction in Sensitive Cells. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:50–53. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-50-53

Семейство *Arenaviridae* представляет собой большую группу РНК-содержащих вирусов, геномная РНК которых состоит из двух сегментов и обладает амбисенсной стратегией кодирования. Аренавирусы разделяют на аренавирусы Старого Света и Нового Света. Это разделение основано на серологических и филогенетических критериях, а также по географическому положению эндемичных регионов [13].

В группу аренавирусов Старого Света входят вирусы Ласса, ЛХМ (лимфоцитарный хориоменингит), Луйо, Иппи, Луна, Мобала, Мопейя, Морогоро. Аренавирусы Нового света разделяют на 4 клада (клад А: вирусы Аллпахуйо, Флексал, Парана, Пичинде, Пиритал; клад В: вирусы Амапари, Чапаре, Купикси, Гуанарито, Хунин, Мачупо, Сабиа и Такарибе; клад С: вирусы Латино и Оливерос; клад D: вирусы BearCanyon и Тамиами) [19].

Аренавирусы включают широкий спектр патогенных для человека вирусов – от вируса лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ) до возбудителей особо опасных вирусных геморрагических лихорадок, таких как вирусы Ласса, Мачупо, Хунин, Луйо, Сабиа, Гуанарито и Чапаре.

Взаимодействие аренавирусов с чувствительными клетками включает в себя следующие этапы:

- адсорбция вируса на клетку;
- проникновение вируса в клетку в результате эндоцитоза;
- соединение вируса с эндосомами;
- выход вирусного рибонуклеопротеина в цитоплазму посредством pH-зависимого соединения с мембранами клетки, регулируемого вирусным гликопротеином GP2;
- процессы репликации, транскрипции, экспрессии вирусспецифичных белков в цитоплазме;

- процесс кэпирования 5′-концевых участков при формировании информационных РНК;

- расщепление предшественника гликопротеинов GPC на стабильный сигнальный пептид и гликопротеины GP1 и GP2, происходящее в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи инфицированных клеток;

- сборка вирионов и их отпочковывание через клеточную мембрану;

- формирование полноценных вирионов.

Процесс репродукции аренавирусов начинается с прикрепления и входа вируса в клетки. В настоящее время определены молекулярные механизмы, определяющие вирулентность аренавирусов и патогенез вызываемых ими геморрагических лихорадок. Важнейшим патогенетическим фактором является способность связывания гликопротеина аренавирусов с различными клеточными рецепторами. Аренавирусы Старого Света и аренавирусы Нового Света, относящиеся к кладу С, в качестве первичного рецептора используют α-дистрогликан [4, 24, 25].

Дистрогликан – это повсеместно экспрессируемый гликопротеин, который связывает клетки в экстрацеллюлярный клеточный матрикс. Он содержит две нековалентные субъединицы (α-дистрогликан и β-дистрогликан), которые играют различную роль в прикреплении вируса к клеткам и выполняемым клеточным функциям. α-дистрогликан представляет собой экстрацеллюлярную субъединицу, ассоциированную с такими белками экстрацеллюлярного клеточного матрикса, как ламинин, аргин, перлекан и нейроксины. В ходе вирусной инфекции субъединица вирусного гликопротеина (GP1) регулирует присоединение к α-дистрогликану что позволяет вирусным частицам проникать в эндосомы. β-дистрогликан не участвует в процессе связывания аренавирусов с клетками [11].

Установлено, что для связывания вирусов необходима посттрансляционная модификация α-дистрогликана. В эту модификацию включены многие клеточные энзимы, в том числе клеточная ацетилглюкозамин трансфераза, протеин-О-маннозил трансфераза, протеин-О-манноза трансфераза, фукутин и родственные им белки [21]. В исследованиях, проведенных с вирусом ЛХМ, выявлено, что при инфицировании *in vivo* гликозилирование не является критическим моментом для развития инфекции. Однако это может происходить вследствие наличия *in vivo* компенсационных механизмов или использования вирусом альтернативных рецепторов [9].

Вирусы Ласса и ЛХМ связываются с N- и С-терминальными участками α-дистрогликана в области, перекрывающейся с участком связывания ламинина, что позволяет предположить, что эти вирусы конкурируют с ламинином за связывание с α-дистрогликаном [10, 11]. Следует отметить, что в процессе инфицирования клеток аренавирусами Старого Света прекращается регулирование клеточной мембраны α-дистрогликаном, поскольку экспрессия его предшественника не изменяется. Данный процесс регулируется вирусным гликопротеином, который препятствует взаимодействию дистрогликана и ацетилглюкозамин трансферазы в аппарате Гольджи, что препятствует процессу гликозилирования α-дистрогликана. Вероятно, данный процесс необходим для выхода вируса из клетки, но не для проникновения в нее [21, 22].

Именно степень связывания гликопротеина с α-дистрогликаном определяет различия между аттенуированными и вирулентными штаммами одного и того же вируса. Эти различия могут определяться единичными аминокислотными заменами [23].

Аренавирусы Нового Света, относящиеся к кладу В, в качестве рецептора для входа в клетки используют трансферриновый рецептор 1 [15, 20]. Пять вирусов из этого клада (Мачупо, Хунин, Сабиа, Гуанарито и Чапаре) могут вызывать геморрагические лихорадки благодаря своей способности связывания с человеческим трансферриновым рецептором 1. В противоположность этому, другие три вируса из клада В (Такарибе, Амапари и Купикси) являются непатогенными для человека в силу своей неспособности осуществлять указанное связывание. За исключением пяти вышеперечисленных, все аренавирусы Нового Света, относящиеся к кладам А и В, в качестве рецептора могут использовать только трансферриновый рецептор 1 грызунов [16, 28].

При изучении стадии внедрения вируса Луйо в чувствительные клетки показано, что данный возбудитель в качестве рецепторов не использует ни трансферриновый рецептор 1, ни α-дистрогликан. Гликопротеин вируса Луйо для проникновения через клеточную мембрану в клетку использует неидентифицированный рецептор. Установлено, что инфекционность вируса Луйо снижается в клетках, дефектных по белку Неймана-Пика, что указывает на необходимость данного белка для продуктивной инфекции [3, 26]. Репликация генома аренавируса происходит в цитоплазме инфицированных клеток. При этом аренавирусы продуцируют три вида РНК: геномную «минус» РНК; антигеномную «плюс» РНК; вирусную информационную РНК.

В то время как геномная «минус» РНК и антигеномная «плюс» РНК транскрибируются как полноразмерные РНК, вирусные информационные РНК транскрибируются с соответствующего промотора и терминируются высокоструктурированной межгенной областью. В соответствии с амбисенсной стратегией кодирования, информационные РНК, кодирующие белки нуклеопротеина и РНК-зависимой РНК-полимеразы, транскрибируются с геномной РНК, а информационные РНК, кодирующие белки гликопротеина и цинксвязывающий белок, транскрибируются с антигеномной РНК. Важно отметить, что белки NP и L необходимы для регулирования процессов транскрипции и репликации [8].

Белок гликопротеина аренавирусов образуется вследствие посттрансляционного расщепления.

Предшественник гликопротеина подвергается расщеплению в результате воздействия стабильного сигнального пептида. Образовавшийся полипептид G1/G2 расщепляется в эндоплазматическом ретикулуме при воздействии клеточного сигнального пептида. Гликопротеины G1 и G2 содержат несколько участков гликозилирования, которые являются необходимыми для осуществления белками своих функций [18]. В частности, гликопротеин вируса Ласса содержит шесть участков гликозилирования [5].

Подобно большинству вирусов с геномной «минус» РНК, сборка вириона регулируется матричными белками, содержащими аминокислотные последовательности, включающие в себя участки: пролин-пролин-X-тирозин, пролин-треонин-серин-аланин-пролин, тирозин-X-X-лейцин, Q-пролин-X-валин, где X- любая аминокислота, Q- гидрофобная аминокислота [2, 6]. Важную роль в процессе сборки играет цинк-связывающий белок. Большинство аминокислотных последовательностей цинк-связывающего белка аренавирусов Нового Света содержат участки пролин-треонин-серин-аланин-пролин и тирозин-X-X-лейцин, а соответствующие последовательности для аренавирусов Старого Света содержат последовательность пролин-пролин-X-тирозин [23].

Взаимодействия между белком Z и другими вирусными и клеточными белками играют важную роль в процессе сборки вириона и выходе вириона через клеточную мембрану [12].

Первичными клетками-мишенями при аренавирусной инфекции являются макрофаги и дендритные клетки. Патогенные и непатогенные для человека аренавирусы по-разному ингибируют макрофаги человека, но все они ингибируют дендритные клетки [23]. Вирусы Ласса и Мопейя способны инфицировать первичные макрофаги человека и дендритные клетки, но патогенный для человека вирус Ласса не активирует эти клетки в процессе инфицирования, а непатогенный вирус Мопейя активирует эти клетки, что проявляется в повышении уровня экспрессии маркеров CD86, CD80 и α-интерферона [17]. Аналогичным образом первичные макрофаги человека показывают более высокий уровень продукции интерлейкина-6, интерлейкина-10 и α-интерферона при инфицировании вирусом Такарибе по сравнению с инфицированием патогенным для человека вирусом Хунин [7]. Показано, что Z-белок всех известных патогенных аренавирусов, в отличие от непатогенных, способен ингибировать активацию макрофагов [27]. Поскольку макрофаги и дендритные клетки являются антигенпрезентирующими клетками, играющими важную роль в формировании иммунного ответа, ингибирование этих клеток приводит к иммунной супрессии, которая во многом определяет патогенез вирусных геморрагических лихорадок [13].

Рассматривая роль отдельных структурных белков в патогенезе аренавирусов следует отметить, что вирусный гликопротеин определяет аффинность к клеточным рецепторам, а повышение аффинности приводит к возрастанию вероятности адсорбции вируса на клетку. Показано, что авирулентный штамм вируса ЛХМ способен замещать ламинин при связывании с рецепторами клеток.

Следует отметить, что инфекция, вызванная аренавирусами Старого Света, является следствием регулирования продукции α-дистрогликана за счет ингибирования экспрессии предшественника дистрогликанов, которую осуществляет именно гликопротеин аренавирусов.

Роль белка нуклеопротеина аренавирусов проявляется в его участии в ингибировании иммунного ответа хозяина. В частности, вирусы Ласса, ЛХМ, Мачупо, Хунин ингибируют образование β-интерферона [23]. Этот эффект ассоциирован с экзорибонуклеазной активностью С-концевого участка данного белка. Такой же способностью (правда, выраженной в меньшей степени) обладает белок Z аренавирусов Нового, но не Старого Света [13].

Известно, что атрибутом аренавирусных геморрагических лихорадок является высокий уровень вирусемии. Основной детерминантой вирулентности является способность вируса к репродукции. Этот процесс в основном определяет функциональная активность белка L. Установлено, что единственная аминокислотная замена в положении 1079 белка L определяет различия в скорости репродукции вирулентного (C113) и аттенуированного (ARM) штаммов вируса ЛХМ [1].

Замена аминокислот в позиции 260 (при наличии замены в позиции L1079) может привести к повышению скорости репродукции вируса ЛХМ в клетках [13, 14].

Белок Z аренавирусов в инфицированных клетках взаимодействует с клеточным промиелоцитным лейкемическим белком, который при нормальных условиях локализуется в клеточном ядре. При аренавирусной инфекции происходит выход данного белка в цитоплазму, этот процесс ингибирует клеточный апоптоз [13].

Белок Z также выполняет функции иммуносупрессора. Белок Z патогенных для человека аренавирусов ингибируют рецепторы, индуцирующие образование интерферона [27]. Процесс ингибирования осуществляется в результате взаимодействия N-концевой последовательности белка Z (31 аминокислотный остаток) и N-концевой последовательности соответствующего рецептора, что затрудняет связывание последнего с митохондриальным сигнальным белком. Последний приводит к повышению уровня репродукции аренавирусов в макрофагах. Рассмотренный механизм является общим для патогенных для человека аренавирусов.

Таким образом, механизм репродукции аренавирусов Старого и Нового Света в чувствительных клетках в общих чертах является одинаковым, однако следует обратить внимание на его отличительные особенности. Так, при адсорбции вируса на клетку задействованы различные рецепторы (для аренави-

русов Старого Света и аренавирусов Нового Света, относящихся к кладу С – α-дистрогликан, для аренавирусов Нового Света, относящихся к кладу В – трансферриновый рецептор 1). Проникновение вируса в клетку в результате эндоцитоза для аренавирусов Нового Света является клатрин-зависимым, для аренавирусов Старого Света – клатрин-независимым. Аренавирусы Нового Света соединяются как с ранними, так и со зрелыми эндосомами, аренавирусы Старого Света с ранними эндосомами не соединяются [23].

Современные знания структурных компонентов аренавирусов и некоторых клеточных факторов, влияющих на патогенез аренавирусных заболеваний, позволяет их использовать для разработки эффективных средств профилактики и лечения.

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

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergthaler A., Flatz L., Hegazy A.N., Johnson S., Horvath E., Löhning M., Pinschewer D.D. Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(50):21641–6. DOI: 10.1073/pnas.1011998107.

2. Bieniasz P.D. Late binding domains and host protein in the envelope virus release. *Virology*. 2006; 344(1):55–63. DOI:10.1016/j.virol.2005.09.044.

3. Briese T., Paweska J.T., McMullan L.K. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever associated arenavirus from Southern Africa. *PLoS pathogens*. 2009; 5(5):1–8. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000455.

4. Cao W., Henry M.D., Borrow P., Yamada H., Elder J.H., Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W., Campbell K.P., Oldstone M.B. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science*. 1998; 282(5396):2079–81. DOI: 10.1126/science.282.5396.2079.

5. Eichler R., Lenz O., Garten W., Strecker T. The role of single N-glycans in proteolitic processing and sell surface transport of Lassa virus glycoprotein GPC. *J. Virol.* 2006; 3:41–50. DOI: 10.1186/1743-422x-3-41.

6. Freed E.O. Viral late domains. *J. Virol*. 2002; 76(10):4679–87. DOI: 10.1128/jvi.76.10.4679-4687.2002.

7. Groseth A., Hoenen T., Weber M., Wolff S., Herwig A., Kaufmann A., Becker S. Tacaribe virus but not Junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(5):1–10. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001137.

8. Hass M., Gölnitz U., Müller S., Becker-Ziaja B., Günther S. Replicon system for Lassa virus. *J. Virol*. 2004; 78(24):13793–803. DOI: 10.1128/jvi.78.24.13793-13803.2004.

9. Imperiali M., Sporri R., Hewitt J., Oxenius A. Post-translational modification of alpha-dystroglycan is not critical for lymphocitic choriomeningitis virus receptor function *in vivo*. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(11):2713–22. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004721-0.

10. Kunz S., Sevilla N., McGavern D.B., Campbell K.P., Oldstone M.B. Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor alpha-dystroglycan. *J. Cell. Biol.* 2001; 155(2):301–10. DOI: 10.1083/jcb.200104103.

11. Kunz S., Rojek J.M., Perez M., Spiropoulou C.F., Oldstone M.B. Characterization of Lassa fever virus infection with its cellular receptor alpha-dystroglycan. *J. Virol.* 2005; 79(10):5979–87. DOI: 10.1128/JVI.79.10.5979-5987.2005.

12. Loureiro M.E., D′Antuono A., Levingston J.M., Lopez N. Uncovering viral protein-protein interactions and their role in arenavirus life cicle. *Viruses.* 2012; 4(9):1651–67. DOI:10.3390/v4091651.

13. McLay L., Ansary A., Liang Y., Ly H. Targeting virulence mechanisms for the prevention and therapy of arenaviral hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2013; 97(2):81–92. DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.12.003.

14. McLay L., Lan S., Ansari A., Liang X., Ly H. Identification of virulence determinants within the L genomic segment of the Pichinde arenavirus. *J. Virol.* 2013; 87(12):6635–43. DOI: 10.1128/jvi.00044-13.

15. McLay L., Liang Y., Ly H. Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenaviruses. *J. Gen Virol.* 2014; 95(1):1–15. DOI: 10.1099/vir.0.057000-0.

16. Milazzo M.L., Campbell G.L., Fulhorst C.F. Novel arenavirus infection in humans, US. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(8):1417–20. DOI: 10.3201/eid1708.110285.

17. Pannetier D., Faure C., Georges-Courbot M.C., Deubel V., Baize S. Human macrophages, but not dendritic cells, are activated and produce alpha/beta interferons in response to Mopeia virus infection. *J. Virol.* 2004; 78(19):10516–24. DOI: 10.1128/jvi.78.19.10516-10524.2004.

18. Parsy M., Harlos K., Huiskonen J.T., Bowden T.A. Crystal structure of Venezuelan hemorrhagic fever virus fusion glycoprotein reveals a class 1 postfusion architecture with extensive glycosylation. *Virology*. 2013; 87(23):13070–5. DOI: 10.1128/jvi.02298-13.

19. Radoshitzky S.R., Bào Y., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clawson A.N., Clegg C.S., DeRisi J.L., Emonet S., Gonzalez J.P., Kuhn J.H., Lukashevich I.S., Peters C.J., Romanowski V., Salvato M.S., Stenglein M.D., de la Torre J.C. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* 2015; 160(7):1851–74. DOI: 10.1007/s00705-015-2418-y.

20. Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., Spiropoulo C.F., Albariño C.G., Nguyen D.P., Salazar-Bravo J., Dorfman T., Lee A.S., Wang E., Ross S.R., Choe H., Farzan M. Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105(7):2664–9. DOI: 10.1073/pnas.0709254105.

21. Rojek J.M., Spiropoulou C.F., Campbell K.P., Kunz S. Old World and Clade C New World arenaviruses mimic the molecular mechanism of receptor recognition used by alpha-dystroglycans host-derived ligands. *J. Virol.* 2007; 81(11):5685–95. DOI: 10.1128/jvi.02574-06.

22. Rojek J.M., Campbell K.P., Oldstone M.B., Kunz S. Old World arenavirus infection interferes with the expression of functional α-dystroglycan in the host cell. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18(11):4493–507. DOI: 10.1091/mbc.E07-04-0374.

23. Shao J., Liang Y., Ly H. Human hemorrhagic fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis. *Pathogens*. 2015; 4(12):283–306. DOI: 10.3390/pathogens4020283.

24. Shattner M., Rivadeneyra L., Pozner R.G., Gomer R.M. Pathogenic mechanisms involved in the hematological alterations of arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *Viruses*. 2013; 5(1):340–51. DOI:10.3390/v5010340.

25. Spiropoulou C.F., Kunz S., Rollin P.E., Campbell K.P., Oldstone M.B. New world arenavirus Clade C, but not Clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J. Virol*. 2002; 76(10):5140–6. DOI: 10.1128/jvi.76.10.5140-5146.2002.

26. Tani H., Iha K., Shimojima M., Fukushi S., Taniguchi S., Yoshikawa T., Kawaoka Y., Nakasone N., Ninomiya H., Saijo M., Morikawa S. Analysis of Lujo virus cell entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J. Virol*. 2014; 88(13):7317–30. DOI: 10.1128/jvi.00512-14.

27. Xing J., Ly H., Liang Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-i-like receptor-dependent interferon production. *J. Virol*. 2015, 89(5):2944–55. DOI: 10.1128/jvi.03349-14.

28. Zong M., Fofana I., Choe H. Human and host species transferring receptor 1 use by North American areneviruses. *J. Virol.* 2014, 88:9418–28. DOI: 10.1128/jvi.01112-14.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 05.07.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:54–57. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-54-57**

УДК 616.932:579.61

Е.Ю.Щелканова, Е.Ю.Агафонова, Л.Ф.Ливанова, Д.А.Агафонов, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИИ ПРОФАГА CTXφ НА ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, СВЯЗАННЫХ С ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ И ПЕРСИСТЕНТНОСТЬЮ

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

Цель работы. Изучить влияние делеции профага CTXφ, несущего гены *ctxAB*, на изменение фенотипических свойств, связанных с патогенностью или формированием биопленки, у нетоксигенных мутантов. **Материалы и методы**. В работе использовали клинические штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и их спонтанные нетоксигенные мутанты, утратившие профаг CTXφ. Применены микробиологические и биохимические методы, а также заражение модельных животных (крольчат) клетками исследуемых штаммов. **Результаты и выводы**. Представлены результаты сравнительного анализа фенотипических свойств изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, утративших профаг CTXφ, кодирующий холерный токсин. Установлено, что делеция профага CTXφ приводит к одновременному изменению у спонтанных нетоксигенных мутантов нескольких фенотипических свойств, связанных с вирулентностью (колонизирующей способности, продукции растворимой гемагглютинин/протеазы, термолабильного гемолизина/цитолизина) и формированием биопленки (подвижности, биосинтеза экзополисахарида). Высказано предположение, что причиной указанных фенотипических изменений мутантов могли быть изменения активности связанных между собой регуляторных генов, контролирующих вирулентность и процесс образования биопленки у возбудителя холеры.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, профаг CTXφ, делеция, фенотипические свойства.

Корреспондирующий автор: Смирнова Нина Ивановна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.Yu.Shchelkanova, E.Yu.Agafonova, L.F.Livanova, D.A.Agafonov, Yu.V.Lozovsky, N.I.Smirnova

Effect of the Prophage CTXφ Deletion upon Phenotypic Properties in Strains of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor, Associated with Virulence and Persistence

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

Objective of the study is to evaluate the influence of CTXφ prophage deletion, which carries *ctxAB* genes, on phenotypical properties associated with pathogenicity or biofilm formation in non-toxigenic mutants. **Materials and methods.** Utilized have been the clinical strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor and their spontaneous non-toxigenic mutants that lost CTXφ prophage. Applied have been microbiological and biochemical methods, inoculation of model animals with cells of the strains under study. **Results and conclusions.** The results of comparative analysis of phenotypic properties in isogenic toxigenic and non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, which lost CTXφ prophage encoding the cholera toxin, are represented. It is established that the deletion of CTXφ prophage leads to the simultaneous change of several phenotypic properties associated with virulence (colonizing ability, production of soluble hemagglutinin/protease and heat labile hemolysin/cytolysin) and biofilm formation (motility, exopolysaccharide biosynthesis) in spontaneous non-toxigenic mutants. It is suggested that the reason for these phenotypic changes in the mutants might be the changes in activity of the related to each other regulatory genes controlling virulence and biofilm formation process in cholera agent.

Key words: *Vibrio cholerae,* CTXφ prophage, deletion, phenotypic properties.

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

Corresponding author: Nina I. Smirnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Shchelkanova E.Yu., Agafonova E.Yu., Livanova L.F., Agafonov D.A., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Effect of the Prophage CTXφ Deletion upon Phenotypic Properties in Strains of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor, Associated with Virulence and Persistence. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:54–57. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-54-57

Холера остается одной из важнейших проблем для стран Азии, Африки и Южной Америки, на территории которых сформированы эндемичные очаги. Регистрируемые на территории России локальные вспышки и спорадические случаи холеры обусловлены завозом этой инфекции из эндемичных регионов [1, 7]. На протяжении последней седьмой пандемии возбудитель холеры претерпевал различные изменения фено- и генотипа. Современный период текущей пандемии (с 1991 г. по настоящее время) характеризуется широким распространением на эндемичных по холере территориях генетически измененных штаммов (геновариантов) *V. cholerae* биовара Эль Тор, содержащих в геноме ряд генов возбудителя холеры классического биовара. Так, во входящих в состав генома профага CTXφ генах *ctxAB*, кодирующих холерный токсин или CT (от cholera toxin), присутствует ген *ctxB* классического биовара (*ctxB*1). Кроме того имеется ряд мутаций и в других генах, участвующих в продукции факторов патогенности. Вследствие приобретения части генетического материала от холерных вибрионов классического биовара эти геновариант являются более вирулентными по сравнению с типичными штаммами [2, 10, 14]. Известно также, что условия окружающей среды влияют на структуру генома возбудителя

холеры, приводя нередко к делеции профага CTXφ, кодирующего ключевой фактор вирулентности возбудителя [3]. Однако сведения о роли делеции профага CTXφ в изменении экспрессии генов, определяющих биосинтез других факторов патогенности, до сих пор весьма немногочисленны.

Цель работы – изучить влияние делеции профага CTXφ, несущего гены *ctxAB*, на изменение фенотипических свойств, связанных с патогенностью или формированием биопленки у нетоксигенных мутантных штаммов.

Материалы и методы

В работе использовали клинические штаммы *V. cholerae* M888 и P18899 биовара Эль Тор, а также их производные, обозначенные как M888ΔCTXφ и P18899ΔCTXφ, у которых был делетирован геном профага CTXφ. В качестве контрольных взяты штаммы классического биовара *V. cholerae*, Дакка 35Tox$^+$ и Дакка 35Tox$^-$. Изученные штаммы хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре Luria-Bertani (LB) при 37 °C.

Продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы или HA/P (от hemagglutinin/protease) оценивали на плотной питательной среде, содержащей 10 % обезжиренного молока [5]. Размер зоны протеолиза вокруг макроколонии через 48 ч свидетельствовал о степени выраженности протеолитической активности штаммов.

Для оценки подвижности изолированные колонии исследуемых штаммов *V. cholerae* с помощью реплики наносили на 0,4 % LB-агар (pH 7,2). Через 18–24 ч учитывали зону распространения колонии (в мм) у изучаемых штаммов.

Для оценки продукции термолабильного гемолизина/цитолизина или VCC (от *Vibrio cholerae* cytolysin) изолированные колонии исследуемых штаммов с помощью реплики наносили на чашки с LB-агаром (pH 7,2) с добавлением 1 % взвеси эритроцитов барана. В течение 18–24 ч при температуре 37 °C учитывали зону лизиса эритроцитов (в мм) вокруг макроколонии исследуемых штаммов [15].

Для выявления экзополисахаридов или VPS (от *Vibrio* polysaccharide) гелевую пластину, после проведения электрофореза по методу U.Laemmli [9], окрашивали раствором, содержащим 20 % азотнокислого серебра, и проявляли в растворе с 0,05 % формалином [6].

Оценка способности формировать биопленку проводилась по методу J.Nesper. *et al*. [11] путем выращивания штаммов в LB-бульоне в лунках 96-луночной полистероловой панели. Через 24 ч осторожно удаляли бульон, сформированную биопленку фиксировали 2,5 % раствором глютарового альдегида и окрашивали 0,4 % раствором кристалл виолета. После 3-кратного промывания лунок дистиллированной водой добавляли в них 300 мкл раствора, содержащего в равных объемах этанол и ацетон, для растворения окрашенной биопленки. Количественным выражением степени образования биопленок в лунках служили значения оптической плотности (ОП), измеряемые на спектрофотометре.

Определение колонизирующей способности штаммов проводили по методу N.Pierce *et al.* [12]. Для заражения животных использовали агаровую культуру. Крольчатам массой 130–160 г внутрикишечно вводили взвесь вибрионов в концентрации 10^7 и 10^5 КОЕ в 0,2 мл 0,14 М раствора NaCl. Затем через 48 ч у погибших или усыпленных хлороформом животных брали отрезки толстого и тонкого кишечника длиной 3 см, которые, после трехкратного промывания в растворе NaCl, растирали в фарфоровой ступке со стерильным кварцевым песком и 3 мл NaCl. Из соответствующих разведений полученного гомогената по 0,1 мл взвеси высевали на LB-агар и через 18 ч подсчитывали число выросших колоний из взятых образцов кишечника. Колонизирующую способность изучаемых штаммов определяли по числу клеток, находившихся на поверхности 1 см^2 стенки тонкого и толстого кишечника крольчат-сосунков. Работа с животными проводилась в соответствии с законодательством РФ, этическими нормами и нормативными документами учреждения.

Все эксперименты проводили трехкратно.

Результаты и обсуждения

Ранее нами в модельных экспериментах было показано возникновение спонтанных нетоксигенных мутантных штаммов из токсигенных штаммов при обитании последних в водной среде. Полногеномное секвенирование двух произвольно выбранных мутантов из 10 полученных, один из которых был производным типичного штамма (M888), а второй – генетически измененного (P18899), показало, что их нетоксигенность обусловлена утратой профага CTXφ, несущего гены *ctxAB* [3]. Для выяснения влияния делеции профага на изменение экспрессии других генов, связанных с биосинтезом дополнительных факторов патогенности или выживанием в окружающей среде, проведен сравнительный анализ фенотипов двух пар изогенных штаммов – M888 и M888ΔCTXφ, P18899 и P18899ΔCTXφ. Обнаружено, что потеря профага CTXφ сопровождалась изменением морфологии колоний у нетоксигенных мутантов. Так, если исходные штаммы M888 и P18899 на плотной среде формировали мутные или O-колонии (от opaque), то для Tox$^-$ мутантов характерны прозрачные или T-колонии (от translucent) (рис. 1, а). Поскольку изменение морфологии колоний мутантов могло быть связано с отсутствием или понижением продукции внеклеточного VPS, мы сравнили продукцию у исследуемых штаммов. Оказалось, что уровень биосинтеза VPS у мутантов с измененной морфологией был действительно несколько ниже

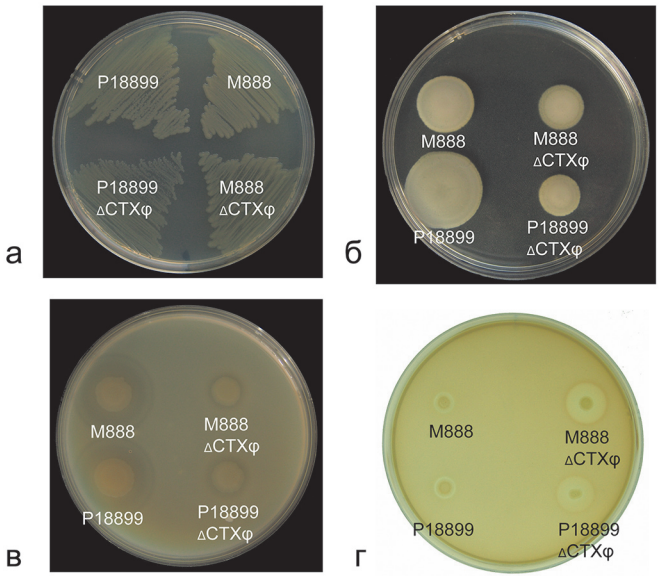


Рис. 1 Фенотипические свойства изогенных токсигенных штаммов M888 и P18899 и их нетоксигенных делеционных мутантов M888ΔCTXφ и P18899ΔCTXφ:

а – морфология колоний; ***б*** – подвижность; ***в*** – продукция растворимой гемагглютинин/протеазы; ***г*** – продукция термолабильного гемолизина/цитолизина

по сравнению с таковым у исходных штаммов. На рис. 2, а представлены результаты определения VPS у изогенной пары P18899 и P18899ΔCTXφ. Так как VPS относится к основным компонентам биопленки, далее мы оценили способность мутантов формировать ее на абиотической поверхности в сравнении с исходными штаммами [16]. Оказалось, что мутанты формировали биопленки, однако активность этого процесса у них снижена более чем в два раза по сравнению с токсигенными штаммами (рис. 2, б).

Поскольку сниженная способность к формированию биопленки у нетоксигенных штаммов могла быть связана не только с изменением продукции VPS,

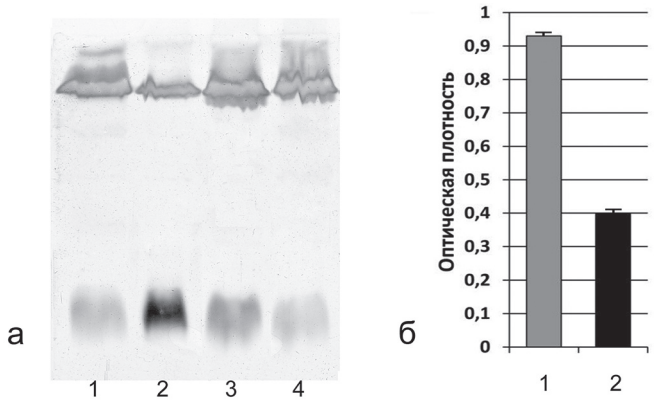


Рис. 2 Продукция экзополисахарида (а) и активность формирования биопленки (б) у исходного токсигенного (P18899) и нетоксигенного мутантного штамма (P18899ΔCTXφ) утратившего профаг CTXφ:

а) *1, 2 – V. cholerae* Дакка 35Tox$^+$ и Дакка 35Tox$^-$ классического биовара, взятые соответственно в качестве отрицательного и положительного контролей; *3 – V. cholerae* P18899 – токсигенный штамм биовара Эль Тор; *4* – нетоксигенный мутантный штамм *V. cholerae* P18899ΔCTXφ биовара Эль Тор. ***б***) *1* – исходный токсигенный штамм P18899; *2* – нетоксигенный мутантный штамм P18899ΔCTXφ, утративший профаг CTXφ

но и их подвижности [3], мы сравнивали изогенные штаммы по этому свойству. В результате установлено, что делеция профага CTXφ действительно приводит к изменению подвижности. Нетоксигенные мутанты были заметно менее подвижны по сравнению с исходными токсигенными штаммами (рис. 1, б). Таким образом обнаружено, что делеция профага с генами *ctxAB* приводит не только к утрате токсигенности, но и к изменению фенотипических свойств, связанных с образованием биопленки (VPS и подвижности), способствующей сохранению холерных вибрионов в окружающей среде.

Особый интерес представлял вопрос о влиянии делеции профага на продукцию других факторов патогенности. В этой связи в первую очередь мы определили продукцию нетоксигенными штаммами токсин-коррегулируемых пилей адгезии или TCP (от toxin-coregulated pili) − одного из ключевых факторов вирулентности, за счет которого происходит колонизация вибрионами тонкого кишечника человека. Основанием для проведения таких экспериментов явилась выявленная ранее связь между экспрессией генов *ctxAB* и *tcpA*, кодирующего основную субъединицу пилей адгезии. Показано, что повреждение гена *tcpA* приводит к резкому снижению продукции CT [4]. Проведенный нами эксперимент по оценке колонизирующей способности нетоксигенных мутантов на модельных животных подтвердил наличие такой связи. Оказалось, что способность нетоксигенных мутантов к колонизации кишечника крольчат была значительно ниже таковой исходных штаммов. Этот вывод основан на результатах внутрикишечного заражения животных клетками изогенных штаммов P18899 и P18899ΔCTXφ. Так, количество клеток исходного штамма P18899, прикрепившихся за счет TCP к 1 см^2 эпителия стенки тонкого кишечника крольчат ($6{,}1\cdot10^5$ м.к./см^2), значительно превышало таковые показатели ($1{,}3\cdot10^4$ м.к./см^2) для мутантного штамма. Выраженное понижение (более чем в 40 раз) колонизирующей способности нетоксигенных мутантов указывает на роль делеции профага CTXφ в экспрессии второго ключевого фактора вирулентности.

Кроме продукции TCP у нетоксигенных мутантов определен уровень биосинтеза двух дополнительных факторов патогенности: HA/P и VCC [4, 13]. В результате установлено, что у мутантных штаммов уровень продукции HA/P был значительно ниже, чем у исходных штаммов (рис. 1, в). Другая картина наблюдалась при сравнительной оценке уровня продукции VCC. Обнаружено, что у нетоксигенных мутантов продукция VCC резко повысилась. Уровень биосинтеза этого порообразующего токсина у мутантов стал существенно выше по сравнению с исходными штаммами (рис. 1, г).

Таким образом, при фенотипическом анализе изогенных штаммов впервые установлено, что делеция профага CTXφ из хромосомы природных типичных и генетически измененных штаммов возбудителя холеры Эль Тор приводит не только к утрате их

токсигенных свойств. Важным следствием этого события является одновременное изменение нескольких других фенотипических свойств, связанных как с вирулентностью (биосинтез TCP, HA/P, VCC), так и с образованием биопленки (VPS и подвижность). Проведенный ранее анализ полных геномов сравниваемых штаммов показал отсутствие различий между ними относительно структуры их генов, определяющих изученные свойства [3]. Именно этот факт позволяет говорить о том, что обнаруженные у мутантов фенотипические особенности, возможно, связаны с изменением активности регуляторных генов, прямо или опосредованно контролирующих как патогенность, так и процесс формирования биопленки у холерных вибрионов. Для полного понимания роли профага CTXφ в контроле активности регуляторных генов необходимы дополнительные исследования.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Фёдоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале XXI века. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол*. 2005; 3:44–8.
2. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол*. 2011; 3:11–8.
3. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
4. Almagro-Moreno S., Pruss K., Taylor R.K. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2015; 11(5):e1004787. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004787.
5. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun*. 1992; 60(2):472–8.
6. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol*. 1983; 154(1):269–77.
7. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev*. 1995; 8:48–89.
8. Krukonis E.S., DiRita V.J. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003; 6:186–90. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00032-8.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
10. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Farugue A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44:4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
11. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiß A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun*. 2001; 69(1):435–45. DOI: 10.1128/IAI.69.1.435-445.2001.
12. Pierce N.F., Cray W.C., Kaper J.B., Mekalanos J.J. Determinants of immunogenicity and mechanisms of protection by virulent and mutant *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect. Immun.* 1988; 56(1):142–8.
13. Saka H.A., Bidinost C., Sola C., Carranza P., Collino C., Ortiz S., Echenique J.R., Bocco J.L. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb. Pathog.* 2008; 44:118–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.08.013.
14. Satchella K.J.F., Jonesb C.J., Wonga J., Queena J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun*. 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
15. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N., Sanyal S.C., Huq A., Colwell R.R. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67(2):910–21. DOI: 10.1128/AEM.67.2.910–921.2001.
16. Teschler J.K., Zamorano-Sánchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol*. 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.

References

1. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Fedorov Yu.M., Podosinnikova L.S., Gorobets A.V. [Cholera at the beginning of the XXI century]. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol*. 2005; 3:44–8.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. [Variability of the genome of the altered *Vibrio cholerae* variants biovar El Tor, isolated in the territory of Russia in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2011; 3:11–8.
3. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Yu., Krasnov Ya.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor of different epidemiological significance]. *Genetika.* 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
4. Almagro-Moreno S., Pruss K., Taylor R.K. Intestinal colonization dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog.* 2015; 11(5):e1004787. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004787.
5. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun*. 1992; 60(2):472–8.
6. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol*. 1983; 154(1):269–77.
7. Kaper J.B., Morris J.G., Levin M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev*. 1995; 8:48–89.
8. Krukonis E.S., DiRita V.J. From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003; 6:186–90. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00032-8.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
10. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Farugue A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44:4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
11. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiß A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun*. 2001; 69(1):435–45. DOI: 10.1128/IAI.69.1.435-445.2001.
12. Pierce N.F., Cray W.C., Kaper J.B., Mekalanos J.J. Determinants of immunogenicity and mechanisms of protection by virulent and mutant *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect. Immun.* 1988; 56(1):142–8.
13. Saka H.A., Bidinost C., Sola C., Carranza P., Collino C., Ortiz S., Echenique J.R., Bocco J.L. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholera toxin gene-negative *V. cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microb. Pathog.* 2008; 44:118–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2007.08.013.
14. Satchella K.J.F., Jonesb C.J., Wonga J., Queena J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun*. 2016; 84(9):2473–81. DOI: 10.1128/IAI.00189-16.
15. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N., Sanyal S.C., Huq A., Colwell R.R. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001; 67(2):910–21. DOI: 10.1128/AEM.67.2.910–921.2001.
16. Teschler J.K., Zamorano-Sánchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol*. 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.

Authors:

Shchelkanova E.Yu., Agafonova E.Yu., Livanova L.F., Agafonov D.A., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Щелканова Е.Ю., Агафонова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Агафонов Д.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.12.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:58–62. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-58-62**

УДК 616.98:579.842.23

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

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ НА ФОНЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ

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

Цель работы. Определение характера и динамики морфофункциональных изменений в органах периферической иммунной системы мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции. **Материалы и методы.** С помощью комплекса гистологических, гистохимических, иммуногистохимических методов, с применением морфометрического анализа охарактеризована направленность иммунологических процессов в периферических лимфоидных органах мышей линии BALB/c. **Результаты и выводы**. Установлено стимулирующее влияние полиоксидония в схеме сочетанного применения с *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на процессы пролиферации клеток в Т-зонах лимфоидных органов, на активацию в них субпопуляции Т- и В-лимфоцитов по увеличению доли специфически окрашенных маркером CD25 клеток и ядер лимфоцитов с большим содержанием аргирофильных гранул, косвенно характеризующих функциональное состояние ядерного аппарата в них, а также на интенсификацию реакции клеток нейроэндокринного окружения лимфоидных структур. По результатам комплексного морфологического анализа детализированы особенности морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах биомодели, свидетельствующие о перспективности применения полиоксидония с целью повышения эффективности противочумной вакцинации.

Ключевые слова: чумная вакцина, иммуномодулятор, органы иммуногенеза.

Корреспондирующий автор: Светлана Александровна Бугоркова, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

S.A.Bugorkova, A.F.Kurylina, T.N.Shchukovskaya

Morphological-Functional Characteristics of Immune Competent Organs of BALB/c Mice in Case of Vaccination with *Yersinia pestis* NIIEG Strain against the Background of Immune Modulation

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

Objective of the study is to specify the character and dynamics of morpho-functional changes in the organs of peripheral immune system of BALB/c mice in case of immunization with vaccine *Yersinia pestis* EV NIIEG strain against the background of immune modulation. **Materials and methods**. Applying a combination of histological, histo-chemical, immune histo-chemical methods, and morphometric analysis, defined has been the targeting of immunological processes in peripheral lymphoid organs of BALB/c mice. **Results and conclusions**. Revealed has been stimulating effect of polyoxidonium in concomitant use of *Yersinia pestis* EV NIIEG, on the processes of cell proliferation in T-zones of lymphoid organs, on activation of T- and B-lymphocyte sub-population in them by reference to the increment in the amount of specifically stained with CD25 marker cells and nuclei of lymphocytes with high argyrophil granule content, indirectly characterizing the functional state of nuclei apparatus, as well as on response intensification of neuroendocrine environment of lymphoid structures. Based on the results of complex morphological analysis, specified have been the peculiarities of morphofunctional changes in immune competent organs of biomodels, being indicative of polyoxidonium potential to increase the effectiveness of vaccination against plague.

Key words: plague vaccine, immune modulator, organs of immunogenesis.

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

Corresponding author: Svetlana A. Bugorkova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Bugorkova S.A., Kurylina A.F., Shchukovskaya T.N. Morphological-Functional Characteristics of Immune Competent Organs of BALB/c Mice in Case of Vaccination with *Yersinia pestis* NIIEG Strain against the Background of Immune Modulation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:58–62. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-58-62

Применяемая для специфической профилактики чумы в России живая вакцина (ЖЧВ), представляющая собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, вызывает развитие иммунитета у вакцинированных длительностью до 1 года [2]. Одним из способов воздействия на механизмы пролонгации напряженного иммунитета при чуме является использование иммуномодуляторов.

Препарат азоксимера бромид (полиоксидоний), относящийся к высокомолекулярным химически чистым иммуномодуляторам, получаемый с помощью направленного химического синтеза, представляет собой N-оксидированное производное по-

лиэтиленпиперазина с молекулярной массой около 100 кДа [13]. Полиоксидоний характеризуется широким фармакалогическим воздействием на организм, но главным образом изучен его иммуномодулирующий эффект [7]. Известно, что в условиях макроорганизма этот препарат не только активирует клеточный и гуморальный иммунитет посредством запуска каскада многогранных реакций клеток моноцитарно-макрофагальной системы, но и оказывает воздействие на нейроэндокринную систему [8].

Возможность применения иммуномодулирующих препаратов в схемах противочумной вакцинации [3, 9, 10] диктует необходимость комплексного морфофункционального контроля состояния органов иммуногенеза при сочетанном использовании ЖЧВ и иммуномодулятора.

Цель данной работы – определить характер и динамику морфофункциональных изменений в органах периферической иммунной системы мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции.

Материалы и методы

Противочумный вакцинный процесс моделировали на мышах линии BALB/c массой 18–20 г (60 особей) путем подкожного введения $2{,}5 \cdot 10^4$ м.к. вакцинного штамма *Y. pestis* EV линиии НИИЭГ в соответствии с приложением 7 методических указаний [5]. Содержание и уход за животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Мышам 1-й группы за час до иммунизации вакцинным штаммом *Y. pestis* EV подкожно в дозе 0,2 мг/кг вводили полиоксидоний (ПО), животным 2-й группы аналогичным образом была введена только культура вакцинного штамма *Y. pestis* EV. В качестве контрольных были взяты интактные мыши, которым подкожно иннокулировали физиологический раствор (К1) или ПО (К2). Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки с помощью хлороформа. Периферические лимфоидные органы (селезенка, регионарные (РЛУ) к месту введения и отдаленные (ОЛУ) лимфатические узлы) фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, дальнейшую обработку гистологического материала проводили по стандартной схеме [4]. Готовые полутонкие парафиновые срезы для обзорной микроскопии окрашивали гематоксилином и эозином.

Уровень пролиферативной активности Т- и В-зон характеризовали полуколичественным методом по 3-балльной шкале (от 0 до 3): 0 баллов – отсутствие активности; 1 балл – слабовыраженная активность; 2 балла – умеренно выраженная активность; 3 балла – резко выраженная активность. Применительно к фолликулам лимфатических узлов, представляющих собой В-зоны, к высокоактивным (3 балла) относили структуры с так называемыми светлыми центрами, богатыми бластными формами клеток, с наличием митозов, с макрофагами, содержащими осколки ядер. На среднюю степень активности фолликулов (2 балла) указывали: увеличение в светлых центрах числа эпителиоидных клеток, четкий периферический ободок из малых лимфоцитов вокруг центров. В фолликулах со слабой активностью (1 балл) светлые центры содержали мало клеток («запустевшие») и были окружены широкой мантийной зоной из малых лимфоцитов. Фолликулы без светлых центров считали не активными (0 баллов). При оценке активности В-зон мозговых тяжей, а также Т-зон (паракортикальных) учитывали отсутствие (0 баллов) или наличие гиперплазии клеток в них и характер их состава. Преобладание бластных форм – 3 балла; смешанный состав (бласты и неактивированные лимфоциты, либо зрелые плазматические клетки) – 2 балла; преобладание неактивированных клеток с малым числом бластных элементов – 1 балл. Аналогичный подход применяли и для оценки активности Т- и В-зон в селезенке.

Морфометрический анализ структур лимфоидных органов (Т- и В-зон) выполняли с использованием аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц с помощью программы «Денситоморфометрия» (версия 2.1.0.0.).

Клетки нейроэндокринной (APUD-системы) в лимфоидных органах выявляли методом импрегнации срезов серебром по Гримелиусу с помощью готового набора реагентов фирмы BioVitrum и иммуногистохимическим (ИГХ) методом с использованием моноклональных мышиных антител (мкАТ) к хромогранину А(Chromogranin A Ab-2 clone PHE5) – маркеру нейроэндокринных клеток (фирмы Thermo Scientific, США). Подсчет аргирофильных элементов осуществляли в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов лимфоидных органов при увеличении в 400 раз.

Для оценки нуклеолярного аппарата лимфоцитов применяли метод импрегнации азотно-кислым серебром по W.M.Howell, D.A.Black [15] с помощью готового набора реагентов «AgNOR» фирмы BioVitrum. Для оценки функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов в каждом случае применяли световой микроскоп OLYMPUS CX 41 при увеличении в 1000 раз и программу VideoZavr 1.5, подсчитывая содержание гранул серебра в ядрышках 300 ядер клеток, определяя среднее содержание AgNOR-позитивных структур на 1 ядро, процентное содержание AgNOR-позитивных гранул (1, 2, 3 и более) на 1 ядро.

Активацию клеток субпопуляции Т- и В-лимфоцитов оценивали с применением поверхностных антигенных маркеров (дифференцировочных антигенов, CD), используя мкАТ к CD25 (Thermo Scientific, США), выполняли двухшаговый протокол с тепловой демаскировкой антигена по стандартной схеме проведения ИГХ реакции [6] с применением готового набора реагентов (EnVision Flex, Dako), ядра докра-

шивали раствором гематоксилина. Определяли долю окрашенных клеток среди 300 посчитанных элементов при увеличении в 400 раз и проводили полуколичественный учет окрашенных клеток, ориентируясь на интенсивность окраски: 0 – нет окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2 – умеренное окрашивание; 3 – сильное окрашивание.

Статистическую обработку результатов производили с помощью стандартного пакета компьютерных программ «Excel» и «Statistica» 7.0.

Результаты и обсуждение

До 3 сут в лимфоидных органах иммунизированных животных опытных групп регистрировали незначительные признаки острого серозного аденита и спленита, начиная с 7-х суток, отмечали развитие, в различной степени выраженности, гиперпластических процессов. Так, в РЛУ на 14-е сутки у мышей 1-й группы активность Т-зон достигала 1–2, а В-зон – 3 баллов, а во 2-й группе средняя активность Т- и В-зон находилась в пределах 2 баллов, преимущественно за счет активации Т-зон. В этот срок в селезенке при нарастании активности в среднем до 2–3 баллов у мышей из опытных групп в большей степени отмечали активацию Т-зон у животных 2-й группы. К 21-м суткам картина несколько менялась, и на фоне относительной активации в опытных группах Т- и В-зон до 3 баллов регистрировали в большей степени активацию Т-зон у мышей из 1-й группы (рис. 1). Менялось и соотношение площадей, занимаемых Т- и В-зонами в различные сроки. Если в селезенке мышей 1-й группы на 3-и сутки соотношение Т- и В-зоны составляло 3:1, а во 2-й группе – 8:1, то на 21-е сутки в 1-й группе сохранялась тенденция увеличения соотношения зон в пользу тимусзависимых областей (4:1), а во 2-й группе этот показатель резко менялся в пользу В-зоны и составлял 1:22.

В РЛУ, где явления аденита в ранние сроки после иммунизации были более выражены, наблюдали относительное увеличение площади фолликулов во 2-й группе по сравнению с 1-й до 14 сут, а к 21-м суткам этот показатель был выше у мышей из 1-й группы и

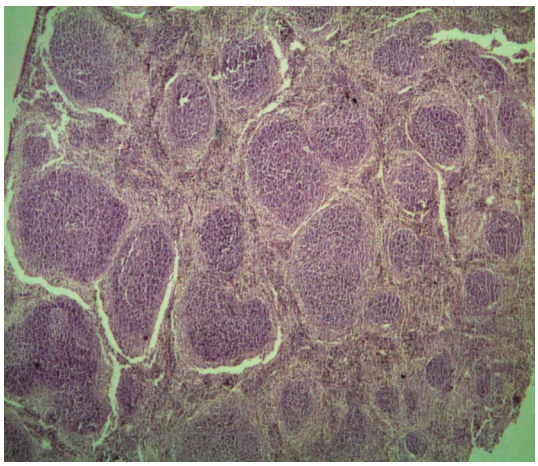
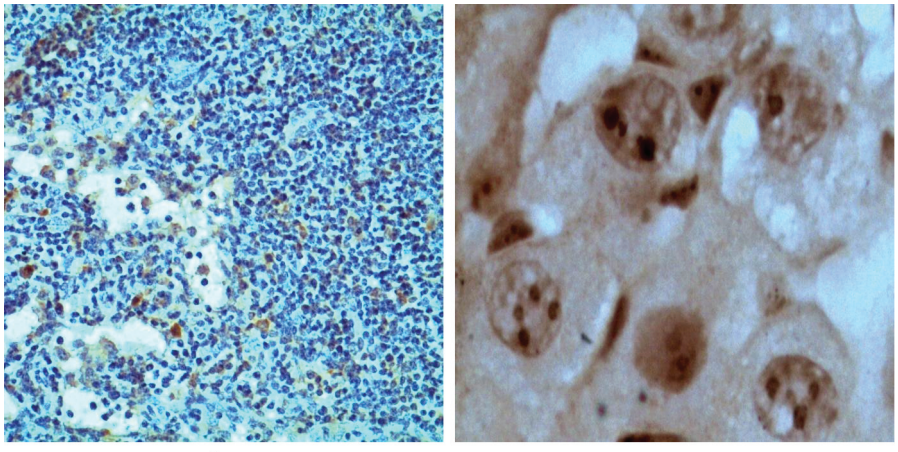


Рис. 1. Селезенка. Иммунизация *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием, 7-е сутки наблюдения. Пролиферативные процессы. Окр. гематоксилин-эозином. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 4. Ок. 10

составлял (70057,77±32651,44) мкм^2, во 2-й группе – (63500,12±23574,120) мкм^2. В селезенке наблюдали обратную реакцию, так средняя площадь фолликулярной ткани в органе животных 2-й группы на 3-и и 14-е сутки была соответственно в 1,4 и 4,7 раза больше, чем в группе интактного контроля (К1), но к 21-м суткам площадь фолликулов в большей степени превалировала у мышей из 1-й группы и составляла (83816,12±4966,30) мкм^2 и (73967±18911,68) мкм^2 соответственно.

Интенсивность активации клеток субпопуляции Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах по результатам ИГХ исследования с маркером CD25 характеризовало планомерное увеличение доли положительно окрашенных клеток в период 14-х по 21-е сутки (рис. 2, а). В РЛУ мышей 1-й группы отмечали увеличение количества положительно окрашенных клеток от 18 до 42 % на фоне средней интенсивности реакции в 2–3 балла, во 2-й группе этот показатель достигал 18 и 32 % соответственно. На 14-е сутки положительно окрашенные клетки наблюдали преимущественно в воротном синусе лимфатического узла, но встречались и единичные элементы в области фолликулов. К 21-м суткам накопление по-



А Б

Рис. 2. РЛУ. Иммунизация *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием, 3-и сутки наблюдения:
А – CD25-позитивные клетки в синусе узла. ИГХ. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 40. Ок. 10. ***Б*** – аргирофильные гранулы в лимфоцитах. Импрегнация срезов серебром по методу Howell W.M., Black D.A. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 90. Ок. 10

Реакция нейроэндокринных клеток в лимфоидных органах мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием

Группа	Орган	Срок наблюдения, сут			
		3	7	14	21
1-я	РЛУ	4,1±0,94	5,9±0,82*	9,2±1,4*	10,8±0,62*
	ОЛУ	5,1±1,45*	3,1±1,14	7,4±1,74*	8,1±1,16*
	Селезенка	4,5±1,36	6,8±1,25*	14,1±2,26*	15,8±2,44*
2-я	РЛУ	2,9±0,84	4,75±054	7,9±0,63*	8,2±1,2*
	ОЛУ	2,8±0,96	6,5±0,98*	6,9±1,1*	7,2±1,4*
	Селезенка	8,4±2,26*	9,7±1,14*	6,3±1,56	10,5±2,93*
К1	РЛУ	2,9±1,85	2,78±0,62	2,91±0,84	2,8±0,18
	ОЛУ	2,3±0,64	2,4±0,72	2,2±0,32	2,4±0,84
	Селезенка	2,8±0,65	2,9±0,64	2,8±0,96	2,7±0,32
К2	РЛУ	3,9±0,94	1,5±0,81	3,2±0,96	2,7±0,64
	ОЛУ	4,6±0,92*	1,3±0,64	2,8±0,81	2,8±0,81
	Селезенка	4,9±0,94	5,2±1,4*	3,1±0,67	2,4±0,32

*Достоверное отличие от показателя в группе К1 ($p<0,05$).

ложительно окрашенных клеток регистрировали в паракортикальной зоне (ПКЗ) узла. В селезенке сохранялась отмеченная тенденция накопления CD25-положительных клеток чаще в Т-зонах. При общей интенсивности реакции в органе в 2 балла на 14-е сутки регистрировали до 24 % положительно окрашенных клеток в 1-й группе и до 18 % – во 2-й. На 21-е сутки этот показатель соответственно составлял 54 и 48 % клеток.

При иммунологической перестройке у вакцинированных животных в лимфоидных органах наблюдали не только специфические изменения, характерные для иммунного ответа, но регистрировали признаки активации клеток нейроэндокринной системы (APUD-системы). В период с 3-х по 21-е сутки отмечали планомерное увеличение количества аргирофильных клеток в опытных группах по отношению к К1 (таблица). В группе К2 регистрировали относительное повышение количества аргирофильных клеток до 3 сут, затем их число приближалось к контрольным значениям, а в некоторых случаях было даже ниже. Отмечали более выраженное увеличение количества аргирофильных клеток в лимфоидных органах у мышей 1-й группы. На 21-е сутки количество аргирофильных элементов в РЛУ мышей 1-й группы было в 1,3 выше, чем во 2-й. В ОЛУ эта тенденция сохранялась. В селезенке количество аргирофильных клеток в 1-й группе было в 1,5 раза выше аналогичного показателя во 2-й. Во всех группах по результатам ИГХ исследований отмечали увеличение количества хромогранин А-позитивных клеток до 7 сут, но к 21-м суткам число хромогранин А-позитивных элементов значительно снижалось в опытных группах.

Наблюдали в РЛУ относительное увеличение среднего показателя количества AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах лимфоцитов животных (рис. 2, б) опытных групп до 2,27±1,1 (1-я группа) и 2,14±0,92 (2-я группа), что в среднем в 1,4 раза было выше, чем у интактных животных (К1). Менялось и соотношение лимфоцитов с различным количеством AgNOR-позитивных ядрышек в пользу увеличения доли клеток с тремя и более гранулами до 26 % клеток в 1-й группе и 23 % во 2-й (в К1– 9 %).

В селезенке на 21-е сутки количество AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах в среднем увеличивалось в 1,3 раза (1,97±0,32 в 1-й группе и 1,81±0,64 во 2-й) по сравнению с К1 (1,53±0,13). Доля лимфоцитов с тремя и более гранулами составляла 29 % в 1-й группе и 16 % во 2-й (в К1 – 6 %).

Ранее полиоксидоний успешно применяли для повышения иммуногенности и протективной активности ЖЧВ в экспериментальных условиях [3, 9, 10], но в этих работах не затрагивали вопросы морфофункциональной трансформации в лимфоидных органах биомоделей в процессе иммуногенеза. Установленные особенности морфофункциональных изменений в периферических органах иммунитета мышей, иммунизированных против чумы в сочетании с полиоксидонием, позволяют сделать вывод о направленной активации Т-клеточного звена иммунитета.

Иммунная система в силу уникальности своих функций, реагируя на иммунизацию формированием реакций специфического иммунного ответа, еще и вовлекает в этот процесс, посредством нейроиммуноэндокринной взаимосвязи, другие системы организма [12]. Особое место в реализации способности полиоксидония влиять на иммунный ответ, помимо основных мишеней – клеток макрофагально-моноцитарной системы, воздействующих на иммунную систему через ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, интерферон-α, отведено биогенным аминам [11]. Как следует из наших исследований, отмеченная реакция нейроэндокринных клеток в лимфоидных органах животных, иммунизированных на фоне иммуномодуляции, в

виде увеличения количества клеток APUD-системы и повышения экспрессии в них хромогранина А происходила в соответствии с эффекторной ролью регуляторных свойств, синтезируемых этими клетками биологически активных веществ [1, 14].

Результаты нашего исследования согласуются с данными авторов [3, 9], доказавших, что полиоксидоний усиливает эффекторную фазу иммунного ответа.

Своеобразным маркером пролиферативной активности лимфоидных органов на молекулярном уровне может быть оценка процессов репликации в ядре. Выявляемые методом серебрения в виде черных точек (гранул) аргирофильные кислые негистоновые белки ядрышка (С23, В23, UBF и РНК-полимераза I), ответственные за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, характеризующие состояние активно работающих в них РНК-полимераз-1, позволили косвенно охарактеризовать процесс активации клеток в лимфоидных органах животных, иммунизированных на фоне иммуномодуляции.

Примененный комплекс морфологических методов для оценки состояния органов иммуногенеза при моделировании противочумного вакцинного процесса на фоне иммуномодуляции, безусловно, позволил детализировать направленность иммуноморфологических изменений у биомоделей.

Таким образом, применение полиоксидония при моделировании противочумного иммунного ответа свидетельствует о перспективности его использования с целью повышения эффективности вакцинации, а комплексный подход, включающий различные морфологические методы, повышает информативность этой оценки.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Морфофункциональная оценка состояния клеток APUD-системы биомодели при характеристике противочумного вакцинного процесса. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 4:49–55.

2 Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хаитов Р.М., редакторы. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 880 с.

3. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Мельникова Н.Н., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Закарян С.Б. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2014; 6:108–12.

4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб: СпецЛит; 2010. 95 с.

5. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. МУ 3.3.1.1113-02. М.; 2002. 63 с.

6. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: Титул; 2004. С. 18–37.

7. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.; 2011. 608 с.

8. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3: 1–7.

9. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Денисова Т.Г., Закарян С.Б., Мельникова Н.Н. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология*. 2014; 5:286–90.

10. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Тугамбаев Т.И., Мельникова Н.Н., Адамбеков Д.А. Иммуномодуляция как способ повышения иммуногенности живой чумной вакцины. *Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева*. 2015; 3:95–8.

11. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Мухаммад Захид, Бессонова К.В. Морфологические изменения тимуса после применения полиоксидония. *Фундаментальные исследования*. 2012; 5:197–202.

12. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы гистофизиологии иммунной системы. *Иммунология.* 2002; 1:4–8.

13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Механизм действия. М.: Фармарус принт; 2005. 27 с.

14. Щуковская Т.Н. Регуляция нейромедиаторами формирования специфической резистентности к особо опасным инфекциям. *Аллергология и иммунология*. 2000; 1:110–11.

15. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–5.

References

1. Bugorkova S.A., Kutyrev V.V. [Morphofunctional assessment of APUD-system cells in bio-model when characterizing anti-plague vaccine process]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2013; 4:49–55.

2. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M., editors. [Vaccines and Vaccination: National Guidelines]. M.: "GEOTAR-Media"; 2011. 880 p.

3. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Denisova T.G., Mel'nikova N.N., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Zakaryan S.B. [Impact of immune modulation on immunogenic and protective activity of live plague vaccine]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 6: 108–12.

4. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamentals of Histological Technique]. St. Petersburg: "SpetsLit"; 2010. 95 p.

5. [Basic requirements to vaccine strains of plague microbe]. Methodological Regulations 3.3.1.1113-02. M.; 2002. 63 p.

6. Petrov S.V., Raikhlin N.T. [Guidelines on Immune Histochemical Diagnostics of Human Tumors]. Kazan: "Titul"; 2004. P. 18–37.

7. Petrov R.V., Khaitov R.M. [Next Generation Immunogens and Vaccines]. M.; 2011. 608 p.

8. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. [Immune modulator, polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical use]. *Tsitokiny i Vospalenie.* 2004; 3:1–7.

9. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Denisova T.G., Zakaryan S.B., Mel'nikova N.N. [Effect of polyoxidonium on immunogenic and protective activity of live plague vaccine]. *Immunologiya*. 2014; 5:286–90.

10. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Tugambaev T.I., Mel'nikova N.N., Adambekov D.A. [Immune modulation as a means of immunogenicity enhancement of live plague vaccine]. *Bulletin of I.K.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy*. 2015; 3:95–8.

11. Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., Mikhailova M.N., Mukhammad Zakhid, Bessonova K.V. [Morphological changes of thymus after administration of polyoxidonium]. *Fundamental. Issledovan*. 2012; 5:197–202.

12. Trufakin V.A., Shurlygina A.V. [Problems of histophysiology of immune system]. *Immunologiya*. 2002; 1:4–8.

13. Khaitov R.M., Pinegin B.V. [Advanced Immune Modulators. Classification. Mechanism of Action]. M.: "Farmus print"; 2005. 27 p.

14 Shchukovskaya T.N. [Neurotransmitter regulation of the development of specific resistance to particularly dangerous infections]. *Allergol. Immunol*. 2000; 1:110–11.

15. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*. 1980; 36:1014–5.

Authors:

Bugorkova S.A., Kurylina A.F., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Бугоркова С.А., Курылина А.Ф., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 11.02.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:63–66. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-63-66**

УДК 616.98:579.841.95

Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, Н.Г.Авдеева, Ю.И.Самохвалова

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕННОГО КОМПЛЕКСА ИЗ *FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *NOVICIDA*

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

F. tularensis subsp. *novicida*, ранее рассматриваемый как представитель отдельного вида, был причислен к разновидностям *F. tularensis* относительно недавно на основании сравнительного анализа 16S-рибосомальной РНК франциселл. Подвид subsp. *novicida* может вызывать заболевания у людей только со сниженным иммунным статусом и обладает сниженной вирулентностью для кроликов. Несмотря на это, установлена высокая степень гомологии нуклеотидной последовательности внутривидовых таксонов *F. tularensis*. **Цель исследования:** выделение протективного поверхностного антигенного комплекса из клеток *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah 112 (ATTC 15 482) и изучение его свойств. **Материалы и методы.** Концентрацию белков, углеводов, липидов в антигенном препарате определяли общепринятыми колориметрическими методами, SDS-PAGE проводили по методу U.Laemmli, а иммуноблоттинг – по методу H.Towbin. Для очистки препарата и определения его молекулярной массы применяли колоночную хроматографию, для определения иммунохимической активности – иммуноферментный анализ. Иммуногенность полученного препарата изучали на беспородных белых мышах, рассчитывая LD_{50} и ED_{50} по методу Кербера. **Результаты и выводы.** В результате нашей работы был проведен сравнительный анализ физико-химических, антигенных и биохимических особенностей протективного антигенного комплекса из клеток *F. tularensis* Utah 112 по сравнению с аналогичным антигенным комплексом из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Препарат испытан на протективность при заражении иммунизированных белых мышей вирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Показаны отличия полученного препарата по структуре и составу от аналогичного антигена из вакцинного штамма-продуцента, а также снижение его иммунохимической и протективной активностей.

Ключевые слова: Francisella tularensis, подвиды возбудителя туляремии, антигены, иммуногенность, протективность.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Екатерина Михайловна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.M.Kuznetsova, O.A.Volokh, N.G.Avdeeva, Yu.I.Samokhvalova

Characteristics of the Protective Antigen Complex Obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*

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

F. tularensis ssp. *novicida*, considered earlier as a representative of a separate species, has been recently classed among *F. tularensis* variety, based on the results of comparative analysis of 16S-ribosomal RNA. Subspecies *novicida* can cause disease only in immunocompromised humans and is low virulent for rabbits. Despite this, high rate of homology of the nucleotide sequence of *F. tularensis* intraspecific taxon is established. **Objective** of the study is to obtain protective surface antigen complex from *F. tularensis* ssp. *novicida* Utah 112 (ATTC 15 482) cells and investigate its properties. **Materials and methods**. Protein, carbohydrate, and lipid content of the antigen preparation was measured using conventional colorimetric methods, SDS-PAGE was conducted according to U.Laemmli, and immunoblotting – to H.Towbin. For purification and molecular mass determination column chromatography was applied. Immune-chromatographic activity was analyzed by immune-enzyme assay. Immunogenicity of the produced preparation was tested on scrub white mice, with LD_{50} and ED_{50} calculated according to Karber's method. **Results and conclusions**. Carried out has been comparative analysis of physical-chemical, antigenic and bio-chemical peculiarities of the protective antigen complex obtained from *F. tularensis* Utah 112 cells and equivalent antigen complex obtained from the vaccine strain – *F. tularensis* 15 NIIEG. Protectivity of the preparation has been tested through inoculation of the immunized white mice with virulent *F. tularensis* 503/840 strain. Demonstrated have been distinctive features of the new preparation, by structure and composition, as compared to similar antigen from the vaccine producer strain, as well as the slowdown of its immunochemical and protective activities.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies of tularemia agent, antigens, immunogenicity, protectivity.

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

Corresponding author: Ekaterina M. Kuznetsova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. Characteristics of the Protective Antigen Complex Obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:63–66. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-63-66

Согласно современной классификации род *Francisella* представлен видами *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella hispaniensis*, *Francisella halioticida* и *Francisella noatunensis* (или *pascida*) [5, 9, 11]. На основании различий в географическом распространении, вирулентности, биохимических свойствах бактерии вида *F. tularensis* подразделяются на четыре подвида: subsp. *holarctica*, subsp. *tularensis* (син. *nearctica*), subsp. *mediaasiatica* и subsp. *novicida* [4, 5, 11]. *F. tularensis* subsp. *novicida*, ранее рассматриваемый как представитель отдельного вида, был причислен к подвидам *F. tularensis*

относительно недавно на основании результатов сравнительного анализа 16S-рибосомальной РНК франциселл [11]. На сегодняшний день отнесение *F. novicida* к подвиду *F. tularensis* subsp. *novicida* все еще остается предметом споров и обсуждений [12].

Согласно литературным данным, в отличие от высоковирулентных подвидов *F. tularensis* subsp. *holarctica* и *tularensis,* subsp. *novicida* может вызывать заболевания у людей только со сниженным иммунным статусом и обладает сниженной вирулентностью для кроликов (LD_{50}>10^6 м.к.) [7, 12]. Несмотря на это, установлена высокая степень гомологии нуклеотидной последовательности (~97 %) внутривидовых таксонов *F. tularensis* [12]. По структуре ЛПС *F. tularensis* subsp. *novicida* отличается от ЛПС представителей других подвидов по составу двух сахаров в О-антигене, присутствием в коре дополнительной α-глюкозы, а в липиде А наличием галактозамина [10].

Низкая вирулентность и инфекционность туляремийного микроба подвида новицида, его высокая генетическая идентичность с высоковирулентными штаммами *F. tularensis*, способность вызывать заболевание у лабораторных животных указывают на возможность его использования в качестве штамма-продуцента при получении иммунологически активных поверхностых антигенов туляремийного микроба и их комплексов. В связи с этим, целью данной работы явилось выделение протективного поверхностного антигенного комплекса (ПАК) из штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 и изучение его свойств в сравнении с препаратом ПАК из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ (ПАК-15).

Материалы и методы

В работе использовали типовой штамм *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 (АТТС 15 482), полученный из Государственной коллекциии патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Препарат ПАК получали из биомассы 48-часовой агаровой культуры, инактивированной фенолом по методике, отработанной для вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ [2].

Анализ химического состава антигенных препаратов проводили колориметрическими методами: концентрацию белка определяли по Лоури при длине волны 750 нм [13] с применением набора реактивов «Bio-Rad *DC* Protein Assay» (США). Углеводы регистрировали по реакции с тимоловым реактивом при длине волны 509 нм. Количество липидов определяли бихроматным методом при длине волны 650 нм [8].

Колоночную хроматографию проводили на хроматографе низкого давления Biologic LP фирмы «Bio-RAD» (США). Колонку (120×1 см, носитель Sephacryl S-300) предварительно калибровали с использованием набора маркеров молекулярного веса от 29 до 669 кДа («Sigma», США). В качестве элюирующего буфера использовали 10 мМ Na-фосфатный буферный раствор, pH 7,0. На колонку наносили 0,5 мл образца в концентрации 10 мг/мл по сухому весу, скорость элюции составила 0,4 мл/мин.

Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) проводили по методу Laemmli в трис-глициновом буфере (pH 8,3) на приборе «Mini-Protean II» фирмы «Bio-Rad» (США), используя 12,5 % разделяющий и 4 % концентрирующий гели. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 20–40 мкг антигена по сухому весу. Для обнаружения белков в SDS-PAGE использовали окраску Кумасси синим R-250 (ДиаэМ, Германия), для выявления полисахаридов гели окрашивали азотнокислым серебром с помощью набора реактивов фирмы «Bio-Rad Silver Stain» (США). Определение молекулярной массы фракций протеинов проводили по калибровочному графику зависимости логарифмов молекулярной массы от величины относительного пробега [6] с набором калибровочных белков фирмы «Fermentas» (США). Электрофоретический перенос белковых фракций из полисахаридного геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили по методу Towbin в трис-глициновом буфере (pH 8,3) на приборе «Mini Trans-Blot» фирмы «Bio-Rad» (США). При постановке иммуноблоттинга в качестве специфических антител использовали экспериментальные поликлональные кроличьи антитела к ПАК в разведении 1:100, а в качестве конъюгата – антикроличьи антитела, меченные пероксидазой (производства ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН).

Для определения иммунохимической активности препарата протективного антигенного комплекса применяли иммуноферментный анализ (ИФА) и дот-иммуноанализ (ДИА) с экспериментальными поликлональными антителами к ПАК туляремийного микроба в разведении 1/1000 и 1/100 соответственно.

Иммуногенность полученных препаратов оценивали на модели беспородных белых мышей (19±1 г). Среднюю заражающую дозу (LD_{50}) вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 и среднюю иммунизирующую дозу (ED_{50}) антигенных препаратов рассчитывали по методу Кербера. Работу с животными проводили по стандартным методикам [7]. Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал устанавливали при вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано, что ПАК-15 представляет собой антиген сложной химической природы, в состав которого входят белки, липиды и углеводы в соотношении 3:1:1 [3]. При получении препарата ПАК из штамма *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 отмечено снижение изоточки его выделения с 4,3 до 3,8. Биохимический анализ препарата ПАК из *F. tularensis* subsp. *novicida* Utah112 (ПАК-Utah) показал, что по составу он отличается от ПАК-15. В частности, отмечено преобладание углеводной части

Состав и иммунохимические свойства препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112 (M±mt)

Препараты ПАК	Химический состав, %			Активность, нг/мл	
	Белки	Углеводы	Липиды	ДИА	ИФА
ПАК-15	63,1±3,9	10,9±1,6	23,0±2,4	20,0±6,9	0,6±0,4
ПАК-Utah	45,5±4,1	26,5±1,2	24,5±3,1	99,3±8,3	2,0±0,9

на (70±3) % и снижение иммунохимической активности в ИФА и ДИА в 5 раз (таблица). Учитывая полученные данные, можно отметить, что иммунохимическая активность препаратов ПАК связана с содержанием в них белка. Коэффициент корреляции Пирсона равен единице [1].

Электрофоретический белковый профиль ПАК-Utah отличался от ПАК-15 наличием субъединиц с молекулярной массой более 110 кДа (не активных в иммуноблоттинге) и отсутствием иммунореактивных белков в диапазоне от 50 до 90 кДа. Окраска электрофореграммы азотнокислым серебром показала наличие в препаратах ПАК-Utah и ПАК-15 компонентов липополисахаридной природы, представленных липидом А и боковыми цепями (рис. 1).

Установлено, что ПАК-15 хроматографически гомогенен, представлен одним мажорным пиком с молекулярной массой около 280 кДа. Профиль препарата ПАК-Utah имел два пика с молекулярными массами около 280 и 160 кДа, что свидетельствует о двухкомпонентном составе препарата из *F. tularensis* subsp. *novicida* (рис. 2).

Все полученные после гель-хроматографии пики препаратов ПАК-15 и ПАК-Utah проанализированы в ДИА и иммуноблоттинге. Для препарата ПАК-15 установлено наличие всех иммунодоминантных белков в основном пике. Активность в ДИА коррелировала с концентрацией белка и составляла в среднем 1/1000 для мажорного пика и 1/10 для минорного. Тогда как для ПАК-Utah состав пиков отличался: в первом были белки более 43 кДа, а во втором – менее 23 кДа. Несмотря на это активность в ДИА в обоих случаях равна 1/100.

Изучение протективных свойств препарата ПАК из подвида новицида проводили на модели белых мышей, которых иммунизировали однократно подкожно с последующим заражением вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *holarctica* 503/840 на 21-е сутки в дозе 100 м.к. (LD_{50} 1 м.к.). Отмечено, что выживаемость животных при иммунизации препаратом ПАК-Utah была в 2,5 раза ниже по сравнению с препаратом ПАК-15 и составила в среднем 37,5 %. Средняя иммунизирующая доза препарата ПАК-Utah составила 125,9 (66,7÷269,4) мкг, тогда как для ПАК-15 ED_{50} = 3,1 (2,4÷11,3) мкг [2]. Патологоанатомическая картина и высевы из органов павших животных на селективные питательные среды указывали на гибель от туляремийной инфекции.

В результате проделанной работы установлены отличия препаратов ПАК-Utah и ПАК-15 по составу белковых субъединиц, количеству углеводов, молекулярной массе, иммунохимической и протективной активности. Отмеченные отличия в протективных свойствах связаны с биохимическими и иммунохимическими особенностями ПАК из подвида *novicida*. Можно предположить, что активность препаратов ПАК связана с его белковыми субъединицами с молекулярными массами в диапазоне от 57 до 85 кДа. Сниженная иммунохимическая и протективная активности ПАК-Utah делают непригодным использование данного препарата в качестве компонента разрабатываемых препаратов для профилактики и диагностики туляремии.

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

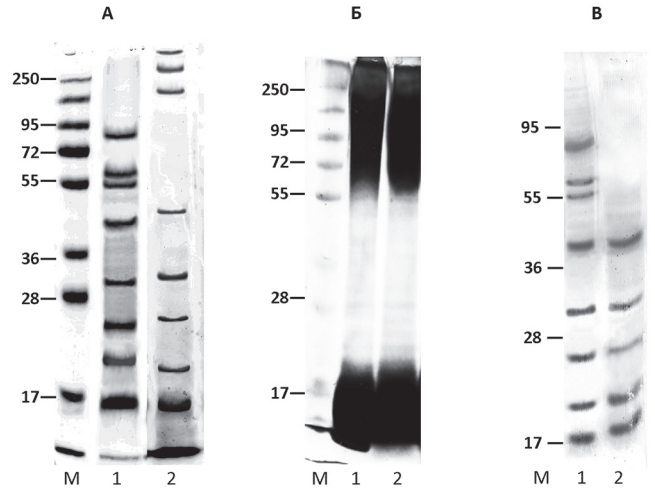


Рис. 1. SDS-PAG-электрофорез и иммуноблоттинг препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112:

А – белковый профиль (окраска Кумасси синим); ***Б*** – ЛПС-профиль (окраска азотнокислым серебром); ***В*** – иммуноблоттинг с Ig к ПАК-15 препаратов. *М* – маркеры молекулярной массы 11–250 кДа («Fermentas», США); *1* – ПАК-15; *2* – Пак-Utah

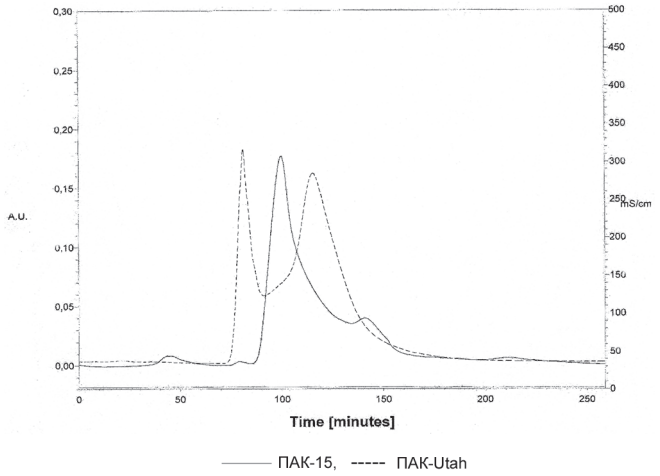


Рис. 2. Гель-хроматография препаратов ПАК, полученных из вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ и subsp. *novicida* Utah 112. По оси абсцисс – время элюции, мин; по левой оси ординат – оптическая плотность элюента при 280 нм (A.u.); по правой оси ординат – электропроводность элюента mS/cm

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гмурман В.Е. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: Высшая школа; 2004. 479 с.

2. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Шепелев И.А., Авдеева Н.Г., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Иммунобиологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба. *Пробл. особо опасных инф*. 2011; 3(109):46–9.

3. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Шепелев И.А., Никифоров А.К. Компонентный состав протективного антигенного комплекса туляремийного микроба. *Мол. генет., микробиол. и вирусол*. 2012; 3:22–5.

4. Олсуфьев Н.Г., Мещерякова И.С. Дальнейшее изучение внутривидовой таксономии возбудителя туляремии. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол*. 1981; 10:16–21.

5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. С. 154–90.

6. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981. 288 с.

7. Павлов В.М., Дятлов И.А. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М.; 2012. 267 с.

8. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-bayer chromatography. *J. Lipid Res.* 1964; 5:270–2.

9. Brevik Q.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A. *Francisella halioticida* sp. *nov*. a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111(5):1044–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x.

10. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:202–18. DOI: 10.1196/annals.1409.006.

11. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kampfer P., Splettstoesser W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. *nov.*, isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1995) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60:1887–96. DOI: 10.1099/ijs.0.015941-0.

12. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida. Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.

13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

References

1. Gmurman V.E. [Theory of Probability and Mathematical Statistics]. M.; 2004. 479 p.

2. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Shepelev I.A., Avdeeva N.G., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K. [Immunobiological properties of *Francisella tularensis* antigen complexes]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):46–9.

3. Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Shepelev I.A., Nikiforov A.K. [Blend composition of protective antigen complex of tularemia microbe]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2012; 3:22–5.

4. Olsuf'ev N.G., Meshcheryakova I.S. [Further study of intraspecific taxonomy of tularemia agent]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1981; 10:16–21.

5. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. P. 154–90.

6. Osterman L.A. [Methods for Protein and Nucleic Acid Investigation: Electrophoresis and Ultracentrifugation]. M.: "Nauka"; 1981. 288 p.

7. Pavlov V.M., Dyatlov I.A. [Molecular-Genetic Investigations of *Francisella* Bacteria and Their Applicational Significance]. M.; 2012. 267 p.

8. Amenta J. A rapid chemical method for quantification of lipids separated by thin-bayer chromatography. *J. Lipid Res.* 1964; 5:270–2.

9. Brevik Q.J., Ottem K.F., Kamaishi T., Watanabe K., Nylund A. *Francisella halioticida* sp. *nov*. a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111(5):1044–56. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05133.x.

10. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:202–18. DOI: 10.1196/annals.1409.006.

11. Huber B., Escudero R., Busse H.J., Seibold E., Scholz H.C., Anda P., Kampfer P., Splettstoesser W.D. Description of *Francisella hispaniensis* sp. *nov.*, isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1995) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010; 60:1887–96. DOI: 10.1099/ijs.0.015941-0.

12. Kingry L.C., Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida. Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4:35. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00035.

13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

Authors:

Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.12.15.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:67–71. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-67-71**

УДК 616.98:579.841.93

Г.В.Куклина, Г.Д.Елагин, О.О.Фоменков, Д.В.Печенкин, А.В.Еремкин, А.А.Кытманов

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНАМ ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров, Российская Федерация

Цель работы. Получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза. **Материалы и методы.** В работе использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров); мыши линии BALB/c. Гибридизацию проводили по методике G.Kohler и C.Milstein в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger. Исследование специфической активности иммунных сывороток, супернатантов гибридом, асцитных жидкостей, препаратов моноклональных антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа. **Результаты и выводы.** Получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты моноклональных антител к специфическим антигенам возбудителя бруцеллеза. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами при многократном пассировании *in vitro* и *in vivo*. Получены асцитные жидкости и приготовлены препараты бруцеллезных моноклональных антител. Проведен обоснованный выбор антител, обеспечивающих наибольшую чувствительность иммуноферментного анализа. Установлено, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5, в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами позволяют выявлять микробные клетки типовых штаммов различных видов бруцелл в концентрации от $0{,}25 \cdot 10^6$ до $1{,}0 \cdot 10^6$ м.к.·см$^{-3}$ и не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов в концентрации $1{,}0 \cdot 10^8$ м.к.·см$^{-3}$. Гибридомы-продуценты и препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител планируется использовать для разработки и производства средств иммунодетекции.

Ключевые слова: бруцеллез, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Куклина Галина Викторовна, e-mail: g.kklna@yandex.ru.

G.V.Kuklina, G.D.Elagin, O.O.Fomenkov, D.V.Pechenkin, A.V.Eremkin, A.A.Kytmanov

Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Antibodies to Brucellosis Agent Antigens

Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Objective of study is to prepare hybridomas-producers of monoclonal antibodies to brucellosis agent antigens. **Materials and methods.** *B. abortus, B. melitensis, B. suis* strains from the State collection of microorganisms of the 48th Central Research Institute Affiliated Branch and BALB/c mice. Hybridization was performed as described by G.Kohler and C.Milstein in modification by Fazekas De St. and Scheidegger D. The study of specific activity of immune sera, hybridoma supernatants, ascites fluid, and monoclonal antibody preparations was performed using ELISA. **Results and conclusions.** Obtained and characterized have been hybridomas-producers of monoclonal antibodies to specific antigens of brucellosis agent. They are active and stable antibody producers in the repeated passaging both, *in vitro* and *in vivo.* Obtained have also been the ascites fluid and preparations of monoclonal antibodies of brucellosis agent. Carried out has been substantiated selection of antibodies which could provide for the most sensitive ELISA. It is established that the monoclonal antibodies produced by hybridomas 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5 in combination with brucellosis rabbit immunoglobulins allow for the identification of microbial cells of type strains of various *Brucella* species in concentrations ranging from $0{,}25 \cdot 10^6$ mc·sm^{-3} up to $1{,}0 \cdot 10^6$ mc·sm^{-3} and gave negative results with cultures of heterologous microorganisms in the contents of $1{,}0 \cdot 10^8$ mc·sm^{-3}. Hybridomas-producers of monoclonal antibodies are planned to be used for the construction and manufacturing of immunodetection test-systems.

Key words: brucellosis, monoclonal antibodies, ELISA.

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

Corresponding author: Galina V. Kuklina, e-mail: g.kklna@yandex.ru.

Citation: Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. Manufacturing of Hybridomas-Producers of Monoclonal Antibodies to Brucellosis Agent Antigens. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:67–71. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-67-71

Бруцеллез – особо опасная зоонозная инфекция, характеризующаяся неопределенной продолжительностью инкубационного периода, неспецифической клинической симптоматикой с множественным поражением органов и систем организма человека, часто приводящая к инвалидизации. Человек заражается от животных главным образом контактным или контактно-бытовым путем через кожу и слизистые оболочки полости рта, носа, глаз. Алиментарный способ заражения наблюдается в основном при употреблении в пищу непастеризованных молочных продуктов, а также воды [1, 2, 6].

Из 10 видов бруцелл заболевания людей преимущественно вызывают *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, реже – *B. canis*. В нашей стране причиной более чем 95–97 % случаев бруцеллеза людей является *B. melitensis*.

В России ежегодно фиксируется от 300 до 500

случаев вновь выявленного бруцеллеза. Больные бруцеллезом люди регистрируются на территории 32 субъектов Российской Федерации 7 федеральных округов. Наиболее неблагополучными являются Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа. В условиях действия экономических санкций по отношению к Российской Федерации вероятна переориентация как торговых сетей, так и отдельных специализированных предприятий и предпринимателей на новых поставщиков животноводческой продукции из стран Средиземноморья, Ближнего Востока, Южной Америки, являющихся эндемичными по бруцеллезу крупного и мелкого рогатого скота, что может негативно повлиять на эпидемиологическую ситуацию по бруцеллезу в стране и привести к повышению уровня заболеваемости [2].

Согласно Методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03) лабораторные средства выявления возбудителя заболевания и его растворимых антигенов являются ключевым звеном в системе биологической защиты населения. Эффективность лабораторной диагностики напрямую зависит от главных требований средств обнаружения и идентификации: высокой чувствительности, специфичности и быстроты выполнения. Перечисленным требованиям отвечают такие иммунологические методы выявления возбудителей опасных инфекционных болезней, как иммуноферментный и иммунохроматографический анализы. Эффективность данных средств иммунодетекции во многом определяется качеством применяемых для их конструирования антител.

Развитие гибридомной технологии и использование ее в практике иммунологических исследований послужило мощным толчком к созданию тест-систем нового поколения на основе моноклональных антител (МКАТ), обладающих абсолютной стандартностью и специфичностью. Они идентичны не только по изотипу, аллотипу и идиотипу, но также по аффинитету и физико-химическим характеристикам. Применение МКАТ для создания средств иммуноанализа позволяет значительно повысить их диагностические показатели.

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют официально зарегистрированные и разрешенные к применению иммуноферментные и иммунохроматографические тест-системы для выявления бруцеллеза на основе моноклональных антител, а имеются лишь единичные экспериментальные разработки [4, 5].

В связи с вышеизложенным, наши исследования были направлены на получение гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза и препаратов специфических бруцеллезных моноклональных антител, перспективных для конструирования иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем.

Цель работы состояла в получении гибридных клеточных линий, стабильно секретирующих иммуноглобулины к специфическим эпитопам антигенов возбудителя бруцеллеза и оценке перспективности их применения для выявления различных видов бруцелл.

Для достижения поставленной цели представлялось необходимым решить следующие задачи: получить гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза; изучить культуральные и продуктивные свойства полученных гибридом *in vitro* и *in vivo*; получить асцитные жидкости и выделить иммуноглобулины; наработать препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител.

Материалы и методы

Мышей линии BALB/c (10 самок 5–6-недельного возраста массой 15–20 г) иммунизировали препаратом из смеси суспензий инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145, *B. suis* штамма 513, взятых в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси $1{,}2 \cdot 10^{11}$ м.к.·см$^{-3}$, с добавлением 2,0 мг·см$^{-3}$ геля гидроокиси алюминия. Схема иммунизации включала 4 подкожные инъекции препарата с интервалом введения 21 сут. Доза препарата составила $3{,}0 \cdot 10^9$, $6{,}0 \cdot 10^9$, $1{,}2 \cdot 10^{10}$ и $2{,}4 \cdot 10^{10}$ м.к. соответственно. Через 18 дней после последней инъекции осуществляли взятие крови из параорбитального синуса и определяли титр специфических антител в «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА). Для этого планшеты сенсибилизировали антигеном, состоящим из смеси инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145, *B. suis* штамма 513, взятых в равных концентрациях, с конечным содержанием общего количества микроорганизмов в смеси $3{,}0 \cdot 10^7$ м.к.·см$^{-3}$ в 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9,6 (КББ).

Животным с наибольшим уровнем продукции антител через 20 дней после иммунизации делали внутрибрюшную инъекцию (бустер-доза) смеси вышеуказанных микробных культур в количестве $1{,}0 \cdot 10^{10}$ м.к. На четвертые сутки с момента бустерной инъекции селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии средой RPMI-1640 с 20 мМ HEPES-буфера (Flow Laboratories, Великобритания).

Процедуру слияния иммунных спленоцитов и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили по методике, предложенной G.Kohler и C.Milstein [9] в модификации De St.Fazekas, S.Groth и D.Scheidegger [7]. В качестве индуктора слияния клеток использовали 50 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 (Sigma-Aldrich, США). Гибридные клетки культивировали *in vitro* в CO_2-инкубаторе (Labsystems, Россия) при температуре 37 °С и содержании диоксида углерода 5 %. Для культивирования использовали ростовую среду RPMI-1640 (Sigma-Aldrich,

США), содержащую 2 мМ L-глютамина, с добавлением 20 % фетальной телячьей сыворотки (Thermo Scientific, США) и 80 мг·л$^{-1}$ гентамицина (Россия). С целью проведения селекции гибридных клеток в ростовую среду добавляли НАТ (Sigma-Aldrich, США), содержащий гипоксантин (Н), аминоптерин (А) и тимидин (Т) в рабочем разведении.

Первичный скрининг гибридных культур проводили, начиная с 10-х суток после гибридизации. Специфическую активность антителопродукции гибридных культур определяли методом ТИФА («сэндвич»-вариант) трижды с интервалом 2–3 дня по мере интенсивности роста клеток. Для этого супернатанты гибридных клеток в объеме 100 мкл вносили в планшеты (NUNC, США), сенсибилизированные бруцеллезным антигеном в рабочем разведении в 50 мМ КББ. Комплекс «антиген-антитело» выявляли антивидовым пероксидазным конъюгатом (антитела кролика к иммуноглобулинам мыши) (Sigma-Aldrich, США). Реакцию учитывали определением оптической плотности при длине волны 492 нм ($ОП_{492}$) через 20 мин после внесения субстратно-индикаторной смеси. Пробы считали положительными, если $ОП_{492}$ в лунках с исследуемыми образцами в два и более раза превышала $ОП_{492}$ раствора в лунках с отрицательным контролем.

В настоящее время в литературе [8] имеются данные о наличии выраженного антигенного родства возбудителей бруцеллеза и кишечного иерсиниоза серогруппы О:9. Учитывая это обстоятельство, при повторном тестировании был проведен скрининг полученных гибридных культур с *Yersinia enterocolitica*. Для этого планшеты сенсибилизировали инактивированной микробной культурой *Y. enterocolitica* штамма 383 в рабочей концентрации в 50 мМ КББ. Далее постановку иммуноферментного анализа осуществляли, как описано выше.

Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений при расчетной посевной концентрации одна клетка на лунку. Продуцирующую активность отдельных клонов определяли, начиная с 10-х суток, дважды с интервалом три дня методом иммуноферментного анализа по схеме, описанной выше. После выделения положительных клонов их клетки размножали в достаточном количестве, образцы замораживали в ростовой среде RPMI, содержащей 20 % фетальной телячьей сыворотки и 8 % диметилсульфоксида (Serva, Германия), и помещали на хранение в контейнер с жидким азотом.

Культуральные и секреторные свойства полученных клонов изучали в процессе культивирования *in vitro* в 24-луночных планшетах (Flow Laboratories, Великобритания) в течение десяти, а также *in vivo* в течение трех пассажей. Для изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от $2{,}0 \cdot 10^5$ до $6{,}25 \cdot 10^3$ клеток·см$^{-3}$ и засевали ими лунки планшета в объеме 1,0 см^3. Культивирование осуществляли в течение 5 сут. За минимальную посевную концентрацию принимали концентрацию клеток, при которой в течение 5 сут наблюдали пролиферацию культуры, не требующей пассирования. При проведении пассирования учитывали частоту и коэффициент пересева.

Асцитные жидкости, содержащие моноклональные антитела, получали путем введения суспензии клонированных гибридных клеток в брюшную полость мышей линии BALB/c в дозе от 1 до 2 млн. Для поддержания роста гибридом за 10 дней до инокуляции культур гибридных клеток мышам-реципиентам в брюшную полость вводили по 0,3 см^3 минерального масла пристана (Sigma-Aldrich, США). После образования асцитной опухоли (15–20-е сутки), асцитную жидкость извлекали. Клетки из полученного препарата осаждали центрифугированием при 2000 об./мин$^{-1}$ в течение 10 мин и закладывали на хранение, а надосадочную жидкость осветляли центрифугированием при 8000 об./мин$^{-1}$ в течение 30 мин и использовали в дальнейшей работе.

Иммуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного высаливания насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом против 0,15 М натрия хлорида с добавлением 20 мМ фосфатного буферного раствора с pH 7,5.

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) осуществляли по методу P.K.Nakane и A.J.Kawaoi [10].

С целью обоснованного выбора МКАТ, позволяющих методом ТИФА выявлять микробные культуры возбудителя бруцеллеза, был проведен анализ различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе конъюгата. Для этого планшет сенсибилизировали препаратами МКАТ, а также полученными в Филиале 48 ЦНИИ Минобороны России (Киров) бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в рабочей концентрации 50 мМ КББ. После отмывки в лунки планшета вносили микробную культуру *B. melitensis* штамма 145 в концентрации $1{,}0 \cdot 10^7$ м.к.·см$^{-3}$. На следующем этапе, после отмывки, вносили приготовленные иммуноферментные конъюгаты в рабочем разведении. Реакцию учитывали определением $ОП_{492}$ через 20 мин после внесения субстратно-индикаторной смеси. Пробу считали положительной при величине $ОП_{492}$ равной 0,3 и более. При этом фоновые значения иммуноферментных конъюгатов не должны превышать величину $ОП_{492}$ равную 0,15.

Изучение диагностических возможностей препаратов моноклональных антител проводили методом ТИФА с использованием микробных культур *B. abortus* штамма 544 (биовар 1), *B. melitensis* штамма 145 (биовар 1), *B. suis* штамма 1330 (биовар 1) в диапазоне концентраций от $16{,}0 \cdot 10^6$ до $1{,}25 \cdot 10^5$ м.к.·см$^{-3}$ с двукратным шагом, а также гетерологичных микробных культур: *Yersinia pestis* штамма EV, *Yersinia pseudotuberculosis* штаммов 147, 326 и 681, *Yersinia enterocolitica* штаммов 124, 134 и 383, *Burkholderia pseudomallei* штаммов С-141,

Duc-V и Dalat, *Burkholderia mallei* штаммов Ц-5, 10230 и 11, *Francisella tularensis* штаммов Schu, 503 и 543, *Escherichia coli* штамма 101, *Bacillus anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации $1{,}0 \cdot 10^8$ м.к.·см$^{-3}$. Постановку иммуноферментного анализа осуществляли как описано выше.

Результаты и обсуждение

Контроль эффективности иммунизации лабораторных животных смесью суспензий инактивированных микробных культур *B. abortus* штамма 544, *B. melitensis* штамма 145 и *B. suis* штамма 513 проводился путем оценки титра антител в сыворотках крови. Как выяснилось в процессе проведенного опыта, исследуемые сыворотки взаимодействовали с культурами возбудителя бруцеллеза в титрах от 1:16000 до 1:128000. Животных с титром антител 1:64000 и более использовали в дальнейшей работе в качестве источника иммунных спленоцитов.

В ходе исследований проведено два эксперимента по гибридизации клеток мышиной миеломы и лимфоцитов иммунизированных мышей гистосовместимой линии. В результате трехкратного скрининга гибридных культур на специфическую антителопродукцию было выявлено 57 положительных гибридных линий клеток. Из дальнейшей работы была исключена 51 клеточная культура (89,5 %), дающая перекрестную реакцию с *Y. enterocolitica* серогруппы O:9. Оставшиеся 6 первичных культур нарастили, криоконсервировали и использовали для последующего клонирования. Результаты исследования культуральных и секреторных свойств данных гибридом представлены в табл. 1.

Полученные клоны гибридом в процессе культивирования устойчиво сохраняли пролиферирующую и антителопродуцирующую активность на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. При этом, как видно из данных табл. 1, их минимальная посевная концентрация находилась на уровне $1{,}25 \cdot 10^4$ клеток·см$^{-3}$ и $2{,}5 \cdot 10^4$ клеток·см$^{-3}$, а частота пассирования составила один раз в 4–5 дней при коэффициенте пересева 1:4. Вместе с тем титр

Таблица 1

Культуральные и секреторные свойства гибридом

Наименование гибридной клеточной линии	Минимальная посевная концентрация, $\cdot 10^4$ клеток·см$^{-3}$	Оптимальная посевная концентрация, $\cdot 10^5$ клеток·см$^{-3}$	Титр МКАТ в культуральной жидкости	Титр МКАТ в асцитной жидкости
231G5D3	2,5	1,0	1:160	1:200000
231H6D8	2,5	1,0	1:160	1:400000
232B6H7	2,5	1,0	1:640	1:1600000
232G12F7	1,25	0,5	1:1280	1:1600000
233B2C5	1,25	0,5	1:640	1:1600000
233H6F3	2,5	1,0	1:320	1:400000

Примечание. Специфическая активность представлена в виде медиан титров антител, (n=5).

антител в культуральной жидкости находился в интервале от 1:160 до 1:1280, а в асцитной – от 1:200000 до 1:1600000.

Результаты анализа различных сочетаний антител (табл. 2) свидетельствуют о том, что МКАТ гибридных клеточных линий 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5 как в качестве сенситина, так и в составе иммуноферментного конъюгата, а также в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в качестве сенситина, дают наибольший сигнал в иммуноферментном анализе при выявлении микробной культуры возбудителя бруцеллеза.

Результаты исследований по оценке диагностических возможностей моноклональных антител для выявления микробных культур возбудителя бруцеллеза представлены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 результаты свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5, в составе иммуноферментного конъюгата в сочетании с бруцеллезными кроличьими иммуноглобулинами в качестве сенситина позволяют методом иммуноферментного анализа выявлять микробные клетки различных видов и штаммов возбудителя бруцеллеза в концентрации от $0{,}25 \cdot 10^6$ до $1{,}0 \cdot 10^6$ м.к.·см$^{-3}$. В то время как различные сочетания всех представленных МКАТ как в качестве сен-

Таблица 2

Результаты иммуноферментного анализа при выявлении микробной культуры возбудителя бруцеллеза с использованием различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе иммуноферментного конъюгата

Антитела, используемые в качестве сенситина		$ОП_{492}$ в ТИФА при исследовании *B. melitensis* штамма 145 в концентрации $1{,}0 \cdot 10^7$ м.к.·см$^{-3}$ с использованием иммуноферментного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии … ($X_{ср} \pm I_{95}$), n=5					
		231G5D3	231H6D8	232B6H7	232G12F7	233B2C5	233H6F3
МКАТ гибридной клеточной линии …	231G5D3	0,194±0,075	0,399±0,072	1,014±0,092	0,628±0,100	1,030±0,097	0,077±0,075
	231H6D8	0,375±0,075	0,068±0,075	1,735±0,139	1,494±0,103	1,351±0,111	0,066±0,075
	232B6H7	1,433±0,083	1,295±0,108	**3,647**±0,183	**2,128**±0,108	**3,914**±0,111	0,320±0,103
	232G12F7	0,905±0,097	1,373±0,117	**3,746**±0,095	**2,516**±0,095	**3,860**±0,128	0,088±0,079
	233B2C5	1,057±0,075	1,785±0,097	**3,695**±0,079	**3,147**±0,071	**3,924**±0,097	0,075±0,079
	233H6F3	0,120±0,072	0,087±0,079	0,269±0,083	0,075±0,075	0,253±0,081	0,199±0,081
Бруцеллезные кроличьи иммуноглобулины		0,849±0,114	1,217±0,133	**3,944**±0,131	**3,559**±0,122	**4,003**±0,120	0,170±0,131

Таблица 3

Оценка диагностических возможностей специфических моноклональных антител к антигенам возбудителя бруцеллеза

Антитела, используемые в качестве сенситина		Выявляемая концентрация микробных культур …, $\cdot 10^6$ м.к.$\cdot$см$^{-3}$ с использованием иммуноферментного конъюгата на основе МКАТ гибридной клеточной линии … (n=5)								
		B. abortus штамм 544			*B. melitensis* штамм 145			*B. suis* штамм 1330		
		232B6H7	232G12F7	233B2C5	232B6H7	232G12F7	233B2C5	232B6H7	232G12F7	233B2C5
МКАТ гибридной клеточной линии …	232B6H7	4,0	8,0	2,0	4,0	8,0	2,0	4,0	16,0	4,0
	232G12F7	8,0	16,0	2,0	4,0	8,0	1,0	8,0	16,0	2,0
	233B2C5	4,0	4,0	2,0	4,0	4,0	2,0	8,0	8,0	2,0
Бруцеллезные кроличьи иммуноглобулины		0,5	1,0	0,25	0,5	0,5	0,25	0,5	1,0	0,25

Примечание. Результаты анализа являются полуколичественными.

ситина, так и в составе иммуноферментного конъюгата обеспечивают чувствительность ТИФА преимущественно на уровне от $2{,}0\cdot10^6$ до $16{,}0\cdot10^6$ м.к.$\cdot$см$^{-3}$. Все исследованные моноклональные антитела в иммуноферментном анализе не взаимодействуют с культурами гетерологичных микроорганизмов: *Y. pestis* штамма EV, *Y. pseudotuberculosis* штаммов 147, 326 и 681, *Y. enterocolitica* штаммов 124, 134 и 383, *B. pseudomallei* штаммов С-141, Duc-V и Dalat, *B. mallei* штаммов Ц-5, 10230 и 11, *F. tularensis* штаммов Schu, 503 и 543, *E. coli* штамма 101, *B. anthracis* штамма СТИ-1 в концентрации $1{,}0\cdot10^8$ м.к.$\cdot$см$^{-3}$, что свидетельствует об их специфичности.

Таким образом, для выявления микробных культур возбудителя бруцеллеза наиболее перспективными являются моноклональные антитела, продуцируемые гибридными клеточными линиями 232B6H7, 232G12F7, 233B2C5. Гибридомы-продуценты и препараты специфических бруцеллезных моноклональных антител планируется использовать для разработки и производства иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Горшенко В.В., Кулаков Ю.К. Эпидемические проявления современного бруцеллеза в Российской Федерации. *Эпидемиол. и вакцинопрофилакт.* 2009; 10:38–40.

2. Лямкин Г.И., Манин Е.А., Головнева С.И., Тихенко Н.И., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации в 2012 г. и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1(115):21–4.

3. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.Н., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:22–4.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

5. Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Коноплева М.В., Хац Ю.С., Третьяков О.Ю., Кулаков Ю.К., Толмачева Т.А., Желудков М.М., Суслов А.П. Высокочувствительная иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител для выявления антигенов бруцелл. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 1:52–7.

6. Цирельсон Л.Е., Желудков М.М. Бруцеллез в России: профессиональные заболевания и трудовой прогноз. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 5:43–7.

7. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.

8. Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R. False-positive serological reactions in bovine brecellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Res*. 1997; 28:375–83.

9. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–97.

10. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91.

References

1. Zheludkov M.M., Tsirel'son L.E., Gorshenko V.V., KulakovYu.K. [Epidemic manifestations of contemporary brucellosis in the Russian Federation]. *Epidemiol. i Vaktsinoprofilakt.* 2009; 10:38–40.

2. Lyamkin G.I., Manin E.A., Golovneva S.I., Tikhenko N.I., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2012 and the forecast for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1(115):21–4.

3. Lyamkin G.I., Khudoleev A.A., Khachaturova A.N., Kulichenko A.N. [Review of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2014 and the forecast for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:22–4.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.

5. Fel'dsherova A.A., El'gort D.A., Konopleva M.V., Hats Yu.S., Tret'yakov O.Yu., Kulakov Yu.K., Tolmacheva T.A., Zheludkov M.M., Suslov A.P. [Highly sensitive immuno-enzyme test system based on monoclonal antibodies to detect brucella antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Infek.* Bol. 2007; 1:52–7.

6. Tsirel'son L.E., Zheludkov M.M. [Brucellosis in Russia: occupational diseases and labor forecast]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 5:43–7.

7. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980; 35:1–21.

8. Gerbier G., Garin-Bastuji B., Pouillot R. False-positive serological reactions in bovine brecellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* O:9. *Vet. Res*. 1997; 28:375–83.

9. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–97.

10. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91.

Authors:

Kuklina G.V., Elagin G.D., Fomenkov O.O., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A. Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation.

Об авторах:

Куклина Г.В., Елагин Г.Д., Фоменков О.О., Печенкин, Д.В. Еремкин А.В., Кытманов А.А. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Киров.

Поступила 29.07.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:72–77. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-72-77**

УДК 616.912:615.371

Р.А.Максютов

ЖИВЫЕ ПРОТИВООСПЕННЫЕ ВАКЦИНЫ

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

Ликвидация натуральной оспы в результате кампании глобальной вакцинации до сих пор остается одним из величайших триумфов медицинской науки. С учетом последующего прекращения вакцинации в настоящее время человеческая популяция практически не имеет противооспенного иммунитета и является беззащитной перед патогенными для человека ортопоксвирусами. Использование классической живой вакцины первого поколения, получаемой размножением вируса на коже телят, или вакцины второго поколения, продуцируемой на культурах клеток млекопитающих, или развивающихся куриных эмбрионах, для массовой вакцинации в настоящее время недопустимо из-за значительного увеличения в последние десятилетия иммунодефицитных состояний в человеческой популяции. Аттенуированные нереплицирующиеся противооспенные вакцины третьего поколения, создаваемые в процессе множественных пассажей вируса осповакцины (ВОВ) в культуре клеток гетерологичного хозяина, индуцируют более низкий противооспенный иммунитет в сравнении с классической вакциной. Наиболее перспективным подходом является получение противооспенной вакцины четвертого поколения путем направленного нарушения генов ВОВ, контролирующих защитные реакции организма против вирусной инфекции, генов круга хозяев и генов, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот, не затрагивая гены, контролирующие размножение вируса. Новый аттенуированный и высокоиммуногенный штамм ВОВ LIVPΔ6 с нарушением шести генов вирулентности в настоящее время проходит доклинические исследования и в дальнейшем может явиться эффективной и безопасной вакциной четвертого поколения против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Ключевые слова: натуральная оспа, оспа обезьян, аттенуированная высокоиммуногенная противооспенная вакцина четвертого поколения.

Корреспондирующий автор: Максютов Ринат Амирович, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

R.A.Maksyutov

Live Antivariolic Vaccines

State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

Smallpox eradication due to global vaccination is still one of the paramount triumphs of medical science. Given the termination of the subsequent immunization, nowadays humanity virtually possesses no antivariolic immunity and is unprotected against the pathogenic for humans orthopoxviruses. Utilization of the first-generation traditional live vaccines, obtained with the help of the virus replication on calf skin, or the second-generation preparation, produced in mammalian cell cultures or grown on bird embryos, for mass vaccination is currently unacceptable in view of considerable increase in immune deficiency states among the human population within the recent decades. Attenuated non-replicating antivariolic vaccines of the third generation, obtained in the process of multiple vaccinia virus (VV) passage on cell cultures of heterologous host, induce weaker antivariolic response as compared to traditional vaccine. The most prospective approach is to produce the vaccines of the fourth generation, applying targeted VV genes' mutation, which control protective reactions of an organism against viral infection, as well as host range genes and the genes involved in nucleic acid metabolism, while skipping the genes responsible for virus replication. Novel attenuated and highly immunogenic strain, VV LIVPΔ6, having mutations in 6 virulence genes, is presently in the phase of pre-clinical trial and later on it may turn an effective and safe vaccine of the fourth generation against smallpox and other orthopoxvirus infections in humans.

Key words: smallpox, Monkeypox, attenuated highly immunogenic vaccine of the fourth generation.

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

Funding: The study is performed with financial support from the Russian Science Foundation (Project No 16-15-10101).

Corresponding author: Rinat A. Maksyutov, e-mail: vector@vector.nsc.ru.

Citation: Maksyutov R.A. Live Antivariolic Vaccines. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:72–77. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-72-77

Ликвидация натуральной оспы в результате кампании всеобщей вакцинации остается одним из величайших успехов современной науки в области здравоохранения. Натуральная оспа на протяжении большей части истории человечества являлась причиной высокой заболеваемости и смертности, только в XX веке приведя к гибели более 500 млн человек [13].

Первым способом защиты людей от эпидемий натуральной оспы явилась вариоляция, при которой вирус натуральной оспы (ВНО), выделенный из инфекционного материала больных оспой, вводили посредством скарификации или инсуффляции здоровым людям [36]. Индуцированное заболевание протекало в относительно легкой форме по сравнению с обычной респираторной передачей натуральной оспы от человека к человеку и приводило к значительно меньшей смертности (0,5–2 %) в сравнении с наблюдавшейся во время эпидемий натуральной

оспы (20–30 %) [12]. Вариоляция использовалась на протяжении столетий в Индии и Китае, прежде чем была введена в практику здравоохранения в Европе в 1721 г., где еще на протяжении более 70 лет оставалась единственным средством защиты против натуральной оспы [12, 36].

Открытие в 1798 г. возможности вакцинации людей, используя инокуляцию вируса оспы коров (ВОК), и последующее вытеснение ВОК вирусом осповакцины (ВОВ) в качестве противооспенной вакцины привело к значительному снижению смертности и риска тяжелых побочных эффектов [1].

В 1980 г. на 33-й сессии Всемирной Ассамблеи Здравоохранения, учитывая тяжелые поствакцинальные осложнения при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации оспы, повсеместную рутинную вакцинацию против данной инфекции было рекомендовано прекратить. Как следствие, к настоящему времени человеческая популяция практически не имеет коллективного противооспенного иммунитета и является беззащитной не только перед возможным инфицированием другими близкородственными ортопоксвирусами, такими как вирусы оспы обезьян (ВОО) или оспы коров, природным резервуаром которых являются мелкие грызуны, но и перед заражением ВНО в результате теракта или возникновения вируса в природе путем эволюции зоонозных ортопоксвирусов [39, 40]. В последние годы отмечается увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания людей оспой коров [6, 7, 10, 18, 22, 32], вакциноподобным заболеванием [4, 42 ,47, 50] и оспой обезьян [24, 33, 37, 38]. Вакцинопрофилактика остается единственным эффективным инструментом сдерживания возрастающей угрозы ортопоксвирусных инфекций человека.

Противооспенные вакцины первого поколения. Противооспенная вакцинация с помощью живого ВОВ применялась во всем мире более 180 лет без единой общепринятой международной стандартизации вакцинных препаратов. За это время в различных странах использовали разнообразные штаммы ВОВ, различающиеся по биологическим свойствам, формируемому иммунитету и тяжести побочных эффектов. Имеющиеся исторические данные свидетельствуют о низкой вирулентности штаммов NYCBH и Lister, которые применялись повсеместно и были рекомендованы в дальнейшем для использования в кампании по глобальной ликвидации оспы, инициированной СССР в 1958 г. [13]. Международная кампания под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), основанная на массовой вакцинации населения Земли ВОВ, методе кольцевой вакцинации и строгом эпидемиологическом надзоре, привела к элиминации случаев заражения людей ВНО: последний случай природного заболевания натуральной оспой зафиксирован в Сомали в 1977 г. [46].

Многолетнее массовое использование живых противооспенных вакцин 1-го поколения позволило определить основные, сопряженные с вакцинацией, побочные эффекты с соответствующими частотами встречаемости: генерализованная вакциния (до 70 случаев на 1 млн вакцинируемых), вакцинальная экзема (до 80 на 1 млн), прогрессирующая вакциния (1 на 1 млн), поствакцинальный энцефалит или энцефалопатия (до 1200 на 1 млн) и смертельный случай (1 на 1 млн) [23]. Традиционные противооспенные вакцины 1-го поколения нарабатывали на коже живых животных – преимущественно телят, но также буйволов, кроликов и овец. Используемая методика получения вакцинных препаратов не позволяла получать гомогенный ВОВ, свободный от других инфекционных агентов, что также вносило свой вклад в наблюдаемые побочные эффекты [31].

Противооспенные вакцины второго поколения. Вакцины следующего поколения с целью снижения побочных эффектов, стандартизации методики получения и контроля возможной бактериальной контаминации нарабатывали на линиях клеток млекопитающих и/или развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Первые работы по получению вакцины второго поколения проводились еще во время кампании по ликвидации натуральной оспы: с 1958 г. в Бразилии противооспенная вакцина, производившаяся на куриных эмбрионах, заменила вакцину первого поколения в процессе искоренения натуральной оспы [13]; в 1973 г. в Индонезии противооспенная вакцина на основе штамма Lister, производившаяся на линии клеток почки кролика, в ходе клинических испытаний продемонстрировала свою безопасность в сравнении с традиционно производимой вакциной первого поколения [16].

К настоящему времени лицензированы несколько противооспенных вакцин второго поколения, полученные как из штамма Lister (неклональные вакцины Lister/CEP и Elstree-BN, производимые компаниями Sanofi Pasteur и Bavarian Nordic соответственно [14, 48]), так и из штамма NYCBH (культуральная вакцина ACAM2000, полученная клонированием ВОВ из вакцины первого поколения Dryvax [15, 29, 34]).

Следует отметить, что опыт использования вакцин второго поколения во время кампании по ликвидации оспы, в подавляющем количестве, ограничен и не позволяет подтвердить ее эффективность в полевых условиях против натуральной оспы. Несмотря на то, что производство вакцин на культуре клеток/РКЭ происходит в соответствии с современными стандартами, противооспенные вакцины второго поколения по-прежнему могут обусловливать серьезные побочные эффекты при вакцинации и могут иметь ограниченное применение [15]. С момента ликвидации натуральной оспы в человеческой популяции значительно возросло количество людей с супрессивным иммунитетом, что значительно ограничивает возможность использования классической противооспенной вакцины первого поколения или культуральной вакцины второго поколения. В связи с этим особенно актуальным является разработка со-

временных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека.

Противооспенные вакцины третьего поколения. Во время кампании по ликвидации натуральной оспы аттенуированные штаммы ВОВ получали многократными пассажами исходных диких вариантов вируса на культурах клеток различных животных. Возникающие при этом генетические изменения (мутации и протяженные делеции) приводили к снижению вирулентности и ограничению круга чувствительных к измененному штамму хозяев [13].

Противооспенная вакцина третьего поколения LC16m8, лицензированная в Японии, была получена на основе ВОВ штамм Lister путем 45 пассажей на первичной культуре клеток почки кролика при низкой температуре (30 °С). Клинические исследования показали значительное снижение побочных эффектов в сравнении с традиционной вакциной на основе штамма Lister [17]. Аттенуация вакцинного штамма, главным образом, объясняется мутацией в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного покрытого двойной оболочкой вириона (EEV) [30]. Отсутствие в составе вакцины EEV-формы, являющейся важной мишенью для наработки вируснейтрализующих антител, не позволяет сформировать полноценный противооспенный иммунитет, поэтому вакцина LC16m8 не может являться оптимальной для широкого применения [3, 21].

Еще более аттенуированной противооспенной вакциной третьего поколения является вакцинный штамм modified Ankara (MVA) ВОВ, полученный из штамма Ankara путем 570 пассажей на культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов [5, 9]. MVA характеризуется протяженными делециями в терминальных участках генома и неспособностью реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [27]. К настоящему времени вакцина на основе штамма MVA ВОВ (Imvanex/Imvamune), производства Bavarian Nordic, прошла 19 клинических испытаний с 7676 вакцинированными (включая 1070 пациентов с атопическим дерматитом и ВИЧ). Показана индукция профиля антител, аналогичного профилю, индуцируемому классической вакциной первого поколения, и продемонстрирована защита против зоонозных ортопоксвирусов в различных лабораторных животных [11, 26]. Imvanex/Imvamune лицензирована в 32 странах, включая все страны Европы, Канаду и США, и в первую очередь предназначена для пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений.

Основным недостатком данной вакцины является то, что в ее основе используется нереплицирующийся ВОВ, что требует использования более высоких доз и многократной схемы иммунизации, что у некоторых вакцинируемых может вызывать аллергические реакции. Решением данной проблемы является получение живой реплицирующейся высокоаттенуированной вакцины четвертого поколения на основе ВОВ, в геном которого последовательно вводятся делеции по генам вирулентности, не затрагивая гены, обеспечивающие функции размножения вируса.

Противооспенные вакцины четвертого поколения. Современные биотехнологические методы генетической инженерии позволяют получать новые более аттенуированные и эффективные ортопоксвирусные вакцины путем направленного введения делеций и/или вставок в целевые участки ДНК ВОВ [20]. Получение аттенуированного вируса может быть достигнуто нарушением генов, контролирующих защитные реакции организма против вирусной инфекции, генов круга хозяев и генов, участвующих в метаболизме нуклеиновых кислот: белки, связывающие и нейтрализующие интерферон, цитокины и хемокины; белки, ингибирующие апоптоз, или сигнальные пути, необходимые для продукции интерферона и других цитокинов [43].

Противооспенная вакцина четвертого поколения NYVAC, полученная из штамма Copenhagen путем направленной делеции 18 генов: 12 генов от C7L до K1L (район «генов круга хозяев»); B13R/B14R («геморрагический» район); A26L (белок включения типа А); A56R (гемагглютинин); I4L (большая субъединица рибонуклеотид редуктазы) и J2R (тимидинкиназа), характеризовалась значительной аттенуацией, без способности к распространению в иммунодефицитных животных и вызову инфекции у человека [44]. Последующие исследования показали, что штамм NYVAC индуцирует у человека более низкий противооспенный иммунитет в сравнении с классической вакциной на основе штамма Lister или Dryvax, что при его использовании может потребовать неоднократного введения значительно более высоких доз вируса [28].

Наиболее перспективными противооспенными вакцинами четвертого поколения в настоящее время являются вакцинные штаммы 1421ABJCN и LIVPΔ6 ВОВ, полученные из ВОВ штамма LIVP, используемого в Российской Федерации для вакцинации людей, путем направленного последовательного нарушения пяти и шести генов, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*), Bcl2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*), и гена *A35R*, контролирующего презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II [2, 49].

Ранее в независимых экспериментах было показано, что удаление гена *A56R*, кодирующего гемагглютинин, обеспечивающего способность вируса присоединяться к клетке-мишени и активирующего инфекционность вирионов, у различных штаммов ВОВ приводило к снижению вирулентности на несколько порядков по сравнению с исходным родительским вирусом [41]. Ген *N1L*, кодирующий ингибитор апоптоза, не влияет на репродукцию ВОВ на культуре клеток, но также участвует в проявлении

вирулентности вируса *in vivo* [25]. Ген *B8R* кодирует гликопротеин, имеющий сходство с внеклеточным доменом клеточного рецептора гамма-интерферона, делеция которого приводила к аттенуации ВОВ в сравнении с вирусом дикого типа [8]. Нарушение гена *J2R*, кодирующего тимидинкиназу, также приводило к значительному снижению вирулентности вируса *in vivo* [45]. Ген *C3L* кодирует комплемент-связывающий белок, ингибирующий активность системы комплемента через взаимодействие с C3b/C4b и ингибирующий антителозависимую нейтрализацию вирионов ВОВ, усиленную комплементом [19]. Одиночная делеция данного гена приводила к снижению вирулентности исследуемого вируса.

Показано, что рекомбинантный вариант ВОВ 1421ABJCN с пятью направленно-инактивированными генами вирулентности, указанными выше, обладает значительно сниженной реактогенностью и нейровирулентностью по сравнению с исходным штаммом ВОВ LIVP. При этом вакцинный штамм 1421ABJCN сохранил иммуногенные и протективные свойства родительского штамма [49].

Ранее показано, что делеция по гену *A35R* в значительно аттенуированном MVA ВОВ приводила к увеличению иммуногенности вируса [35]. Поэтому с целью усиления иммуногенности и получения более эффективной вакцины на основе штамма 1421ABJCN авторами сконструирован рекомбинантный вариант ВОВ LIVPΔ6 с дополнительной делецией гена *A35R*. Созданный штамм LIVPΔ6 индуцировал достоверно более высокий уровень вируснейтрализующих антител по сравнению с исходным штаммом LIVP и обеспечивал 100 % защиту мышей от инфекции вирусом эктромелии в дозе 100 LD_{50}, что не наблюдалось для родительского штамма [2].

Новый аттенуированный и высокоиммуногенный штамм ВОВ LIVPΔ6 с нарушением шести генов вирулентности в настоящее время проходит доклинические исследования в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» и в дальнейшем может явиться эффективной и безопасной вакциной четвертого поколения против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: KMK Scientific Press Ltd; 1998. 386 с.

2. Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. Высокоиммуногенный вариант аттенуированного вируса осповакцины. *Биохимия, биофизика, мол. биол.* 2016; 466:241–4.

3. Bell E., Shamim M., Whitbeck J.C., Sfyroera G., Lambris J.D., Isaacs S.N. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*. 2004; 325:425–31. DOI: 10.1016/j.virol.2004.05.004.

4. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandel B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:e149–55. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01314.x.

5. Blanchard T.J., Alcami A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol*. 1998; 79:1159–67. DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.

6. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):777–80. DOI: 10.3201/eid1505.090159.

7. Carletti F., Bordi L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis*. 2009; 15(3):499–500. DOI: 10.3201/eid1503.080813.

8. Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. Attenuation of a vaccine strain of vaccinia virus via inactivation of interferon viroceptor. *J. Gene Med*. 2006; 8(7):814–23. DOI: 10.1002/jgm.907.

9. Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:347–52. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-347.

10. Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védy S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(12):1996–9. DOI: 10.3201/eid1912.130256.

11. Earl P.L., Americo J.L., Wyatt L.S., Eller L.A., Whitbeck J.C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Hartmann C.J., Jackson D.L., Kulesh D.A., Martinez M.J., Miller D.M., Mucker E.M., Shamblin J.D., Zwiers S.H., Huggins J.W., Jahrling P.B., Moss B. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature*. 2004; 428(6979):182–5. DOI: 10.1038/nature02331.

12. Fenner F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res. Virol.* 1989; 140(5):465–6.

13. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. World Health Organization: Geneva; 1988. 1460 p.

14. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Meignier B., Garin D., Crance J.M. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine*. 2007; 25(49):8290–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.050.

15. Frey S.E., Newman F.K., Kennedy J.S., Ennis F., Abate G., Hoft D.F., Monath T.P. Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in healthy vaccinia-naive adults. *Vaccine*. 2009; 27(10):1637–44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.079.

16. Hekker A.C., Bos J.M., Rai N.K., Keja J., Cuboni G., Emmet B., Djalins J. Large-scale use of freeze-dried smallpox vaccine prepared in primary ultures of rabbit kidney cells. *Bull. World Health Organ.* 1976; 54(3):279–84.

17. Hirayama M. Smallpox vaccination in Japan. In: Fukumi H., editor. The vaccination theory and practice. Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 1975.

18. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol*. 2015; 173(2):535–9. DOI: 10.1111/bjd.13700.

19. Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(2):628–32.

20. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* 2009; 84(1):1–13. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.

21. Johnson B.F., Kanatani Y., Fujii T., Saito T., Yokote H., Smith G.L. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J. Gen. Virol.* 2011; 92:2405–10. DOI: 10.1099/vir.0.034207-0.

22. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261–3. DOI: 10.3201/

eid2112.150621.

23. Lane J.M., Ruben F.L., Neff J.M., Millar J.D. Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J. Infect. Dis.* 1970; 122(4):303–9.

24. Levine R.S., Peterson A.T., Yorita K.L., Carroll D., Damon I.K., Reynolds M.G. Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PLoS One.* 2007; 2(1):e176. DOI: 10.1371/journal.pone.0000176.

25. Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. Inhibition of apoptosis and NF-κB activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. PLoS Pathog. 2011; 7(12):e1002430. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002430.

26. McCurdy L.H., Larkin B.D., Martin J.E., Graham B.S. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis*. 2004; 38(12):1749–53. DOI: 10.1086/421266.

27. Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:1031–8. DOI: 10.1099/0022-1317-72-5-1031.

28. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89:2992–7. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004440-0.

29. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., Fusco J., Johnson C.S., Buller M., Liu J., Gardner B., Downing G., Blum P.S., Kemp T., Nichols R., Weltzin R. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) – a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. J. Infect. Dis.* 2004; 8:S31–44. DOI: 10.1016/j.ijid.2004.09.002.

30. Morikawa S., Sakiyama T., Hasegawa H., Saijo M., Maeda A., Kurane I., Maeno G., Kimura J., Hirama C., Yoshida T., Asahi-Ozaki Y., Sata T., Kurata T., Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.* 2005; 79(18):11873–91. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.

31. Murphy F.A., Osburn B.I. Adventitious agents and smallpox vaccine in strategic national stockpile. *Emerg. Infect. Dis*. 2005; 11(7):1086–9. DOI: 10.3201/eid1107.050277.

32. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.

33. Parker S., Nuara A., Buller R.M., Schultz D.A. Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol*. 2007; 2(1):17–34. DOI: 10.2217/17460913.2.1.17.

34. Poland G.A., Grabenstein J.D., Neff J.M. The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program. *Vaccine*. 2005; 23(17–18):2078–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.012.

35. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J., Yimbu K., Roper R.L. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology*. 2010; 397(1):176–86. DOI: 10.1016/j.virol.2009.11.008.

36. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.). 2005; 18(1):21–5.

37. Rimoin A.W., Kisalu N., Kebela-Ilunga B., Mukaba T., Wright L.L., Formenty P., Wolfe N.D., Shongo R.L., Tshioko F., Okitolonda E., Muyembe J.J., Ryder R.W., Meyer H. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6): 934–7. DOI: 10.3201/eid1306.061540.

38. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.

39. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011; 29:D49–53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.

40. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.

41. Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R. Effects and virulences of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene. *J. Virol.* 1988; 62(12):4474–80.

42. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308–13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.

43. Smith G.L., Benfield C.T., Maluquer de Motes C., Mazzon M., Ember S.W., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:2367–92. DOI: 10.1099/vir.0.055921-0.

44. Tartaglia J., Cox W.I., Pincus S., Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82:125–9.

45. Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol*. 1991; 72:125–30. DOI: 10.1099/0022-1317-72-1-125.

46. The global eradication of smallpox, final report of the global commission for the certification of smallpox eradication, Geneva, December 1979. World Health Organization: Geneva; 1980.

47. Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahao J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Diseases.* 2009; 48(3):e37–40. DOI: 10.1086/595856.

48. Wiser I., Balicer R.D., Cohen D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. *Vaccine*. 2007; 25(3):976–84. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.09.046.

49. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of Vaccinia Virus. *Acta Naturae*. 2015; 7(4):113–21.

50. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):902–4. DOI: 10.3201/eid1306.061068.

References

1. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. [Pathogenic for Humans Orthopoxviruses]. M.: KMK Scientific Press Ltd.; 1998. 386 p.

2. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. [Highly immunogenic variant of attenuated vaccinia virus]. *Biokhim., Biofiz., Mol. Biol.* 2016; 466:241–4.

3. Bell E., Shamim M., Whitbeck J.C., Sfyroera G., Lambris J.D., Isaacs S.N. Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. *Virology*. 2004; 325:425–31. DOI: 10.1016/j.virol.2004.05.004.

4. Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandel B.S., Chauhan H.C., Singh R.K. Zoonotic infections of buffalopox in India. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:e149–55. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01314.x.

5. Blanchard T.J., Alcami A., Andrea P., Smith G.L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol*. 1998; 79:1159–67. DOI: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.

6. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., Busch U., Sing A. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):777–80. DOI: 10.3201/eid1505.090159.

7. Carletti F., Bordi L., Castilletti C., Di Caro A., Falasca L., Gioia C., Ippolito G., Zaniratti S., Beltrame A., Viale P., Capobianchi M.R. Cat-to-human orthopoxvirus transmission northeastern Italy. *Emerg. Infect. Dis*. 2009; 15(3):499–500. DOI: 10.3201/eid1503.080813.

8. Denes B., Gridley D.S., Fodor N., Takatsy Z., Timiryasova T.M., Fodor I. Attenuation of a vaccine strain of vaccinia virus via inactivation of interferon viroceptor. *J. Gene Med*. 2006; 8(7):814–23. DOI: 10.1002/jgm.907.

9. Drexler I., Heller K., Wahren B., Erfle V., Sutter G. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:347–52. DOI: 10.1099/0022-1317-79-2-347.

10. Ducournau C., Ferrier-Rembert A., Ferraris O., Joffre A., Favier A.L., Flusin O., Van Cauteren D., Kecir K., Auburtin B., Védy S., Bessaud M., Peyrefitte C.N. Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(12):1996–9. DOI: 10.3201/eid1912.130256.

11. Earl P.L., Americo J.L., Wyatt L.S., Eller L.A., Whitbeck J.C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Hartmann C.J., Jackson D.L., Kulesh D.A., Martinez M.J., Miller D.M., Mucker E.M., Shamblin J.D., Zwiers S.H., Huggins J.W., Jahrling P.B., Moss B. Immunogenicity of a highly attenuated MVA smallpox vaccine and protection against monkeypox. *Nature.* 2004; 428(6979):182–5. DOI: 10.1038/nature02331.

12. Fenner F. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res. Virol.* 1989; 140(5):465–6.

13. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *S*mallpox and its eradication. World Health Organization: Geneva; 1988. 1460 p.

14. Ferrier-Rembert A., Drillien R., Meignier B., Garin D., Crance J.M. Safety, immunogenicity and protective efficacy in mice of a new cell-cultured Lister smallpox vaccine candidate. *Vaccine*. 2007; 25(49):8290–7. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.050.

15. Frey S.E., Newman F.K., Kennedy J.S., Ennis F., Abate G., Hoft D.F., Monath T.P. Comparison of the safety and immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in healthy vaccinia-naive adults. *Vaccine*. 2009; 27(10):1637–44. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.079.

16. Hekker A.C., Bos J.M., Rai N.K., Keja J., Cuboni G., Emmet B., Djalins J. Large-scale use of freeze-dried smallpox vaccine prepared

in primary ultures of rabbit kidney cells. *Bull. World Health Organ.* 1976; 54(3):279–84.

17. Hirayama M. Smallpox vaccination in Japan. In: Fukumi H., editor. The vaccination theory and practice. Tokyo: International Medical Foundation of Japan; 1975.

18. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol*. 2015; 173(2):535–9. DOI: 10.1111/bjd.13700.

19. Isaacs S.N., Kotwal G.J., Moss B. Vaccinia virus complement-control protein prevents antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; 89(2):628–32.

20. Jacobs B.L., Langland J.O., Kibler K.V., Denzler K.L., White S.D., Holechek S.A., Wong S., Huynh T., Baskin C.R. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. *Antiviral Res.* 2009; 84(1):1–13. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.

21. Johnson B.F., Kanatani Y., Fujii T., Saito T., Yokote H., Smith G.L. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. *J. Gen. Virol.* 2011; 92:2405–10. DOI: 10.1099/vir.0.034207-0.

22. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmilä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimaa J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261–3. DOI: 10.3201/eid2112.150621.

23. Lane J.M., Ruben F.L., Neff J.M., Millar J.D. Complications of smallpox vaccination, 1968: results of ten statewide surveys. *J. Infect. Dis.* 1970; 122(4):303–9.

24. Levine R.S., Peterson A.T., Yorita K.L., Carroll D., Damon I.K., Reynolds M.G. Ecological niche and geographic distribution of human monkeypox in Africa. *PLoS One.* 2007; 2(1):e176. DOI: 10.1371/journal.pone.0000176.

25. Maluquer de Motes C., Cooray S., Ren H., Almeida G.M., McGourty K., Bahar M.W., Stuart D.I., Grimes J.M., Graham S.C., Smith G.L. Inhibition of apoptosis and NF-κB activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. PLoS Pathog. 2011; 7(12):e1002430. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002430.

26. McCurdy L.H., Larkin B.D., Martin J.E., Graham B.S. Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis*. 2004; 38(12):1749–53. DOI: 10.1086/421266.

27. Meyer H., Sutter G., Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 1991; 72:1031–8. DOI: 10.1099/0022-1317-72-5-1031.

28. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. Vaccinia virus strain NYVAC induces substantially lower and qualitatively different human antibody responses compared with strains Lister and Dryvax. *J. Gen. Virol.* 2008; 89:2992–7. DOI: 10.1099/vir.0.2008/004440-0.

29. Monath T.P., Caldwell J.R., Mundt W., Fusco J., Johnson C.S., Buller M., Liu J., Gardner B., Downing G., Blum P.S., Kemp T., Nichols R., Weltzin R. ACAM2000 clonal Vero cell culture vaccinia virus (New York City Board of Health strain) – a second-generation smallpox vaccine for biological defense. *Int. J. Infect. Dis.* 2004; 8:S31–44. DOI: 10.1016/j.ijid.2004.09.002.

30. Morikawa S., Sakiyama T., Hasegawa H., Saijo M., Maeda A., Kurane I., Maeno G., Kimura J., Hirama C., Yoshida T., Asahi-Ozaki Y., Sata T., Kurata T., Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.* 2005; 79(18):11873–91. DOI: 10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.

31. Murphy F.A., Osburn B.I. Adventitious agents and smallpox vaccine in strategic national stockpile. *Emerg. Infect. Dis*. 2005; 11(7):1086–9. DOI: 10.3201/eid1107.050277.

32. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781–4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.

33. Parker S., Nuara A., Buller R.M., Schultz D.A. Human monkeypox: an emerging zoonotic disease. *Future Microbiol*. 2007; 2(1):17–34. DOI: 10.2217/17460913.2.1.17.

34. Poland G.A., Grabenstein J.D., Neff J.M. The US smallpox vaccination program: a review of a large modern era smallpox vaccination implementation program. *Vaccine*. 2005; 23(17–18):2078–81. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.012.

35. Rehm K.E., Connor R.F., Jones G.J., Yimbu K., Roper R.L. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. *Virology*. 2010; 397(1):176–86. DOI: 10.1016/j.virol.2009.11.008.

36. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.). 2005; 18(1):21–5.

37. Rimoin A.W., Kisalu N., Kebela-Ilunga B., Mukaba T., Wright L.L., Formenty P., Wolfe N.D., Shongo R.L., Tshioko F., Okitolonda E., Muyembe J.J., Ryder R.W., Meyer H. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6): 934–7. DOI: 10.3201/eid1306.061540.

38. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37):16262–7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.

39. Shchelkunov S.N. Emergence and reemergence of smallpox: the need in development of a new generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2011; 29:D49–53. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.037.

40. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.

41. Shida H., Hinuma Y., Hatanaka M., Morita M., Kidokoro M., Suzuki K., Maruyama T., Takahashi-Nishimaki F., Sugimoto M., Kitamura R. Effects and virulences of recombinant vaccinia viruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene. *J. Virol.* 1988; 62(12):4474–80.

42. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308–13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.

43. Smith G.L., Benfield C.T., Maluquer de Motes C., Mazzon M., Ember S.W., Ferguson B.J., Sumner R.P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J. Gen. Virol.* 2013; 94:2367–92. DOI: 10.1099/vir.0.055921-0.

44. Tartaglia J., Cox W.I., Pincus S., Paoletti E. Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82:125–9.

45. Taylor G., Stott E.J., Wertz G., Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of vaccinia virus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol*. 1991; 72:125–30. DOI: 10.1099/0022-1317-72-1-125.

46. The global eradication of smallpox, final report of the global commission for the certification of smallpox eradication, Geneva, December 1979. World Health Organization: Geneva; 1980.

47. Trindade G.S., Guedes M.I., Drumond B.P., Mota B.E., Abrahao J.S., Lobato Z.I., Gomes J.A., Corrêa-Oliveira R., Nogueira M.L., Kroon E.G., da Fonseca F.G. Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Diseases.* 2009; 48(3):e37–40. DOI: 10.1086/595856.

48. Wiser I., Balicer R.D., Cohen D. An update on smallpox vaccine candidates and their role in bioterrorism related vaccination strategies. *Vaccine*. 2007; 25(3):976–84. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.09.046.

49. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Attenuation of Vaccinia Virus. *Acta Naturae*. 2015; 7(4):113–21.

50. Zafar A., Swanepoel R., Hewson R., Nizam M., Ahmed A., Husain A., Grobbelaar A., Bewley K., Mioulet V., Dowsett B., Easterbrook L., Hasan R. Nosocomial buffalopoxvirus infection, Karachi, Pakistan. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(6):902–4. DOI: 10.3201/eid1306.061068.

Authors:

Maksyutov R.A. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Об авторах:

Максютов Р.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Поступила 29.07.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:78–80. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-78-80**

УДК 616.98:579.841.93

Л.М.Михайлов, Н.Л.Баранникова, Л.Е.Токарева, Н.М.Андреевская, В.А.Михайлова, В.И.Кузнецов, К.Ю.Ястремская, С.В.Балахонов

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ БРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ANTI-ABORTUS СЫВОРОТКИ НА ОСНОВЕ ТЕРМОЭКСТРАКТА ИЗ БРУЦЕЛЛ В S-ФОРМЕ

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

Цель работы. Получение кроличьей моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки к термоэкстракту из бруцелл в S-форме, оценка ее активности и специфичности. **Материалы и методы.** В работе использовали поливалентную гипериммунную бруцеллезную сыворотку, полученную к термоэкстракту, которую адсорбировали штаммом гетерологичного вида *Brucella melitensis* 16М. Для оценки активности и специфичности полученной сыворотки использовали референтные, вакцинные и полевые штаммы бруцелл. **Результаты и выводы.** Полученная сыворотка обладала высокой активностью (титр 1:160, 1:320) и специфичностью, а результаты полностью совпадают с данными, указанными в таблице дифференциальных свойств, представленными в МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей». Предложенный способ приготовления моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки позволяет значительно снизить биологическую опасность для персонала при проведении технологических операций.

Ключевые слова: бруцеллы, термоэкстракт, S-форма, моноспецифическая сыворотка.

Корреспондирующий автор: Михайлов Леонид Михайлович, e-mail: E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.M.Mikhailov, N.L.Barannikova, L.E.Tokareva, N.M.Andreevskaya, V.A.Mikhailova, V.I.Kuznetsov, K.Yu.Yastremskaya, S.V.Balakhonov

Preparation of Monospecific Brucella Anti-Abortus Serum Based on Thermoextract From S-Form *Brucella*

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

Objective of the study is to prepare rabbit monospecific anti-abortus serum to a *Brucella* S-form thermoextract, as well as to evaluate its activity and specificity. **Materials and methods**. Utilized was polyvalent hyperimmune serum obtained to *Brucella* thermoextract. It was adsorbed by a strain of heterologous species *Brucella melitensis* 16 N. Reference, vaccinal and field *Brucella* strains were used to estimate the activity and specificity of the serum produced. **Results and conclusions**. This serum possesses high activity (1:160, 1:320 titer) and specificity, and the results completely coincide with the data specified in the table of differential properties presented in MR 3.1.7.1189-03 “Prophylaxis and laboratory diagnostics of human brucellosis». The outlined method for manufacturing monospecific *Brucella* anti-abortus serum permits for a considerable decrease in biological hazard for personnel involved in the technological operations.

Key words: Brucella, thermoextract, S-form, monospecific serum.

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

Corresponding author: Leonid M. Mikhailov, e-mail: E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mikhailov L.M., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Kuznetsov V.I., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Monospecific Brucella Anti-Abortus Serum Based on Thermoextract From S-Form *Brucella*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:78–80. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-78-80

Моноспецифическая бруцеллезная сыворотка anti-abortus используется при дифференциации видов бруцелл [4]. Известно, что моноспецифическую бруцеллезную anti-abortus сыворотку готовят с использованием эталонного штамма ФАО/ВОЗ – *Brucella abortus* 544 или вакцинного – *B. abortus* 19ВА, живыми культурами которых иммунизируют кроликов (внутривенно однократно суспензией клеток в разных концентрациях). Полученную антисыворотку адсорбируют штаммом *B. melitensis* 16М, *B. melitensis* 28 или *B. melitensis* 548. Титры специфических антител в полученных моноспецифических бруцеллезных anti-abortus сывороток при этом составляли 1:160–1:640 [1, 2]. Основным недостатком этих методов является использование для получения бруцеллезной антисыворотки живой культуры вирулентного штамма возбудителя, что требует соблюдения на разных этапах работы специальных мер для обеспечения требований биобезопасности персонала. Все бруцеллы, в том числе и вакцинный штамм, который обладал остаточной вирулентностью, способны вызывать иммуноаллергические реакции. Поэтому поиск слабовирулентных штаммов или специфических бруцеллезных антигенов для получения высокотитражной антисыворотки, пригодной для получения после ее адсорбции моноспецифических сывороток, а также снижение биологической опасности при проведении технологических приемов работ являются актуальными.

Цель исследования – получение кроличьей моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки к термоэкстракту из бруцелл в S-форме, оценка ее активности и специфичности.

Материалы и методы

Донорами гипериммунной сыворотки служили кролики породы шиншилла из лаборатории подопытных животных Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Термоэкстракт готовили в соответствии с патентом [3].

Иммунизацию животных осуществляли по двухцикловой схеме, что позволило получить антисыворотку с высоким титром специфических антител 1:1600–1:3200. По отработанной ранее в лаборатории методике для получения моноспецифической anti-abortus сыворотки гипериммунную сыворотку адсорбировали штаммом гетерологичного вида *B. melitensis* 16М. Трехсуточную культуру штамма смывали ЗФР (рН 7,2±0,1) и добавляли до 2,5 % формалина, взвесь оставляли при (20±2) °С в течение 24 ч. Проводили контроль на специфическую стерильность. Бактериальную массу центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сливали, и ЗФР (рН 7,2±0,1) доводили концентрацию бактериальной взвеси до $5 \cdot 10^{11}$ м.к./мл. Полученную бактериальную взвесь в количестве 0,25 мл однократно добавляли в 2,5 мл сыворотки и оставляли на два часа при 37 °С, помешивая через каждые 15 мин, после чего выдерживали 15 ч при (20±2) °С. Затем сыворотку центрифугировали при 6000 об./мин в течение 20 мин и удаляли осадок. После адсорбции проверяли тиры специфических антител в объемной реакции агглютинации (РА).

В качестве контроля моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки использовали референтные, вакцинные и полевые штаммы бруцелл из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института и выделенные от людей.

Результаты и обсуждение

Для поиска однократного оптимального количества адсорбента, приготовленного из *B. melitensis* 16М и добавляемого в 2,5 мл адсорбируемой бруцеллезной сыворотки для получения моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки, испытали три серии сывороток и четыре дозы адсорбента.

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что полная адсорбция антисывороток во всех трех сериях получена при дозах адсорбента, составляющих от 0,15 до 0,25 мл. При дозе адсорбента 0,1 мл отмечены положительные реакции на один–два креста в разведении 1:20. Наибольшие титры специфических anti-abortus антител зарегистрированы при добавлении 0,15 мл адсорбента: серия 1 – 1:320, серия 2 – 1:640, серия 3 – 1:160. В наших, ранее проведенных опытах показано, что полное истощение бруцеллезной антисыворотки, полученной иммунизацией кроликов живыми клетками бруцелл вида *abortus*, адсорбентом из штамма *B. melitensis* 16М происходило при использовании дозы не менее 0,25 мл на 2,5 мл сыворотки. Поэтому следует отметить, что при получении бруцеллезной кроличьей сыворотки иммунизацией инактивированным антигеном – термоэкстрактом из *B. abortus* 544, для полной адсорбции требуется меньшее количество (0,15 мл) адсорбента, при этом моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка имеет высокую специфичность и активность.

Полученная моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка испытана с 11 штаммами бруцелл трех основных видов (*melitensis, abortus, suis)* и некоторых их биоваров, а также с 9 культурами, выделенными от больных бруцеллезом людей.

Таблица 1

Активность моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки после адсорбции гетерологичным штаммом *B. melitensis* 16М

Сыворотка бруцеллезная кроличья (anti-abortus) серия, титр	Доза абсорбента *B. melitensis* 16М, мл	Активность моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки в РА															
		B. melitensis 16М								*B. abortus* 544							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	КС	КА	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	КС	КА
Серия 1, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–	–	++++	++++	++++	++	+	–	–	–
	0,2	–	–	–	–	–	–	–		++++	++++	++++	+++	–	–	–	
	0,15	–	–	–	–	–	–	–		++++	++++	++++	++++	+++	+	–	
	0,1	++	+	–	–	–	–	–		++++	++++	++++	++++	+++	++	–	
Серия 2, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–		++++	++++	+	–	–	–	–	
	0,2	–	–	–	–	–	–	–		++++	++++	+++	+++	++	+	–	
	0,15	–	–	–	–	–	–	–		++++	++++	++++	+++	++	++	–	
	0,1	+	–	–	–	–	–	–		++++	++++	+++	++	+	+	–	
Серия 3, 1:1600	0,25	–	–	–	–	–	–	–		++	++	+	±	–	–	–	
	0,2	–	–	–	–	–	–	–		++++	+++	++	++	+	+	–	
	0,15	–	–	–	–	–	–	–		++++	+++	+++	++	+	+	–	
	0,1	+	–	–	–	–	–	–		++++	+++	+++	++	+	+	–	

Примечания: «++++», «+++», «++», «+», «±» – выраженность реакции в крестах, «–» – результат отрицательный.

Таблица 2

Специфичность моноспецифической бруцеллезной сыворотки anti-abortus в РА

Наименование штамма	Биовар	Моноспецифическая бруцеллезная сыворотка anti-abortus	Контроль сыворотки	Контроль антигена
B. melitensis 16M*	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis REV-1*	Вакцина	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis Ether*	3	1:80	Отр.	Отр.
B. abortus 19 BA*	Вакцина	1:160	Отр.	Отр.
B. abortus Tulya*	3	1:160	Отр.	Отр.
B. abortus 793*	3	1:160	Отр.	Отр.
B. abortus 86/8159*	2	1:160	Отр.	Отр.
B. abortus 292*	4	1:160	Отр.	Отр.
B. suis 1330*	1	1:80	Отр.	Отр.
B. suis 686*	3	1:80	Отр.	Отр.
B. suis (rangiferi) 181*	4	1:80	Отр.	Отр.
B. melitensis 239**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 240**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 241**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 9**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 17**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 19**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 33**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 34**	1	Отр.	Отр.	Отр.
B. melitensis 349**	3	1:80	Отр.	Отр.

*Штаммы из музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института; **Штаммы, выделенные от людей.

Примечание: Отр. – реакция отрицательная.

Полученные при испытании результаты, представленные в табл. 2, говорят о том, что моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка взаимодействовала с бруцеллами в соответствии с требованиями МУ 3.1.7.1189-03 «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» и полностью совпадают с данными, указанными в таблице, отражающей дифференциальные свойства, определяемые этим методом.

Таким образом, получение моноспецифической бруцеллезной anti-abortus сыворотки путем адсорбции антисыворотки, приготовленной с использованием для иммунизации кроликов инактивированного термоэкстракта из бруцелл в S-форме, позволяет значительно снизить биологическую опасность для персонала при проведении технологических операций.

Моноспецифическая бруцеллезная anti-abortus сыворотка, полученная по предлагаемой методике, обладает высокой специфичностью и активностью и может быть использована для внутривидовой дифференциации бруцелл.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вилинская С.В., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Русанова Д.В. Способ получения бруцеллезной моноспецифической сыворотки anti-abortus. Патент РФ 2375074, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.

2. Дальвадянц В.Г., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Таран И.Ф., Луканина Л.М. Способ получения моноспецифических сывороток для дифференциации возбудителя бруцеллеза. Патент РФ 2104031, опубл. 10.02.1998.

3. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Козулина К.Ю., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Кузнецов В.И. Способ получения антигенного препарата из бруцелл в L-форме. Патент РФ 2416429, опубл. 20.04.2011. Бюл. № 11.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

References

1. Vilinskaya S.V., Lyamkin G.I., Lyapustina L.V., Rusanova D.V. [Method for the production of brucellosis monospecific anti-abortus serum]. RF Patent 2375074, 10.12.2009.

2. Dal'vadyants V.G., Lyamkin G.I., Lyapustina L.V., Taran I.F., Lukanina L.M. [Method for the production of monospecific sera for differentiation of brucellosis agent]. RF Patent 2104031, 10.02.1998.

3. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Balakhonov S.V., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Kozulina K.Yu., Shestopalov M.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Kuznetsov V.I. [Method for the production of antigen preparation from L-form brucella]. RF Patent 2416429, 20.04.2011.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2nd Edition, revised and enlarged. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.

Authors:

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

Об авторах:

Михайлов Л.М., Баранникова Н.Л., Токарева Л.Е., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Кузнецов В.И., Ястремская К.Ю., 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 19.07.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:81–83. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83**

УДК 616.98:579.841.95

О.А.Волох, М.В.Антонычева, Н.Г.Авдеева, Е.М.Кузнецова, К.И.Холматов, Д.Н.Бибиков, А.К.Никифоров

ЖИДКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

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

В работе представлена эффективная жидкая питательная среда, использование которой позволяет при глубинном культивировании вакцинного штамма туляремийного микроба получать высокие концентрации жизнеспособной биомассы с низкой степенью диссоциации, что актуально при производстве живых вакцин. В качестве питательной основы новой питательной среды использовали сухой ферментативный гидролизат фибрина, приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: Francisella tularensis, питательная среда, культивирование.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

O.A.Volokh, M.V.Antonycheva, N.G.Avdeeva, E.M.Kuznetsova, K.I.Kholmatov, D.N.Bibikov, A.K.Nikiforov

Liquid Nutrient Medium for Submerged Cultivation of Tularemia Microbe

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

The paper describes an effective liquid nutrient medium, utilization of which in the process of submerged cultivation of the vaccine tularemia microbe strain allows for the production of high concentrations of viable biomass with low rates of dissociation, which is essential in manufacturing of live vaccines. Dry enzymatic hydrolysate of fibrin, by-product of anti-rabies immunoglobulin production is used as a nutrient-rich base of the new nutrient medium.

Key words: *Francisella tularensis*, nutrient medium, cultivation.

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

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmatov K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Liquid Nutrient Medium for Submerged Cultivation of Tularemia Microbe. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:81–83. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83

Живая туляремийная вакцина (ЖТВ) является основным профилактическим средством против туляремии – опасной природно-очаговой болезни. Штаммом-продуцентом ЖТВ является штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Он же используется для изготовления диагностических препаратов. Для производства данных иммунобиологических препаратов необходимо получение большого количества биомассы, обладающей характерными свойствами. В связи с этим актуальной задачей остается конструирование новых эффективных питательных сред для глубинного культивирования, позволяющего масштабировать процесс производства.

Для выращивания туляремийных бактерий в условиях глубинного культивирования с аэрацией в практике изготовления живой вакцины применяют полужидкие среды. Но эффективность полужидких сред невелика: после 18 ч выращивания густота взвеси увеличивается в 5–6 раз [6]. Последними исследованиями зарубежных авторов подтверждена эффективность жидкой питательной среды Т [4] для анализа образцов окружающей среды и клинических изолятов на присутствие возбудителя туляремии [7], но ее применение в качестве производственной среды экономически нецелесообразно. Экспериментальные жидкие питательные среды для глубинного культивирования вакцинного штамма туляремийного микроба в условиях биореактора основаны на гидролизатах рыбокостной муки с добавлением солей, витаминов, глюкозы [5] и экстракта пекарских дрожжей [3].

Цель работы – разработка питательной среды для накопления биомассы, пригодной для получения иммунобиологических препаратов (в т.ч. живой туляремийной вакцины).

В качестве основы питательной среды в нашей работе использовали панкреатический гидролизат рыбокостной муки (ПГРМ) (ГНЦ ПМБ, Оболенск), экстракт пекарских дрожжей (ЭПД) (Serva), экспериментальный ферментативный гидролизат фибрина (ФГФ), приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина. В качестве дополнительных компонентов – глюкозу, глюкозо-витаминную добавку (ГВД) (ГНЦ ПМБ, Оболенск), соли кальция (глюконат и пантотенат), цистеин, хлорид натрия.

Технология приготовления жидкого ферментативного гидролизата фибрина приведена в патенте RU 2425866 [1]. Жидкую форму ферментативного гидролизата фибрина концентрировали в 6–7 раз ме-

тодом выпаривания на установке вакуум-выпарной УВВ-50 и высушивали конвекционным способом на сушильной установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002 в «псевдокипящем слое». По агрегатному состоянию высушенный ферментативный гидролизат фибрина представлял собой мелкодисперсный порошок с нежно-желтым оттенком. При анализе физико-химических показателей определено: содержание общего азота – (4,76±0,03) %; аминного азота – (1,39±0,03) %; процент расщепления белка – (50,7±1,7) %; содержание пептона (по шкале Дифко) – (53,7±1,5) %; следы непереваренного белка отсутствовали; сухой остаток – (8,78±0,2) %; хлориды – (0,22±0,01) %; влажность – (2,4±0,2) %; pH – 6,9±0,2, что соответствует требованиям, предъявляемым к сухим основам питательных сред (МУК 4.2.2316-08).

В качестве модельного штамма использовали *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий. Концентрацию биомассы определяли по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития (эквивалентной концентрации 5 млрд м.к./мл) и турбидиметрическим методом при OD 600 нм. Стабильность биологических свойств туляремийного микроба, в том числе коэффициент жизнеспособности (К %) и степень диссоциации, оценивали по стандартной методике (МУ 3.3.2.2124-06).

Эффективность жидких экспериментальных питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе и в биореакторе с автоматическим поддержанием параметров культивирования. Объем питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, температура культивирования 37 °С, скорость вращения платформы – 200 об./мин, время культивирования (24±1) ч. Параметры культивирования в биореакторе с рабочим объемом 14 л – аэрация 0,5–0,7 л воздуха на 1 л питательной среды, скорость перемешивания 500 об./мин в течение (20±2) ч при температуре 37 °С.

На первом этапе установлено, что лимитирующим фактором ростовых свойств экспериментальных сред является содержание аминного азота. Оптимальное значение этого показателя должно быть в пределах 0,320–0,430 %. При более высоком или низком содержании аминного азота рост туляремийного микроба резко ограничивается, что согласуется с литературными данными [3]. Питательная среда на основе панкреатического гидролизата рыбокостной муки оказалась менее эффективной по показателям жизнеспособности культуры и прироста биомассы.

На следующем этапе оценивали влияние питательной основы экспериментальной среды на рост вакцинного штамма и жизнеспособность субпопуляций. Использовали среду 1 (на основе экстракта пекарских дрожжей) и среду 2 (на основе ферментативного гидролизата фибрина). В качестве источника углеводов в обоих случаях применяли глюкозу. При культивировании на экспериментальной среде 1 отмечено значительное удлинение лаг-фазы до 18 ч, уменьшение урожайности с сохранением высокой жизнеспособности культуры. Для среды 2 была отмечена высокая скорость накопления биомассы в экспоненциальную фазу в сочетании с высоким (72±3,5 %) коэффициентом жизнеспособности. Два пика в стационарной фазе роста (20 и 24 ч культивирования) на этой среде могут быть связаны с исчерпанием одного лимитирующего субстрата и адаптацией ферментных систем клеток к другому субстрату.

На следующем этапе использовали экспериментальную среду на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина (среда 2), которую готовили согласно патенту RU № 2518282 [2]. Основные компоненты среды: гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, pH 7,2. Бульон фильтровали через каскад последовательно соединенных фильтров ЭПВг.П-050-Д-250 и ЭПМ.К–080/045-Д-250М при температуре фильтруемой среды (60±5) °С и рабочем давлении 0,15 МПа, затем стерилизовали при (110±2) °С в течение 30 мин.

Согласно литературным данным, для туляремийного микроба в качестве стимуляторов роста широко используют соли кальция, натрия, аминокислоты [3, 4]. Перед внесением инокулята посевной культуры в стерильную среду мы добавляли стерильные растворы солей и аминокислот. При добавлении солей кальция более эффективным оказался пантотенат кальция (витамин В5). В частности, показатель прироста биомассы при введении 0,005 % раствора пантотената кальция составил 291,2 %, а при добавлении глюконата кальция – 86,7 %, жизнеспособность выращенной культуры была выше в первом случае на 25 %. Влияние хлорида натрия и цистеина на эффективность экспериментальной питательной среды оценивали на варианте среды, содержащей 0,005 % пантотената кальция. Добавление цистеина (0,05–0,1 %) резко увеличивало прирост биомассы и урожайность (до 133,5±3 млрд м.к./мл), но значительно снижало жизнеспособность (до 44 %). При добавлении хлорида натрия (0,5 %) жизнеспособность культуры увеличивалась до 96,8 %, хотя прирост биомассы был меньше (163,5 %), что может в дальнейшем использоваться для синхронизации культуры. При добавлении и цистеина и хлорида натрия прирост биомассы снижался (до 100 %), жизнеспособность оставалась высокой (94,6 %), показатель степени диссоциации оставался на низком уровне: количество иммуногенных (белых) колоний составляло (96±2) %.

Сконструированная жидкая питательная среда на основе сухого гидролизата фибрина с добавлением глюкозы и цистеина, солей кальция и натрия, pH (7,2±0,1), была апробирована при аппаратном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В каче-

стве посевного материала использовали 48-часовую агаровую культуру, начальная концентрация клеток была (0,5±0,1) млрд м.к. в 1 мл среды. Время культивирования составило (20±2) ч, в качестве подкормки использовали раствор глюкозы. После окончания процесса культивирования в биореакторе нативная культура *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: pH (7,0±0,1), концентрация микробных клеток (37±0,5) млрд м.к. в 1 мл среды, коэффициент жизнеспособности составил (68±0,5) %. Отмечена низкая степень диссоциации – (97±1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Таким образом, разработанная нами жидкая питательная среда позволяет получать жизнеспособную биомассу туляремийного микроба с высокой концентрацией и низкой степенью диссоциации, что эффективно при выращивании штамма-продуцента живой туляремийной вакцины.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.А., Шульгина И.В., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент RU № 2425866 РФ, опубл.10.08.11 г. Бюл. № 22.

2. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент RU № 2518282, опубл. 10.06.14. Бюлл. № 16.

3. Лапин А.А., Павлов В.М., Домотенко Л.В., Храмов М.В., Мокриевич А.Н. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 102:66–7.

4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. *Антибиотики и мед. биотехнология.* 1987; 32:133–7.

5. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М. Способ получения биомассы туляремийного микроба. Патент RU № 2451743, опубл. 27.05.12. Бюл. № 15.

6. Becker S., Lochau P., Jacob D., Heuner K., Grunow R. Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 2016; 121:5–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.11.018.

References

1. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.A., Shul'gina I.V., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of cholera viobrio]. RF Patent No 2425866, 10.08.2011.

2. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, 10.06.2014.

3. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 102:66–7.

4. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. [Transparent nutrient medium for *Francisella tularensis* cultivation]. *Antibiotiki i Med. Biotekhnol*. 1987; 32:133–7.

5. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremin S.A., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M. [Method for the production of biomass of tularemia microbe]. RF Patent No 2451743, 27.05.2012.

6. Becker S., Lochau P., Jacob D., Heuner K., Grunow R. Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 2016; 121:5–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.11.018.

Authors:

Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmatov K.I., 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., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 19.12.16.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 2:84–86. **DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-84-86**

УДК 616.98:579.852.11

Т.А.Севских, Ю.О.Селянинов, И.Ю.Егорова

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ВАКЦИННОГО ШТАММА 55-ВНИИВВИМ И БЕСКАПСУЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS ANTHRACIS* 363/11

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» Россельхозакадемии, Владимирская обл., п. Вольгинский, Российская Федерация

Основной целью работы было определение протективных свойств и безопасности для животных естественно аттенуированного бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 и оценка возможности его использования в качестве кандидатного для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской язвы. Для сравнительного изучения протективных свойств использовали вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ, применяемый для обеспечения благополучия по сибирской язве животных на территории России. С использованием стандартных методик на модели лабораторных (белые мыши, морские свинки) и целевых животных (овцы) определяли показатели $ЛД_{50}$, $ИмД_{50}$ и протективную эффективность. Установлено, что авирулентный для белых мышей штамм *B. anthracis* 363/11 обладает иммуногенной и протективной эффективностью, превышающими таковые для штамма 55-ВНИИВВиМ. Штамм стабилен и не реверсирует к вирулентному варианту при пассировании на питательных средах и через организм восприимчивых животных. Это дает основание для того, чтобы рассматривать штамм *B. anthracis* 363/11 в качестве кандидатного вакцинного, применение которого будет способствовать улучшению эпизоотической ситуации по сибирской язве в РФ.

Ключевые слова: сибирская язва, иммуногенная активность, протективность, кандидатная вакцина.

Корреспондирующий автор: Севских Тимофей Александрович, e-mail: sefskih@mail.ru.

T.A.Sevskikh, Yu.O.Selyaninov, I.Yu.Egorova

Protective Properties of the Vaccine Strain 55-VNIIVViM and Acapsular Strain *Bacillus anthracis* 363/11

National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Science, Vladimir region, Volginsky, Russian Federation

Objective of the work was to determine protective potential and safety for animals of the naturally attenuated *B. anthracis* 363/11 monoplazmid non-capsular strain to be used as a new candidate vaccine strain for the development and enhancement of specific prophylaxis of anthrax. **Materials and methods.** Vaccine strain 55-VNIIVViM that is used for welfare provision as regards anthrax in animals in the territory of Russia was employed for the comparison of protective properties. Identification of LD_{50}, ImD_{50} and protective efficacy was carried out using standard protocols for modeling the infection on laboratory (white mice, guinea pigs) and targeted (sheep) animals. **Results and conclusions.** It is established that avirulent for white mice *B. anthracis* 363/11 strain demonstrates higher protective and immunogenic activity than 55-VNIIVViM strain. It does not reverse to the virulent variant after passaging on the nutrient media and in the organism of susceptible animals. Thus it allows for considering *B. anthracis* 363/11 strain as a promising candidate vaccine strain, the utilization of which will improve epizootic situation on anthrax in the Russian Federation.

Key words: *B. anthracis*, immunogenic activity, protectivity, candidate vaccine.

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

Funding: The study is financially supported by the Federal Agency for Scientific Organizations within the frames of the research project under the No 0615-2016-0001.

Corresponding author: Timofei A. Sevskikh, e-mail: sefskih@mail.ru.

Citation: Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. Protective Properties of the Vaccine Strain 55-VNIIVViM and Acapsular Strain *Bacillus anthracis* 363/11. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2017; 2:84–86. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-84-86

Основным требованием, предъявляемым к сибиреязвенным вакцинным штаммам, является обеспечение ими 80–100 % уровня защиты привитых лабораторных животных против заражения референтными вирулентными культурами сибиреязвенного микроба [4]. Вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и 55-ВНИИВВиМ, используемые для вакцинации в медицинской и ветеринарной практике, соответствуют данным требованиям. Однако, согласно литературным и экспериментальным данным, отдельные штаммы, выделяемые из почвы скотомогильников или во время вспышек болезни у человека и животных [2], а также рекомбинантные штаммы, приобретшие новые свойства в результате генетических манипуляций, обладают способностью преодолевать иммунитет, индуцированный этими вакцинами [3] и, соответственно, снижать эффективность противосибиреязвенных мероприятий. Для повышения защитных свойств сибиреязвенных вакцин и формирования ими более выраженного иммунного ответа необходимо, чтобы в составе новых вакцинных препаратов был наиболее полно представлен спектр антигенов, антитела к которым принимают участие в формировании напряженного иммунитета против изолятов, способных преодолевать иммунитет. Решить эту проблему можно несколькими путями: созданием рекомбинантных штаммов и штаммов-продуцентов антигенов с использованием

генно-инженерных технологий, конструированием бивалентных вакцин, аттенуацией вирулентных штаммов, способных преодолевать иммунитет, с сохранением их антигенных особенностей и поиском новых кандидатных штаммов, отличающихся от известных набором фенотипических свойств и продуцируемых антигенов. В связи с изложенным нами было проведено сравнительное изучение протективных свойств нового бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 и известного вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ с целью определения возможности использования первого из них в качестве кандидатного для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской язвы.

В работе использовали споровые культуры вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11, выделенного от павшего подсвинка. Сравнительную оценку протективных свойств и напряженности индуцируемого иммунитета изучали в экспериментах на морских свинках и овцах с использованием капсулообразующих референс-заражающих штаммов (II вакцина Ценковского – *B. anthracis* 71/12, II вакцина Пастера – *B. anthracis* 17JB, вирулентный штамм *B. anthracis* 76), капсулообразующего вакцинного штамма (Carbovax) и полевых изолятов (*B. anthracis* 81, 304, 364), выделенных в Казахской АССР, Алтайском крае и Тульской области в 1974, 1989 и 2011 гг. соответственно. Изменение показателя $ЛД_{50}$ в процессе пассирования штамма *B. anthracis* 363/11 *in vitro* изучали в опытах на белых аутбредных мышах. Все штаммы/изоляты получены из Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Иммуногенную активность штаммов оценивали на клинически здоровых морских свинках массой 350–400 г количественным методом ($ИД_{50}$). Из споровых суспензий штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 готовили разведения с содержанием 10^7, $2\cdot10^6$, $4\cdot10^5$, $8\cdot10^4$, $1{,}6\cdot10^4$ живых спор в 0,5 $см^3$. Материал каждого из разведений инокулировали подкожно в область живота в объеме 0,5 $см^3$ 7–8 особям. Через 21 сут после иммунизации по 6 голов животных из каждой группы и 6 интактных морских свинок заражали культурами сибиреязвенных штаммов в дозе 200 $ЛД_{50}$. Расчет показателей $ИД_{50}$ проводили в соответствии с ГОСТ Р 52616-2006 «Вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ живая».

Протективную эффективность штаммов изучали на клинически здоровых морских свинках массой 300–400 г. Животных 7 групп по 12 голов в каждой иммунизировали споровой суспензией вакцинного штамма *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и аналогичное количество морских свинок – испытуемого штамма *B. anthracis* 363/11 в дозе 10^7 спор. Через 21 сут после иммунизации животных различных групп (по 10 голов в каждой) заражали капсулообразующими вакцинными штаммами и полевыми изолятами в дозе 200 $ЛД_{50}$. Наблюдение за животными и учет их гибели проводили в течение 10 дней после заражения.

Показатель вирулентности ($ЛД_{50}$) для культур исследуемого штамма определяли на белых аутбредных мышах массой 18–20 г. Из мышей формировали 5 групп по 6 голов в каждой. Животным опытных групп подкожно вводили по 0,5 $см^3$ споровых суспензий штамма с концентрациями $2\cdot10^8$, $4\cdot10^7$, $8\cdot10^6$, $1{,}6\cdot10^6$, $3{,}2\cdot10^5$ спор в 1 мл. Наблюдение за мышами и учет их гибели проводили в течение 10 дней. Величину $ЛД_{50}$ рассчитывали по формуле Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А. Воробьева.

Работу с животными проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987).

Ранее при проведении работ по паспортизации сибиреязвенных штаммов было установлено, что культура бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 обладает высокой иммуногенностью, низкой реактогенностью и отличается по фенотипическим признакам от отечественных вакцинных штаммов (обладает высокой протеолитической и гемолитической активностями, поглощает конго красного из среды, синтезирует протокатеховую кислоту) [1], что и обусловило выбор объекта исследований.

При последующем проведении сравнительного изучения на морских свинках иммуногенной активности штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 установлено, что значение $ИД_{50}$ для штамма 55-ВНИИВВиМ против заражения споровыми культурами капсулообразующих штаммов *B. anthracis* 71/12 и Carbovax в дозе 200 $ЛД_{50}$ составило $2{,}9\cdot10^5$ и $3{,}4\cdot10^5$ спор, в то время как аналогичные показатели $ИД_{50}$ для штамма *B. anthracis* 363/11 были значительно ниже и составили $2{,}95\cdot10^4$ и $1{,}55\cdot10^5$ спор соответственно.

На следующем этапе изучен спектр протективной эффективности штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 в экспериментах на различных биологических моделях (морские свинки и овцы) с использованием как культур референс-заражающих штаммов, так и полевых изолятов. Установлено, что введение морским свинкам суспензий спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и кандидатного штамма 363/11 в дозе 10^7 спор предохраняло от гибели 80–100 % животных, зараженных споровыми культурами капсулообразующих штаммов *B. anthracis* 71/12, 76, 17JB и Carbovax в дозе 200 $ЛД_{50}$. Однако в экспериментах с использованием в качестве заражающих культур вирулентных полевых изолятов *B. anthracis* была выявлена существенная разница в уровнях протективной эффективности исследуемых штаммов. Иммунизация животных штаммом *B. anthracis* 363/11 защищала 100, 50 и 40 % морских свинок от заражения штаммами *B. anthracis* 81, 304, 364 соответственно, но при этом процент защиты животных, вакцинированных штаммом *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, для указанных полевых изолятов

составил 40, 25 и 10 % соответственно.

Различие в протективной эффективности штаммов было подтверждено и в опытах на овцах в возрасте 1–1,5 года, ранее не привитых против сибирской язвы. Введение овцам споровых суспензий штамма *B. anthracis* 363/11 в дозе $12,5 \cdot 10^6$ спор защищало животных от заражения высоковирулентными полевыми штаммами *B. anthracis* 76, 81 и 364 не менее чем в 10 безусловно смертельных дозах для этого вида животных. Вакцинация овец штаммом 55-ВНИИВВиМ защитила от гибели только животных, зараженных штаммом *B. anthracis* 76. В остальных группах животные заболели и пали на 3–5-е сутки с симптомами острой формы сибирской язвы.

Оценку стабильности сохранения штаммом *B. anthracis* 363/11 биологических, протективных свойств и вероятности реверсии проводили с использованием метода последовательных пассажей на питательных средах. Установлено, что после 3-го пассажа у культуры начинает снижаться ферментативная активность, остаточная вирулентность и иммуногенность. Так, к 7-му пассажу вирулентность штамма для белых аутбредных мышей снизилась в 23 раза – показатель $ЛД_{50}$ возрос с $3,16 \cdot 10^5$ до $7,28 \cdot 10^6$ спор. Иммуногенная активность против штаммов *B. anthracis* 71/12 и Carbovax также снизилась более чем в 30 раз – показатели $ИД_{50}$ возросли с $2,9 \cdot 10^4$ до $1,0 \cdot 10^6$ спор и с $1,55 \cdot 10^5$ до $8,4 \cdot 10^6$ спор соответственно. Полученные результаты свидетельствуют не только о безопасности кандидатного штамма, но и о необходимости проведения дальнейших исследований по оптимизации системы его культивирования и поддержания в активном состоянии.

Таким образом, в результате исследований, направленных на поиск новых сибиреязвенных штаммов, обладающих более широким спектром защитного действия, чем применяемые в настоящее время, и пригодных для разработки эффективных средств специфической профилактики, установлено, что природный естественно аттенуированный моноплазмидный бескапсульный штамм *B. anthracis* 363/11, выделенный от павшего подсвинка, обладает протективными свойствами, позволяющими отнести его к кандидатным для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской язвы. Данные экспериментов с использованием биологических моделей свидетельствуют о его высоких иммуногенных свойствах, превышающих таковые вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, и его перспективности в качестве кандидата для разработки вакцины для нужд ветеринарии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО в рамках выполнения научной темы № 0615-2016-0001.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова И.Ю., Севских Т.А., Селянинов Ю.О. Иммунобиологические свойства нового бескапсульного штамма *Bacillus anthracis* 363/11. *Биотехнология*. 2015; 5:34–41.

2. Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Маничев А.А., Бастаров С.И., Саленко Л.С., Яковлева Т.Н., Степанова В.В., Шморгун Б.И., Киселев Ю.Т., Сайиткулов Б.С. Опыт профилактики сибирской язвы у сельскохозяйственных животных в России. *Ветеринария*. 1995; 5:27–30.

3. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В., Старицын Н.А., Померанцев А.П., Алешкин В.А. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 224 с.

4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. 2012. Vol. 1, Chapter 2.1.1. Anthrax. P. 87–97.

References

1. Egorova I.Yu., Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O. [Immunobiological properties of a new non-capsular *Bacillus anthracis* 363/11 strain]. *Biotekhnologiya*. 2015; 5:34–41.

2. Ipatenko N.G., Gavrilov V.A., Manichev A.A., Bastarov S.I., Salenko L.S., Yakovleva T.N., Stepanova V.V., Shmorgun B.I., Kiselev Yu.T., Sayitkulov B.S. [Experience in prophylaxis of anthrax in livestock animals in Russia]. *Veterinariya*. 1995; 5:27–30.

3. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Stepanov A.V., Staritsyn N.A., Pomerantsev A.P., Aleshkin V.A. [Microbiological Diagnostics of Anthrax]. M.; 1999. 224 p.

4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. 2012. Vol. 1, Chapter 2.1.1. Anthrax. P. 87–97.

Authors:

Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Science. 1, Akademika Bakulova St., Settlement Volginsky, Vladimir Region, 601125, Russian Federation. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

Об авторах:

Севских Т.А., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю. Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии. Российская Федерация, 601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

Поступила 29.12.16.

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЗУРАБА ЛЕВАНОВИЧА ДЕВДАРИАНИ

16 апреля 2017 г. исполнилось 70 лет Зурабу Левановичу Девдариани, доктору медицинских наук, профессору, главному научному сотруднику института «Микроб».

Зураб Леванович работает в институте более 40 лет. Он является автором и соавтором свыше 250 научных публикаций, в том числе книги «Вакцины и вакцинация. Национальное руководство». Большая часть его научных трудов посвящена вопросам иммунопатогенеза, иммунодиагностики и иммунопрофилактики особо опасных инфекций. Под руководством З.Л.Девдариани выполнено десять кандидатских и одна докторская диссертации. Он читает лекции на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации при РосНИПЧИ «Микроб», является членом диссертационного совета Д 208.078.02, Проблемной комиссии 48.02 «Диагностика, профилактика и лечение особо опасных инфекционных болезней», членом редакционной коллегии научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций».

За высокие показатели в научно-общественной и педагогической деятельности Зураб Леванович награжден ведомственным знаком «Отличник госсанэпидслужбы».

З.Л.Девдариани является высококвалифицированным специалистом, настоящим представителем противочумной системы. Он пользуется заслуженным авторитетом и уважением своих коллег.

Редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляет Зураба Левановича с юбилеем и желает ему крепкого здоровья, творческого долголетия и благополучия.

ПАМЯТИ ЛЮБОВИ ВЛАДИМИРОВНЫ САМОЙЛОВОЙ

22 марта 2017 г. на 85-ом году жизни скончалась доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки, бывший главный научный сотрудник РосНИПЧИ «Микроб» Любовь Владимировна Самойлова.

Любовь Владимировна являлась ведущим ученым-чумологом страны, высококвалифицированным специалистом-микробиологом широкого профиля. Вся ее яркая и многогранная деятельность связана с институтом «Микроб» и противочумной системой, в которой она служила с 1958 г., пройдя путь от врача и старшего научного сотрудника до заведующей лабораторией. Любовью Владимировной организована первая в противочумной системе лаборатория аэрозолей, которую она возглавляла с 1972 по 1996 год. Под руководством Л.В.Самойловой разработаны методы лабораторной диагностики и лечения чумы, обеспечения безопасности при работе с аэрозолями патогенных микроорганизмов. Любовь Владимировна многократно принимала участие в организации и проведении противоэпидемических мероприятий на территории СССР (Узбекистан, Казахстан, Крым, Прибалтика и другие). Она – автор более 200 научных трудов, которые получили высокую оценку как в России, так и за рубежом. При ее непосредственном участии созданы «Руководство по профилактике чумы» (1982), «Диагностика возбудителей особо опасных инфекций» (1998), написаны монографии «Лабораторная диагностика чумы» (1952), «Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в Саратовской области» (1996). Л.В.Самойлова являлась соавтором ряда руководящих методических документов и пособий по санитарно-эпидемиологическому надзору за особо опасными инфекциями на территории России и стран СНГ.

Профессор Самойлова воспитала целую плеяду высококвалифицированных специалистов – под ее руководством защищены более 20 кандидатских и докторских диссертаций.

За трудовые и научные достижения Любови Владимировне Самойловой присвоено почетное звание Заслуженный деятель науки Российской Федерации. Она награждена двумя медалями, знаком «Отличник Гражданской обороны», почетным знаком губернатора Саратовской области «За милосердие и благотворительность», Почетными грамотами Министерства здравоохранения СССР и Госсанэпиднадзора России.

Эрудиция, высокий профессионализм, талант организатора и исследователя, активная жизненная позиция сочетались в ней с мудростью и доброжелательным отношением к людям.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают искреннее соболезнование семье и близким Любови Владимировны. Светлая и благодарная память о ней будет долго жить в сердцах ее коллег и учеников.